

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea magistrale in Analisi e gestione dell'ambiente

**Analisi del ciclo di vita della coltivazione di *Phaeodactylum*
tricornutum: valutazione di scenari alternativi
nell'approvvigionamento di CO₂**

Tesi di laurea in

Sistemi di gestione ambientale, di politica ed economia ambientale

Relatore

Prof.ssa Righi Serena

Presentata da

Dotto Federica

Correlatore

Ing. Porcelli Roberto

II Sessione

Anno Accademico 2016/2017

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il sig. Silvio Bartolotti (AD di Micoperi) e Dott. Guido Emiliani (Presidente di Micoperi Blue Growth) per l'opportunità e la disponibilità di svolgere la tesi presso l'azienda.

Si ringraziano Sara Boero e Teresa Striano per la costante disponibilità, i numerosi chiarimenti e l'aiuto nella comprensione del sistema di coltivazione. Unitamente a loro desidero ringraziare tutto il personale di Micoperi Blue Growth per le informazioni e i dati forniti, in particolare: Matilde Mazzotti, Adriano Pinna e Tonia Principe.

Un ringraziamento speciale va a Laura Pezsolesi per essersi dimostrata sempre gentile e disponibile, a Federica Abbondanzi e alla professoressa Guerrini Franca del laboratorio di algologia dell'università, per il tempo dedicatomi.

Infine, ringrazio Filippo Baioli per i numerosi consigli e l'assistenza nell'elaborazione del modello.

Indice

1- Introduzione	11
1.1- Il progetto GoBioM	11
1.2- Il biogas e le tecnologie di upgrading	13
1.2.1- Tecniche di rimozione fisico-chimica di CO ₂	18
1.2.2- Separazione a membrana.....	19
1.3- Il biometano.....	20
1.4- Le microalghe.....	25
1.4.1- Fasi di crescita delle microalghe	25
1.5- <i>Phaeodactylum tricornerutum</i>	27
1.6- La coltivazione microalgale	29
1.7- Fotobioreattori	33
1.7.1- Fotobioreattori a piastre	33
1.7.2- Fotobioreattori elicoidali.....	34
1.7.3- Fotobioreattori a tubo verticale	34
1.7.4- Fotobioreattori a tubi orizzontali	34
1.8- Life Cycle Assessment (LCA).....	35
1.8.1- LCA sulla coltivazione microalgale	39
2- Materiali e metodi	43
2.1- Il software GaBi 8.0	43
2.2- Il ruolo di Micoperi Blue Growth (MBG)	44
2.3- Sperimentazioni su <i>Phaeodactylum tricornerutum</i>	45
2.4- Definizione dell'obiettivo e campo di applicazione (fase 1)	47
2.4.1- Sanificazione	47
2.4.2- Coltivazione	47
2.4.3- Raccolta	48
2.5- Inventario (fase 2)	49
2.6- Valutazione degli impatti (fase 3)	52
2.6.1 - Descrizione scenari.....	52
2.6.2- Categorie d'impatto	57
2.7- Analisi di sensitività	61
3- Risultati e discussione	65
3.1- Scenario indoor cultivation of PT with synthetic CO ₂	65
3.2- Scenario indoor cultivation of PT with waste CO ₂	71
3.3- Analisi comparativa.....	75

3.4- Risultati dell'analisi di sensitività.....	76
4- Conclusioni.....	79
5- Bibliografia.....	81
6- Sitografia.....	89

INDICE ACRONIMI

AP - Acidification midpoint

CF - Fattore di Caratterizzazione

CFC - Clorofluorocarburi

CNG - Compressed Natural Gas

EF - Ecotoxicity freshwater midpoint

ENEA - Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile

EPA - Eicosapentanoic acid

EPD - Environmental Product Declaration

EPf - Eutrophication freshwater midpoint

EPm - Eutrophication marine midpoint

EPt - Eutrophication terrestrial midpoint

GPP - Green Public Procurement

GSE - Gestore dei Servizi Energetici

GWP(ebC) - Climate change midpoint, excluding biogenic carbon

GWP(ibC) - Climate change midpoint, including biogenic carbon

HTc - Human toxicity midpoint, cancer effects

HTnc - Human toxicity midpoint, non-cancer effects

HUFAs - Highly Unsaturated Fatty Acids

ILCD - International Reference Life Cycle Data

IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change

IR - Ionizing radiation midpoint, human health

IS - Impact Score

LCA - Life Cycle Assessment

LCIA - Life Cycle Impact Assessment

LCT - Life Cycle Thinking

LNG - Liquefied Natural Gas

LU - Land use midpoint

MBG - Micoperi Blue Growth

OD - Ozone depletion midpoint

PBR - Photobioreactor

PEF - Product Environmental Footprint

PM - Particulate matter/respiratory inorganics midpoint

POF - Photochemical ozone formation midpoint

PT- *Phaeodactylum tricornutum*

PUFAs - PolyUnsaturated Fatty Acids

RDm - Resources depletion mineral, fossils and renewables

RDw - Resources depletion water midpoint

SETAC - Society for Environmental Toxicology And Chemistry

UF - Unità Funzionale

UNEP - United Nations Environmet Progam

VOCs - Volatile Organic Compounds

UNITÀ DI MISURA

μmol : micromoli

\AA : angstrom

$\text{g}_{\text{DW}}/\text{L}$: grammi di peso secco per litro

MWel: Megawatt elettrico

Nm^3/h : Normal metro cubo per ora

Nm^3 : Normal metro cubo

Ppm: parti per milione

Ppmv: parti per milioni in volume

TWh: Terawattora

1- Introduzione

L'obiettivo del presente studio è valutare la sostenibilità dell'intero processo di coltivazione della specie microalgale *Phaeodactylum tricornutum*, finalizzato alla produzione di composti bioattivi. In particolare si confrontano due scenari che differiscono per la tipologia di CO₂ impiegata per insufflare le colture algali: nel primo viene utilizzata CO₂ tecnica, quindi prodotta industrialmente, nel secondo CO₂ di scarto proveniente da un processo di upgrading del biogas a biometano. Lo scopo è stabilire se la produzione di biomassa algale, sfruttando CO₂ di scarto, sia sostenibile e vantaggiosa dal punto di vista ambientale.

In questo modo si avrebbe un duplice vantaggio, ovvero usufruire dell'anidride carbonica, a costo zero, in uscita dall'impianto di produzione di biometano e, contemporaneamente, evitarne l'emissione diretta in atmosfera. I problemi derivanti dall'utilizzo della CO₂ di scarto potrebbero essere una riduzione della resa e una qualità inferiore dei composti estratti dalla biomassa.

La valutazione della performance ambientale viene condotta secondo l'approccio LCA, strumento standardizzato che permette di valutare e quantificare, attraverso un'analisi il più possibile oggettiva, i carichi energetici ed ambientali ed i potenziali impatti che possono derivare da una o più fasi del ciclo di vita di un prodotto, servizio o processo, in un'ottica di miglioramento della performance ambientale. Per l'analisi LCA è stato utilizzato il software GaBi 8.0.

1.1- Il progetto GoBioM

Il progetto GoBioM è una proposta della regione Emilia Romagna, che punta all'efficienza tecnologica della filiera regionale/nazionale del biometano, con il superamento delle attuali principali criticità (GoBioM, 2017). Sono coinvolte sette imprese, le quali forniscono le biomasse di scarto e le conoscenze operative, e cinque laboratori di ricerca che puntano a migliorare la tecnologia dell'upgrading del biogas a biometano, così da poter attribuire a tali impianti il concetto di bioraffineria e considerare il biometano come uno dei prodotti della green chemistry e della green economy.

La motivazione cardine di tale iniziativa è il ruolo del biometano come risorsa ecologica, flessibile (poiché sfruttabile sia come combustibile in tutti gli usi energetici sia come materia prima per la produzione di biomateriali) e, contrariamente alle fonti rinnovabili intermittenti, programmabile ed adattabile alle diverse condizioni territoriali e temporali della domanda di energia in ogni settore d'uso. Inoltre, è sostenibile dal punto di vista della produzione, grazie anche alla riduzione dei costi operativi, e nella fase di fine vita dei prodotti, con il recupero energetico e massimizzazione dell'efficienza in un'ottica di simbiosi industriale.

Il progetto GoBioM è strutturato sulla base dei seguenti OR (Obiettivi Realizzativi) (GoBioM, 2017):

- OR0: coordinamento e gestione del progetto;
- OR1: caratterizzazione/mappatura matrici e sviluppo metodologie per monitoraggio processi a biometano;
- OR2: sviluppo di tecnologie di pretrattamento e del processo di digestione anaerobica;
- OR3: ottimizzazione upgrading biogas a biometano e uso CO₂;
- OR4: sostenibilità ambientale, sociale e tecnico-economica della filiera del biometano;
- OR5: attività di diffusione e disseminazione dei risultati.

Nell'OR3 è inclusa la valutazione dell'utilizzo della CO₂ di scarto del processo di upgrading del biogas a biometano, nella coltivazione di microalghe su scala industriale, per la produzione di composti ad alto valore aggiunto. Parallelamente, le attività dell'OR4 comprendono la definizione della sostenibilità della coltivazione di alghe con CO₂ da upgrading, prevedendo nello specifico di:

- valutare il potenziale impatto ambientale connesso alla coltivazione di microalghe con CO₂ da upgrading;
- confrontare il profilo ambientale ottenuto con processi alternativi (colture insufflate con CO₂ pura);
- valutare la fattibilità tecnico-economica e gli effetti sociali.

All'interno dell'OR4 si inserisce questo lavoro di tesi, che consiste infatti in un'analisi comparativa della performance ambientale della coltivazione delle microalghe sfruttando CO₂ da upgrading, rispetto a quella con utilizzo di CO₂ pura. A tale scopo è fondamentale la collaborazione con Micoperi Blue Growth srl, azienda specializzata nella coltivazione di microalghe, che è interessata a verificare in campo su colture pilota la possibilità di produrre, con CO₂ di scarto dalla produzione di biometano, biomassa algale destinata alla nutraceutica o all'agricoltura biologica con lo stesso livello di qualità raggiunto con CO₂ pura.

1.2- Il biogas e le tecnologie di upgrading

Il biogas è il prodotto della digestione anaerobica di biomasse operata da microrganismi batterici. Il processo di biodegradazione avviene in opportuni digestori, all'interno dei quali possono esservi diversi tipi di substrati, quali fanghi di depurazione, rifiuti in discarica, reflui zootecnici, liquami, rifiuti solidi urbani e scarti agricoli. I prodotti in uscita dal digestore sono il digestato, costituito da una parte solida e una liquida, e il biogas grezzo, costituito prevalentemente da metano (CH₄) e diossido di carbonio (CO₂). Il biogas può essere bruciato direttamente per produrre elettricità o sfruttato per la cogenerazione di energia elettrica e calore da utilizzare per il teleriscaldamento o per riscaldare i digestori stessi. Invece, per ottenere biometano è necessario sottoporre il biogas ad un processo di purificazione, chiamato "upgrading".

Nel 2012 gli impianti di upgrading in Europa erano 155, con una potenziale di produzione di 670 milioni m³ di CH₄/anno (stima CRPA considerando una media di 500 Nm³/h per tutti gli impianti). In quell'anno i paesi con il maggior numero di impianti di upgrading erano Germania, con 77 impianti (fonte: Dena), e Svezia, con 38 impianti, di cui 27 a lavaggio con acqua, 7 con tecnica PSA e 4 con lavaggio chimico (Piccinini, 2012).

Nel 2015 sono stati commissionati 92 nuovi impianti di upgrading del biogas (EBA, 2016). La Germania si è mantenuta il leader del settore con 185 impianti di biometano.

In generale, in Europa c'è stato un aumento: 43 nuovi impianti nel Regno Unito, 11 in Svizzera, 7 in Germania e 6 in Danimarca (EBA, 2016).

A fine 2015, secondo l'EBA (European Biogas Association) risultavano operativi 17376 impianti di biogas e 459 impianti a biometano, di cui: 255 impianti connessi alla rete del

gas naturale, 8 connessi ad impianti di compressione del gas naturale (CNG) o ad impianti di liquefazione di gas naturale (LNG) e 4 impianti collegati ad entrambi (CIB, 2016) (EBA, 2016). Il totale di energia elettrica prodotta da biogas ammontava a 60,6 TWh, che corrisponde al consumo annuo di 13,9 milioni di famiglie europee.

In Europa, il 72% degli impianti di digestione anaerobica sfrutta residui agricoli, il 16% utilizza fanghi di depurazione urbani e industriali da impianti di trattamento e il 12% rifiuti organici municipali e da discarica (Salimbeni, 2016).

I paesi che sfruttano feedstocks agricoli nella maggior parte degli impianti sono Germania (87%), Italia (80%), Repubblica Ceca (69%) e Austria (46%).

In Francia il biogas è, principalmente, prodotto da rifiuti organici e in discarica. In Inghilterra e Svizzera, buona parte degli impianti genera biogas a partire da fanghi di depurazione (Salimbeni, 2016).

In Italia, alla fine del 2015, si contavano 1555 impianti biogas, con una potenza elettrica installata totale di 1250 MWel (fonte dati GSE ed elaborazioni CIB) che equivale ad una produzione lorda di circa 2,6-2,8 miliardi di Nm³ di biometano sfruttati unicamente in motori endotermici per la produzione di energia elettrica. Di questi, il 77% (quasi 1200) è alimentato da matrici agricole, con una potenza elettrica installata di circa 960 MWel, equivalente ad una produzione di biometano di circa 2,2 miliardi di m³ (CIB, 2016).

Attualmente l'Italia è il secondo produttore di biogas in Europa, dopo la Germania, e il quarto a livello mondiale dopo Cina, Germania e Stati Uniti (Piccinini, 2017).

In Italia, nel 2016, si contavano 7 impianti di produzione di biometano. Il primo è stato realizzato presso una discarica a Roma negli anni '90, esso si basa sull'upgrading per scrubbing ad acqua (capacità di trattamento pari a 200 m³/ora). Il biometano generato da questo impianto viene utilizzato come biocarburante in alcuni automezzi impiegati per la raccolta dei rifiuti. Gli altri 6 sono impianti prototipo, non collegati alla rete di gas, con l'obiettivo di proporre sul mercato nuove modalità di upgrading del biogas. Quattro di questi utilizzano biogas proveniente da imprese agricole (nelle province di Bologna, Padova, Mantova e Torino), gli altri due sono collegati ad impianti di trattamento di FORSU (provincia di Torino e Padova). Sono già attivi due punti di rifornimento di biometano per automezzi alimentati a gas naturale (CIB, 2016).

L'interesse per il settore del biogas è in continua crescita poiché è il punto di partenza di diversi prodotti, come sintetizzato in Figura 1.

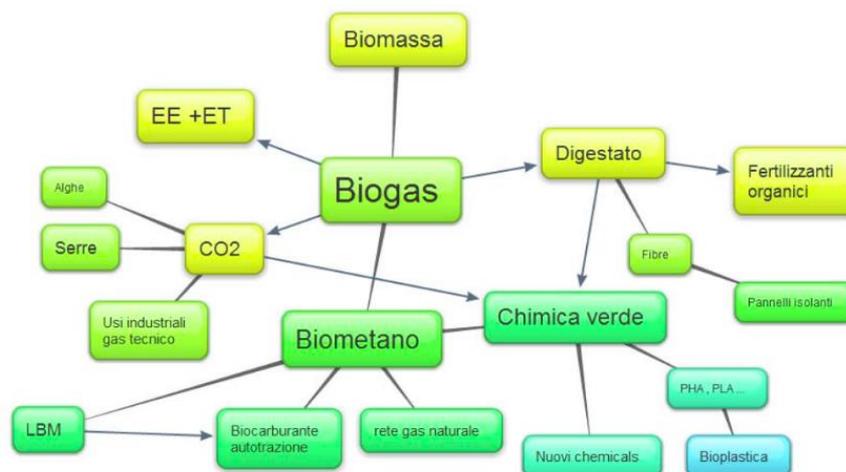


Figura 1: biogas e derivati. (Piccinini, 2017).

Il biogas da digestione anaerobica o da discarica generalmente è composto, in buona parte, da metano, e da percentuali variabili di anidride carbonica (CO₂), vapore acqueo (generalmente saturo), composti solforati, azoto, ossigeno e silossani, come riportato in Tabella 1. I silossani si ritrovano nel biogas da fanghi di depurazione o da discarica poiché sono contenuti in detersivi e cosmetici.

Tabella 1: composizione biogas. (Fonte: Biomethane Regions, 2012)

Parametro	Biogas	Gas da discarica	Gas Naturale (rif. Danimarca)
Metano [% vol]	60-70	25-65	89
Vapore acqueo [% vol]	Saturo	Saturo	0
Altri idrocarburi [% vol]	0	0	9,4
Idrogeno [% vol]	0	0-3	0
Anidride Carbonica [% vol]	30-40	15-50	0,67
Azoto [% vol]	≤1	5-40	0,28
Ossigeno [% vol]	≤0,5	0-5	0
Acido solfidrico [ppmv]	0-4000	0-100	2,9
Ammoniaca [ppmv]	≤100	≤5	0
Potere calorifico inferiore [kWh/m ³ STP]	6,5	4,4	11

Con il termine upgrading si fa riferimento al processo di rimozione di componenti indesiderati ed eventuali contaminanti dal biogas per ottenere biometano (contenuto di CH₄ ≥ 95%) e quindi renderlo assimilabile al gas naturale. A seconda della composizione di partenza del biogas, l'upgrading può comprendere anche la compressione ad una pressione necessaria per l'utilizzo successivo del gas. Nel caso, ad esempio, dell'immissione in una rete del gas naturale locale a bassa pressione, possono essere necessari trattamenti di odorizzazione o di regolazione del potere calorifico tramite dosaggio di propano (Biomether, 2012).

Le tecnologie disponibili per l'upgrading si basano su diversi principi chimico-fisici legati alla separazione dei gas (adsorbimento, assorbimento, permeazione e criogenesi). La selezione della tipologia di upgrading si basa sulla composizione e sui volumi del biogas da trattare, la qualità di biometano desiderata e l'utilizzazione finale di questo, il funzionamento dell'impianto di digestione anaerobica ed i tipi e la continuità dei substrati utilizzati, così come le specifiche dell'impianto (Institute of Chemical Engineering, 2012).

Al fine di evitare il rischio di esplosione, corrosione, abrasione e malfunzionamento è indispensabile rimuovere i contaminanti presenti nel biogas, ovvero: CO₂, H₂S, H₂O, N₂, O₂, metil-silossani e idrocarburi alogenati (Persson et al., 2007) (Abatzoglou & Boivin, 2009); per questo esistono diverse tecniche di upgrading basate su convenzionali tecnologie fisico-chimiche capaci di produrre biometano con un grado di purezza di 88-98% e una rimozione di metil-silossani e di idrocarburi alogenati superiore al 99%. La scelta della modalità di upgrading dipende dall'uso finale del biogas e dalla composizione stessa del biogas. Quest'ultima è intrinsecamente determinata dallo stato di riduzione dell'ossidazione del carbonio della sostanza organica presente nei rifiuti e dal tipo di processo di digestione anaerobica, che a sua volta dipendono dall'origine del residuo digerito (Jönsson et al., 2003).

Nonostante le tecnologie di upgrading possano far fronte a concentrazioni elevate di acido solfidrico (H₂S), è preferibile una rimozione preventiva di tale gas pericoloso e corrosivo, al fine di evitare eventuali problemi operativi (Miltner et al., 2012). Quindi è di importanza cruciale la desolfurazione del biogas prima di qualsiasi ulteriore utilizzo, quali: immissione in rete o produzione di metano-combustibile. A tale scopo, sono applicabili diverse tecnologie di rimozione dell'acido solfidrico:

- precipitazione del solfuro. Tramite l'aggiunta di miscele liquide di diversi sali metallici (es: cloruro ferrico o solfato di ferro), si provoca la precipitazione dello zolfo sotto forma di solfuro di ferro quasi insolubile nel fermentatore di biogas. Viene rimosso dalla fermentazione insieme al digestato. Usando tale tecnologia è possibile rimuovere anche l'ammoniaca;
- scrubbing biologico. Questa modalità di rimozione del solfuro di idrogeno si basa sull'ossidazione da parte di microrganismi chemoautotropici delle specie *Thiobacillus* o *Sulfolobus*. L'ossigeno richiesto per la reazione viene fornito aggiungendo una piccola quantità d'aria (o ossigeno puro se i livelli di azoto devono essere ridotti al minimo). L'acido solfidrico viene quindi convertito in zolfo elementare o acqua o acido solforoso ed eliminato insieme al flusso di scarico della colonna d'acqua;
- scrubbing chimico con ossidazione. Uno dei metodi più antichi per la rimozione del solfuro di idrogeno è l'assorbimento da parte di soluzioni caustiche (es: idrossido di sodio). Nel processo di upgrading, l'ossidante più utilizzato è il perossido di idrogeno;
- adsorbimento su ossidi di metallo o carbone attivo. L'acido solfidrico può essere adsorbito sulla superficie di ossidi metallici come ossido di ferro, ossido di zinco, ossido di rame o su carbone attivo. Quindi lo zolfo si lega come solfuro metallico e si libera vapore acqueo, mentre il materiale adsorbente, una volta carico, viene rimosso e sostituito con uno nuovo. Il processo viene eseguito con l'aggiunta di un'aliquota di ossigeno per ossidare il gas adsorbito allo zolfo per mantenere più forte il legame alla superficie. Nel caso non sia consentito il dosaggio di ossigeno, lo si sostituisce con carbone attivo impregnato.

La maggior parte delle tecnologie di upgrading a scala industriale prevede il rilascio in atmosfera dell'anidride carbonica separata dal biogas (in seguito a pretrattamenti dell'off-gas per evitare anche il rilascio di CH₄).

Le biotecnologie che invece consentono la conversione di CO₂ in prodotti commerciali, in alternativa all'emissione diretta in aria, a costi energetici notevolmente inferiori, sono state testate solo a scala di laboratorio o pilota (Muñoz et al., 2015).

Tra queste ultime, le principali sono: la bioconversione di CO₂ con supporto di H₂, la fissazione microalgale di CO₂, la dissoluzione enzimatica di CO₂, la riduzione fermentativa di CO₂ e il desorbimento in situ di CO₂.

1.2.1- Tecniche di rimozione fisico-chimica di CO₂

Le tecniche di rimozione fisico-chimica di CO₂ più diffuse sono: lavaggio (o scrubbing) con acqua, lavaggio con solventi organici o con soluzioni chimiche, pressure swing adsorption (PSA), separazione criogenica di CO₂ e separazione a membrana. Le tecnologie a scrubbing sfruttano le differenti proprietà dell'anidride carbonica rispetto al metano, come la solubilità in acqua (26 volte superiore a 25 °C) (Sinnott, 2005) e la reattività con materiali adsorbenti (Andriani et al., 2014). Il lavaggio ad acqua, essendo la meno sensibile alle impurità presenti nel biogas è la più diffusa e ricopre il 41% del mercato di upgrading del biogas (Thrän, 2014). È spesso accoppiata ad unità moderne nelle discariche o negli impianti di trattamento di rifiuti solidi urbani (Bauer et al., 2013) (Beggel et al., 2010). Nei sistemi a scrubbing si produce biometano con un livello di purezza del 96-98,5% di CH₄ (Bauer et al., 2013) (Thrän, 2014), e con perdite di CH₄ inferiori al 2% (Persson et al., 2007).

Il Pressure Swing Adsorption (PSA) è una modalità di separazione di anidride carbonica e metano che si basa sull'assorbimento selettivo di CO₂ rispetto a CH₄ su materiali adsorbenti porosi con un'alta superficie specifica come carbonio attivo, gel di silice, allumina attivata, zeoliti e adsorbenti polimerici (Patterson et al., 2011) (Ryckebosch et al., 2011). I pori del materiale adsorbente hanno un diametro di 3,7 Å, che trattengono esclusivamente le molecole di CO₂ (dimensioni 3,4 Å); quindi si ottiene gas arricchito in metano, poiché le molecole di CH₄ (dimensioni 3,8 Å) passando attraverso lo spazio interstiziale e non permangono all'interno dei pori. Permette di ricavare biometano con un grado di purezza del 96-98%.

La separazione criogenica di CO₂ sfrutta le diverse temperature di liquefazione/solidificazione dei componenti del biogas, quindi consiste nella riduzione graduale della temperatura del biogas, così da favorire una separazione selettiva di H₂O, H₂S, CO₂ e CH₄, permettendo anche la generazione di biometano liquefatto (privo di O₂ e

N₂), ad un intervallo di temperatura di -162 e -182 °C (Bauer et al., 2013). Nonostante tale tecnologia permetta di ricavare biometano con un livello di purezza del 97%, con perdite di CH₄ inferiori al 2% (Beil, 2009) (Andriani et al., 2014), la sua quota di mercato mondiale di upgrading è solo del 0,4% (Bauer et al., 2013), in quanto non è ancora completamente affidabile e commercializzabile a pieno titolo.

1.2.2- Separazione a membrana

All'interno del progetto GoBioM, la modalità di upgrading del biogas utilizzata è la separazione a membrana. Il flusso di off-gas prodotto è caratterizzato da 90% di CO₂, il restante 10% è composto da metano (CH₄), O₂ (< 1%) e acido solfidrico (< 600 ppm).

Tale tecnologia sfrutta un materiale semi-permeabile, che trattiene CH₄ e N₂, mentre consente il passaggio di O₂, H₂O, CO₂ e H₂S, con fattori di selettività CO₂/CH₄ fino a 1000/1 (Ryckebosch et al., 2011). Per la realizzazione di tali membrane selettive, sono preferibili materiali polimerici, come l'acetato di cellulosa, rispetto a materiali non polimerici, per i costi minori, facilità di fabbricazione e di scalabilità e stabilità ad alta pressione (Basu et al., 2010). Inoltre, recenti studi nel campo della nanotecnologia hanno prodotto membrane con fattori di selettività più alti, e quindi un maggiore recupero di metano; ciò ha rinnovato l'interesse per questa modalità di upgrading (Bauer et al., 2013). Infatti, gli impianti di separazione a membrana sono commercializzati sia nei moduli gas-gas ad alta pressione, che nei moduli gas-liquido a bassa pressione, con una quota di mercato del 10% (Patterson et al., 2011) (Thrän, 2014). Il biogas è pressurizzato a 20-40 bar nei sistemi a gas (anche se alcune unità commerciali operano in un intervallo di 6-20 bar), ottenendo così biometano ricco in CH₄ e un flusso ricco in CO₂ contenente metano e acido solfidrico in tracce, a pressione atmosferica (o a pressioni negative per aumentare la purezza del biometano oltre il 97%) (Bauer et al., 2013). Le unità gas-gas sono prodotte in diverse configurazioni: unità a membrana a singolo passaggio o unità a membrana a più stadi con riciccoli interni dei flussi di CO₂ e CH₄. I sistemi a gas-liquido funzionano a pressione atmosferica (con la relativa riduzione dei costi di costruzione) con una membrana idrofobica microporosa che separa il biogas dal liquido CO₂-assorbente. La quantità e il grado di purezza del biometano ricavato dipende dal tipo di membrana utilizzata. In impianti a gas-liquido o a gas-gas a due stadi con ricircolo del permeato, si può ottenere

biometano al 98-99%. I produttori di sistemi a gas-liquido o gas-gas a più fasi, garantiscono concentrazioni di CH₄ del 96-98%, mentre le unità gas-gas a singolo passaggio forniscono biometano con un contenuto di CH₄ del 92-94% e off-gas con concentrazioni di metano del 10-25%, che quindi deve subire ulteriori trattamenti (Ryckebosch et al., 2011) (Andriani et al., 2014). Una soluzione per ricavare biometano con un maggiore grado di purezza è far funzionare gli impianti a pressioni più elevate. Anche con questa modalità di upgrading è raccomandato un pre-trattamento a condensazione e filtrazione con carboni attivi, per rimuovere particelle, H₂S, H₂O, VOC, NH₃ e silossani, al fine di evitare problemi di deterioramento e intasamento della membrana (Patterson et al., 2011) (Bauer et al., 2013).

1.3- Il biometano

Il biometano (bio-CH₄) è un gas con una concentrazione di metano almeno del 95% ed è prodotto da fonti rinnovabili. Deriva dal biogas generato dalla digestione anaerobica di biomasse in ambiente controllato (digestore) o in discarica, in seguito alla decomposizione dei rifiuti, o dal gas derivante dalla gassificazione delle biomasse. Raggiunge la qualità del gas naturale, in seguito a processo di purificazione ed upgrading (GSE, 2015).

Oggi le tecnologie di upgrading sono molto più competitive ed efficienti, infatti si recupera il 95-98% del contenuto totale di energia contenuta nel biogas (Salimbeni, 2016).

Il DM 5 del dicembre 2013 che, in attuazione del Dlgs 28/2011, completa il quadro normativo-regolamentare in tema di promozione dell'energia da fonti rinnovabili derivante dal recepimento della direttiva 2009/28/CE (GSE, 2015), definisce il biometano come “Il biogas che, a seguito di opportuni trattamenti chimico-fisici, soddisfa le caratteristiche fissate dall'Autorità con la delibera di cui all'articolo 20, comma 2 del decreto legislativo 3 marzo 2011 n. 28, ed è quindi idoneo alla successiva fase di compressione per l'immissione (Ministro dello Sviluppo Economico, 2013):

- nelle reti di trasporto e di distribuzione del gas naturale;
- in impianti di distribuzione di metano per autotrazione;
- in impianti di cogenerazione ad alto rendimento.”

Per rete del gas naturale vanno intese (GSE, 2015):

- le reti di trasporto e distribuzione del gas naturale in concessione;

- le altre reti di trasporto (reti private);
- i sistemi di trasporto mediante carri bombolai;
- i distributori di carburanti per autotrazione sia stradali sia a uso privato, compreso l'uso agricolo, anche non connessi alle reti di trasporto e distribuzione.

La direttiva europea 2014/94/EU, del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 22 ottobre 2014, sullo sviluppo dell'infrastruttura per i combustibili alternativi (DAFI), ha previsto che gli Stati Membri adottino, entro il 2016, dei piani di sviluppo delle diverse fonti alternative per il settore dei trasporti. Dove per "carburanti alternativi" si intendono quelli che possono sostituire, almeno in parte, i carburanti fossili nel settore dei trasporti e che hanno la potenzialità di contribuire alla decarbonizzazione ed al miglioramento delle prestazioni ambientali di questo settore, ed includono (CE, 2014):

- elettricità;
- idrogeno;
- biocarburanti (come definiti nella Direttiva 2009/28/EC);
- gas naturale, incluso il biometano, nella forma gassosa e liquida;
- gas di petrolio liquefatto (GPL).

Gli obiettivi della direttiva sono:

- riduzione della dipendenza dal petrolio del settore dei trasporti in UE;
- sviluppo di un sistema di trasporto nella UE competitivo, efficiente e sostenibile dal punto di vista delle risorse;
- incoraggiare gli investimenti con normative chiare e stabili di medio periodo, in particolare con le previsioni delle infrastrutture minime;
- eliminazione di barriere tecnologiche e regolatorie tra gli Stati membri (attraverso standard comuni e la interoperatività);
- sviluppo di un mercato unico delle infrastrutture per i carburanti alternativi e per i veicoli con alimentazione alternativa;
- informazione dei consumatori (tipi di carburanti e compatibilità dei veicoli).

Il biometano, oltre ad essere un carburante alternativo, è una fonte d'energia ecologica e con una buona competitività rispetto ad altre risorse rinnovabili, garantita da:

- l'utilizzo di infrastrutture già disponibili (centrali elettriche a ciclo combinato; reti di trasporto, sistemi di stoccaggio e reti di distribuzione del gas; reti di trasmissione e distribuzione dell'energia elettrica);
- economie di integrazione, riduzione di ulteriori costi infrastrutturali per la trasmissione e lo stoccaggio di energia elettrica che fonti rinnovabili non programmabili potrebbero richiedere;
- sistema di generazione ottimizzato e in grado di integrarsi con il sistema di dispacciamento (gli impianti, potendo destinare il biogas sia alla generazione di energia elettrica che di biometano, possono costituire un parco di produzione programmabile) (CIB, 2016).

Ulteriori vantaggi del biometano sono:

- la sua produzione rappresenta un corretto ciclo dei rifiuti, in quanto sfrutta come input, gli output di un altro processo;
- è un biocarburante avanzato, a basso impatto ambientale, già impiegabile nell'autotrazione a metano;
- è un prodotto locale;
- è un prodotto nazionale.

L'interesse per il settore del bio-CH₄ è in continua crescita, e con l'obiettivo di una maggiore efficienza dell'intera filiera è stato introdotto, dal professor Bruce Dale della Michigan State University, il concetto di "biogasdoneright" (letteralmente "biogas fatto bene"). L'idea è la realizzazione di un ciclo chiuso (Figura 2) che inizia dalla generazione di biogas a partire da prodotti e scarti agro-zootecnici, prosegue con l'upgrading del biogas per separare il biometano e sfrutta i sottoprodotti, ovvero il digestato come fertilizzante e l'anidride carbonica, per esempio, come fonte per la sintesi di bio-chemicals. In questo modo si integra alla normale attività agro-zootecnica la generazione di bio-energia, evitando la competizione con la produzione di alimenti e foraggi. I fondamenti del "biogasdoneright" sono: pratiche agricole efficienti e conservative e sostenibilità ambientale (riduzione emissioni di CO₂ e NH₃, efficienza nell'uso del suolo e dell'acqua, chiusura del ciclo di C nel suolo, miglioramento della fertilità del suolo); così facendo si incrementa anche il settore economico e sociale (nuovi posti di lavoro, valorizzazione dei

prodotti agricoli di qualità) e si sviluppa un'agricoltura sostenibile, multifunzionale e C-negativa (Bezzi, 2016).

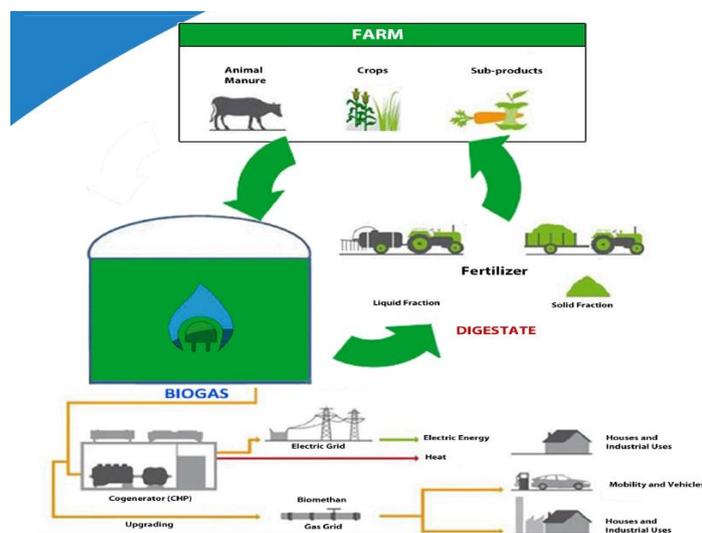


Figura 2: schema biogasdoneright. (Bezzi, 2016).

Il professor Bruce Dale descrive il concetto di “biogasdoneright”, come:

“Modern agriculture is based on large fossil energy inputs to produce a very limited range of outputs to serve a few markets. It is thus both inherently risky and unsustainable. Thus we need to produce much more energy, but not from fossil carbon resources. We must make energy production much more widespread and “democratic”. We must increase soil fertility and overall agricultural production without increasing agricultural inputs. We must produce much more food to provide for a growing human population while at the same time diversifying markets for agricultural products and attracting more investment in agriculture. We must take very large amounts of atmospheric carbon dioxide and sequester it long term. To say the least, this is a very challenging set of nested, interlinked challenges. The Biogasdoneright platform technologies meet all these needs and address all of these challenges. This article explains why and how. [...] Low-cost technologies that link sustainable agriculture with a sustainable planet” (Dale, 2015).

Infine, è importante tenere presente il ruolo fondamentale del biometano nel processo di decarbonizzazione, in quanto, a differenza dei combustibili fossili, evita di liberare il carbonio sequestrato nei giacimenti, e per questo motivo viene definito una fonte a “zero emissioni”.

Il contributo del biometano alla decarbonizzazione non si limita esclusivamente al momento del suo sfruttamento, ma al suo intero processo produttivo, poiché fornisce una serie di altri prodotti, sottoprodotti e servizi non energetici il cui sfruttamento comporta una riduzione delle emissioni climalteranti (CIB, 2016); più in particolare:

- il digestato ed il compost vengono sfruttati come materia organica ammendante, garantendo la fertilità del terreno agricolo e la sua capacità di trattenere gas climalteranti. Quindi il biogas attuato secondo i principi del “biogasdoneright” permette la restituzione di sostanza organica ai terreni (stoccaggio di CO₂ biogenica);
- l'utilizzo di sottoprodotti e scarti dei settori agroalimentare e forestale, rifiuti organici urbani e fanghi di depurazione delle acque reflue urbane, come substrato di partenza per la produzione di biometano, evita l'immissione in atmosfera di gas climalteranti che altrimenti si produrrebbero per fermentazione naturale di tale materia organica;
- l'impianto di produzione di biogas, in quanto tecnologia efficiente anche su piccola scala, rappresenta un'infrastruttura tecnologica nell'ambito di un'azienda agricola, essenziale per ridurre gli impatti dell'agricoltura in termini di emissioni di gas serra e di altro genere (lisciviazione di nutrienti verso i corpi idrici, effluenti zootecnici, ecc.) ed allo stesso tempo incrementare la competitività delle aziende agricole grazie, per esempio, alla riduzione dei costi di produzione (minor uso dei concimi chimici) e della riduzione dei costi di gestione degli effluenti zootecnici (Snam, 2016).

L'opportunità di impiegare il biometano come gas sostitutivo o integrativo nelle reti di trasporto e distribuzione nasce dall'attuazione delle Direttive europee 55/2003/CE e 28/2009/CE, che attribuiscono particolare importanza allo sfruttamento di gas prodotti da energie rinnovabili, attribuendo al biometano un ruolo importante nel contrasto ai cambiamenti climatici.

La nuova frontiera del bio-CH₄ è il biometano liquefatto (bio-LNG); tale settore sicuramente vedrà un ulteriore incremento visti i numerosi vantaggi del bio-LNG:

- può essere prodotto nel proprio Paese;

- grazie al modello “biogasdoneright”, il bio-LNG non compete con produzione agricola;
- ha una qualità migliore rispetto a quello da fonte fossile;
- per unità di energia, è più economico rispetto agli altri biocarburanti;
- ha minori emissioni rispetto a tutti gli altri biocarburanti;
- può essere usato con l’LNG (Liquefied Natural Gas) di fonte fossile per aumentarne la qualità.

1.4- Le microalghe

Nei paragrafi precedenti è stato descritto lo stato dell’arte del settore del biogas e biometano, che ha solide basi nel mercato europeo e mondiale, nonostante ciò è oggetto di continui studi e sperimentazioni volte a migliorare l’efficienza dell’intera catena produttiva.

Il progetto GoBioM ne è un esempio, in quanto uno degli obiettivi è valorizzare l’anidride carbonica separata nel processo di upgrading del biogas a biometano, sfruttandola nella coltivazione microalgale.

Le microalghe hanno generato interesse come potenziali fonti alternative per la produzione di biodiesel a partire dai lipidi contenuti nella biomassa algale. A tale scopo sono stati sviluppati sistemi di coltivazione, tecniche di estrazione e trasformazione dei lipidi. Tuttavia, al giorno d’oggi non esiste una modalità di sintesi di biodiesel economicamente sostenibile.

Invece, in altri settori (nutraceutica, farmaceutica, ecc) le microalghe e i composti estratti da esse, hanno svariate applicazioni e sono commercializzate in tutto il mondo.

1.4.1- Fasi di crescita delle microalghe

Le microalghe, come le altre colture unicellulari, presentano una curva di crescita caratteristica quando vengono coltivate in condizioni batch, ed è possibile distinguere quattro fasi, rappresentate nel grafico in Figura 3. Il primo è uno stadio di latenza (o fase lag) in cui le microalghe si devono adattare alle nuove condizioni, in particolare all’intensità luminosa; nonostante la crescita lenta si ha un rapido consumo di nutrienti.

È seguita dalla fase logaritmica, in cui la concentrazione della biomassa aumenta in modo esponenziale grazie alla disponibilità di nutrienti e alle condizioni non limitanti; si misura, infatti, la velocità di crescita massima.

Successivamente, a causa del progressivo esaurimento dei nutrienti, le cellule sospendono il processo di divisione. Inizia quindi la fase stazionaria dove la velocità di crescita rallenta gradualmente, quindi il tasso di cellule nate coincide con quello di cellule morte, corrispondente, nel grafico, alla linea parallela all'asse delle ascisse. Nel momento in cui i nutrienti sono esauriti e le condizioni non sono più ottimali per lo sviluppo, le cellule interrompono la divisione e si conclude il ciclo con la fase di morte, per lisi cellulare.

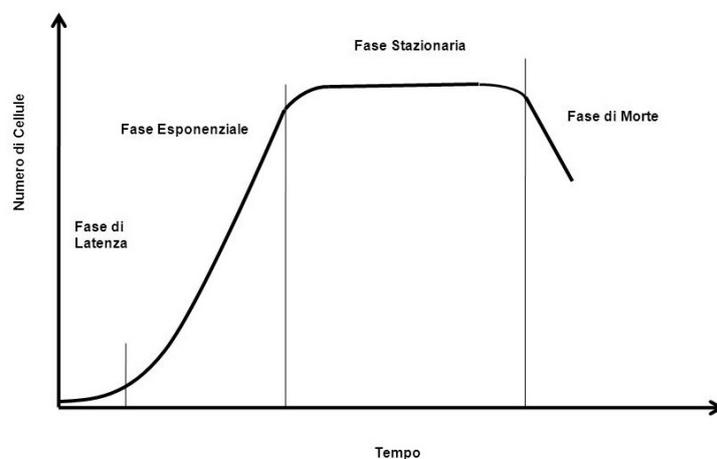


Figura 3: curva di crescita. (Fonte <http://slideplayer.it/slide/3225732/>)

I fattori ambientali fondamentali per la crescita microalgale sono la luce (naturale o artificiale), l'anidride carbonica e il terreno di coltura ideale per lo sviluppo, una soluzione acquosa con i nutrienti come azoto, fosforo, potassio e ferro, in concentrazioni ottimali e caratteristiche per ogni specie.

Gli altri parametri che influenzano la crescita della biomassa algale e che quindi devono essere opportunamente regolati sono: ossigeno, temperatura, pH, intensità luminosa, salinità, assenza di sostanze tossiche e di organismi patogeni (batteri, funghi, virus).

Infine, è importante garantire il mescolamento, per evitare sedimentazione e adesione delle cellule alle pareti dei sistemi di coltivazione; il modo più pratico è insufflare aria, così da mantenere in movimento la coltura.

Nella produzione di biomassa microalgale è importante sapere a che stadio è la coltura, per evitare che arrivi alla morte e perché in fase stazionaria si raccoglie un'aliquota del volume totale per estrarne le microalghe.

Le microalghe sono microrganismi fotosintetici, procarioti o eucarioti, che grazie alla loro semplice struttura multicellulare o unicellulare, possono crescere molto rapidamente; sono infatti importanti produttori primari in ambienti marini e d'acqua dolce. In generale, contengono tra il 30-60% di proteine, il 5-20% di carboidrati e il 10-50% di lipidi in peso secco (Fernandez-Reiriz et al., 1989) (Paul et al., 2009). La composizione chimica è caratteristica per ogni specie e varia in funzione della disponibilità dei nutrienti, dell'intensità luminosa e del periodo di esposizione.

Proprio per l'alto contenuto proteico e vitaminico (A, B, C, D, E, K e B12) e per l'elevata quantità di acidi grassi polinsaturi (Highly Unsaturated Fatty Acids, HUFAs) la coltivazione di microalghe è diventata un'attività di grande importanza economica per la produzione di biomassa, dalla quale sono stati isolati e strutturalmente determinati più di 35000 nuovi prodotti naturali, (Fenical, 2006): acidi grassi, steroli, composti fenolici, terpeni, enzimi, polisaccaridi, alcaloidi, tossine e pigmenti (Pasquet et al., 2011).

I prodotti bioattivi, quali antivirali, antifungini, antibatterici (Desbois, 2008), enzimi inibitori, tossine (Borowitzka, 1995) e carotenoidi antiossidanti (e.g. Haematococcus per astaxantina, Dunaliella per β -carotene), vengono sfruttati in svariati settori: alimentare (come integratori e additivi), medico, farmaceutico, nutraceutico e cosmetico (Pulz & Gross, 2004) (Spolaore et al., 2006).

1.5- *Phaeodactylum tricornerutum*

Phaeodactylum tricornerutum prende il nome Bohlin da colui che la descrisse per la prima volta nel 1897.

Phylum: Chrysophyta

Classe: Bacillariophyceae

Ordine: Bacillariales (Hendey, 1937)

Subordine: Phaeodactylinae.

Famiglia: Phaeodactylaceae. L'unica famiglia del subordine.

La tassonomia di *Phaeodactylum tricornerutum*.

Genere: *Phaeodactylum* (Bohlin, 1897). L'unico genere.

Specie: *P. tricornutum*. L'unica specie nota. (Lewin, 1958)

Phaeodactylum tricornutum è una diatomea marina unicellulare (Bitaubé Pérez et al., 2008). Le diatomee contribuiscono al 25% della produzione primaria globale, e la popolazione è la più ampia tra le microalghe marine; all'interno delle specie fitoplanctoniche eucariote, sono responsabili del 40% della produzione primaria marina. Contengono clorofilla-a e clorofilla-c, inoltre presentano pigmenti accessori, quali il β -carotene e le tre xantofille (fucoxantina, diatoxantina e diadinoxantina), che conferiscono il colore bruno-dorato caratteristico di questa classe (Parsons et al., 1961) (Haug et al., 1973). Nonostante la loro abbondanza e diversità, sono poche le specie coltivate per l'acquacoltura o per ricavare prodotti ad alto valore aggiunto (Benavides et al., 2013).



Figura 4: *Phaeodactylum tricornutum*. (Fonte: Micoperi Blue Growth, <http://www.micoperibg.eu/?project=phaeodactylum-tricornutum>)

P. tricornutum può esistere in diversi morfotipi (fusiforme, triradiata e ovale) e la forma delle cellule cambia in funzione degli stimoli ambientali (De Martino et al., 2007). *P. tricornutum*, insieme a *Thalassiosira pseudonana*, è una delle specie di diatomee per cui è stata determinata la sequenza del genoma, e viene utilizzata come modello di studio.

Per quanto riguarda i prodotti di interesse che è possibile estrarre da *Phaeodactylum tricornutum*, è stato dimostrato che essa è in grado di accumulare fino al 30-45% di acidi grassi polinsaturi (PolyUnsaturated Fatty Acids, PUFAs) di cui il 40% costituito da acido eicosapentaenoico (Eicosapentanoic Acid, EPA) (Pérez-Lòpez et al., 2014); quest'ultimo è sfruttato nei settori dell'alimentazione umana e dell'acquacoltura (Chriamatha &

Borowitzka, 1994) (Lebeau & Robert, 2003), e in studi recenti ha mostrato effetti antibatterici (Desbois et al., 2008), insieme ad altri composti estratti (Duff et al., 1966) (Cooper et al., 1985) (Kellam & Walker, 1989). È cresciuto l'interesse nei confronti dei PUFAs per la loro efficacia nel ridurre il rischio e gli effetti di alcune malattie come l'aritmia (Leaf, 2003), l'arteriosclerosi (Thies, 2003), problemi cardiovascolari (Kinsella et al., 1990), infiammazione (Calder, 2006) e patologie psichiatriche (Ross et al., 2007).

La fucoxantina è un'altra sostanza ricavata da *P. tricornutum* per le sue diverse funzioni terapeutiche, anti-tumorale, anti-infiammatoria, antiipertensiva e inoltre riduce gli effetti dell'obesità (Sachindra et al., 2007) (Maeda et al., 2005). Tuttavia la produzione di questo pigmento a livello industriale, è focalizzata sulle macroalghe.

P. tricornutum è pratica e conveniente da coltivare, per la produzione di grandi quantità di biomassa, perché è una specie molto competitiva, eccetto nei confronti di *Monas (Ehrenberg) Stein*, un'altra microalga. Infine è una potenziale risorsa per la produzione di biodiesel in quanto, come altre diatomee (Chisti, 2010) (Mata et al., 2010), è una materia prima a zero emissioni (Zedejas et al., 2012) (Cheng et al., 2006). Studi precedenti hanno dimostrato la potenzialità delle microalghe come fonte energetica, migliore rispetto alle piante terrestri, grazie all'elevato contenuto lipidico e alla capacità di convertire l'energia solare in biomassa organica utilizzabile. Il problema della produzione di biocombustibile dalle microalghe è l'elevato carico di nutrienti necessario alla loro crescita, e l'energia per la raccolta e l'elaborazione, che diventa quindi non sostenibile dal punto di vista economico. Per questo motivo, l'interesse è incentrato sull'estrazione di composti ad alto valore aggiunto.

1.6- La coltivazione microalgale

I protocolli per la produzione di biomassa algale sono numerosi e si differenziano per i sistemi impiegati, le loro dimensioni, i parametri chimico-fisici e per la composizione dei terreni di coltura.

La coltivazione di biomassa algale può essere effettuata "indoor", quindi all'interno di un edificio, utilizzando luce artificiale, o "outdoor", cioè all'aperto e sfruttando la luce solare, evitando così il costo relativo all'illuminazione.

Le tipologie di sistemi utilizzati sono due, vasche aperte (Figura 5) e fotobioreattori (Figura 6).

I sistemi aperti (vasche) sono quelli che utilizzano come ambiente di coltura grandi vasche, stagni, canali, unità a circolazione di acqua bassa in forma di pannelli o di circuiti costituiti da tubi in policarbonato a circolazione forzata.

I sistemi chiusi (fotobioreattori, PBR), generalmente indoor, utilizzano come ambiente di coltura grandi bustoni di polietilene o fotobioreattori, cilindrici, elicoidali anulari ed a pannello, ai quali viene fornita energia radiante in semi-continuo al fine di massimizzare la crescita algale (Tredici, 2004).



Figura 5: vasche aperte, (in inglese open ponds). (Fonte: <https://it.pinterest.com/MARGEnergyinc/raceway-pond-bioreactors/>)



Figura 6: fotobioreattori (in inglese photobioreactor, PBR). (Fonte: <https://scubla.it/it/prodotti/progettazione-costruzione-impianti/fotobioreattori-e-microalghe-detail.html>)

Nonostante che nelle vasche sia difficile mantenere le temperature adatte alla crescita, soprattutto d'estate, in alcuni casi, esse sono preferibili per la produzione su scala industriale, poiché i costi sono minori rispetto a quelli che si avrebbero con i fotobioreattori (in particolare per illuminazione e riscaldamento/raffreddamento). D'altra parte però, quest'ultimi sono decisamente più efficienti nella regolazione della temperatura ed assicurano colture monoalgali e prive di contaminanti e garantiscono una produzione di biomassa algale a ciclo continuo.

Da alcuni studi è emerso che la produttività è maggiore nei fotobioreattori rispetto alle vasche grazie ad un migliore controllo dell'intensità luminosa e della temperatura. Inoltre, mantenere la temperatura ideale garantisce un maggiore contenuto lipidico (Silva Benavides et al., 2013).

Per ricavare prodotti ad alto valore aggiunto, acidi grassi polinsaturi o lipidi per la produzione di biodiesel, è fondamentale mantenere le condizioni di crescita ottimali, in particolare la temperatura e la luce.

In Tabella 2 sono messi a confronto sistemi aperti e chiusi, sulla base dei parametri fondamentali da considerare nella scelta del sistema di coltivazione. Altri fattori di cui tener conto sono: volume della coltura, esigenze e caratteristiche della specie, temperatura, consumo energetico, manutenzione necessaria, quantità e qualità del prodotto che si vuole ottenere.

Tabella 2: confronto sistemi aperti e chiusi (*Ghasemi et al., 2012*).

	Vasche aperte	Fotobioreattori
Rischi di contaminazione	Alta	Bassa
Perdite di CO ₂	Alta	Bassa
Perdite per evaporazione	Alta	Bassa
Efficienza fotosintetica	Bassa	Alta
Rapporto area/volume	Bassa	Alta
Area necessaria	Alta	Bassa
Controllo del processo	Difficile	Facile
Produttività di biomassa	Bassa	Alta
Costi di investimento	Bassa	Alta
Costi operativi	Bassa	Alta
Costi per la separazione	Alta	Bassa
Scale-up	Facile	Difficile

Di fotobioreattori ne esistono varie tipologie, che si differenziano per materiale di costruzione (vetro, lastre di plastica rigida, film plastici flessibili), orientamento, inclinazione, sistema di agitazione (Tredici, 2004).

In generale, non sono altro che contenitori stagni e isolati dall'ambiente esterno nei quali vengono inoculate le cellule algali sospese in un terreno di coltura sintetico a matrice liquida del quale vengono controllati tutti i parametri utili alla crescita algale quali luce, temperatura, micro e macro nutrienti, ecc (Di Martino & Stancaneili, 2015).

Nel caso di *Phaeodactylum tricorutum*, la coltivazione è possibile solo nei fotobioreattori, in quanto la temperatura deve essere mantenuta tra i 20-25° C (Molina Grima et al., 1996), e nelle vasche sarebbe eccessivamente costoso e non pratico (Sánchez Miròn et al., 2003).

Generalmente il processo di coltivazione delle microalghe si basa su un sistema scaling up, ovvero vengono fatte crescere in volumi sempre maggiori, per far sì che le colonie continuino a crescere. Si comincia in laboratorio, isolando al microscopio le singole cellule e trasferendole in pozzetti di pochi mL, successivamente si passa alle beute, ai “bottiglioni”. In seguito, viene fatto l'inoculo in un fotobioreattore e si effettuano diluizioni successive per favorire la riproduzione delle cellule; nel momento in cui viene raggiunto l'inizio della fase esponenziale, si preleva quindi una parte della coltura per immetterla in vasche aperte di dimensioni crescenti. Il volume prelevato viene compensato con l'aggiunta di acqua e nutrienti, per riattivare la crescita. Si predilige questo passaggio di volumi per monitorare meglio tutte le fasi e per evitare che le cellule muoiano.

Effettuare l'inoculo direttamente nelle vasche o nei fotobioreattori non è possibile, perché le cellule sarebbero esposte ad un forte stress, dovuto al repentino cambiamento di condizioni rispetto a quelle in cui si sono sviluppate in laboratorio, provocandone la morte o un rallentamento della crescita.

I prodotti ad alto valore aggiunto che si possono ricavare dalle microalghe sono svariati e hanno applicazioni in diversi settori, dall'acquacoltura alla farmaceutica e nutraceutica.

L'interesse per la coltivazione microalgale è in continua crescita per:

- l'elevata attività fotosintetica e l'adattabilità ai fattori ambientali, che determinano versatili condizioni di crescita;

- la composizione chimica delle microalghe, condizionata dal mezzo di crescita e dall'ambiente;
- la possibilità di manipolare le condizioni di coltura e modificare i prodotti algali secondo le specifiche esigenze.

1.7- Fotobioreattori

L'obiettivo della ricerca in questo campo è convertire i sistemi su piccola scala in impianti a produzione industriale, mantenendo lo stesso rendimento e raggiungendo un buon rapporto costi/benefici.

I fotobioreattori, a differenza delle vasche aperte, permettono un controllo totale su tutti i parametri (pH, temperatura, miscelazione, CO₂, O₂) di crescita delle colture e sono adattabili alle caratteristiche fisiologiche della specie. Un aspetto importante da tenere in considerazione è il rimescolamento della soluzione contenente i nutrienti e le cellule microalgali, che generalmente viene effettuato per insufflazione di aria arricchita in CO₂. È evidente che un PBR per essere efficiente deve anche essere di semplice realizzazione e deve garantire bassi costi di impianto e manutenzione (Tredici, 2006). I principali problemi dei fotobioreattori sono legati alla necessità di garantire un sistema di riscaldamento/raffrescamento che impedisca la morte delle cellule e un dispositivo che elimini l'eventuale eccesso di O₂ derivante dalla fotosintesi.

Sono state sviluppate quattro tipologie principali di fotobioreattori, presentati qui di seguito.

1.7.1- Fotobioreattori a piastre

I fotobioreattori a piastre (o flat plate) sono costituiti da una serie di piastre ravvicinate, così da ottenere un'alta efficienza di sfruttamento della luce solare e un elevato rapporto superficie/volume. Il vantaggio più rilevante è dato dalla possibilità di realizzare uno scambio tra i gas insufflati e la soluzione di coltura verso l'esterno, garantendo così un basso accumulo di O₂ nel sistema; d'altra parte, però, questa soluzione va ad inficiare l'impermeabilità alle contaminazioni esterne. Un ulteriore vantaggio è la possibilità di sfruttare al massimo la radiazione solare semplicemente inclinando in maniera opportuna le piastre (Tredici & Chini Zittelli, 1998) (Zhang et al., 2001). La temperatura viene

mantenuta ai valori ottimali, nebulizzando acqua corrente sulle pareti delle piastre; questa, evaporando, fa sì che la temperatura resti costante.

1.7.2- Fotobioreattori elicoidali

Questa tipologia di PBR è costituita da un tubo di materiale sintetico avvolto a spirale in modo da massimizzare la superficie esposta alla luce. È necessaria, però, una lampada aggiuntiva all'interno delle spire, per avere un'illuminazione completa della coltura. Lo scambio tra gas e soluzione avviene tramite una pompa a centrifuga, in alternativa è possibile utilizzarne una ad aria (air-lift) per evitare danneggiamenti alle cellule (Carvalho et al., 2006). La struttura ad elica, a parità di volume, genera un limitato ingombro, e grazie all'alto rapporto superficie/volume, è uno dei sistemi che fornisce i risultati migliori.

1.7.3- Fotobioreattori a tubo verticale

I fotobioreattori a tubo verticale (o air lift) sono realizzati in materiale trasparente a basso indice di rifrazione, come vetro e polietilene di alta qualità così da far penetrare tutta la radiazione luminosa incidente. In questo tipo di sistema, l'aria arricchita in CO₂ viene insufflata dal fondo della colonna, permettendo il mescolamento, l'alimentazione di CO₂ e il movimento dell'ossigeno verso la parte alta del tubo, da dove poi viene eliminato. Per questi PBR, vengono comunemente utilizzati sacchi di polietilene, per limitare i costi e per garantire trasparenza e sterilità. La temperatura è mantenuta costante mediante la circolazione di un liquido refrigerante nell'intercapedine di cui sono dotati i sacchi stessi. La luce, invece, viene fornita dall'interno con opportune sorgenti luminose stagne e sterili. Nel caso di reattori rigidi, viene calcolato il diametro in modo da avere un volume di coltura sufficiente a garantire un corretto scambio tra gas e liquido.

1.7.4- Fotobioreattori a tubi orizzontali

Questi fotobioreattori sono caratterizzati da una batteria di tubi disposti in serie e parallelamente al suolo. Sono adatti per le coltivazioni di grandi volumi e sono idealmente immuni da contaminazioni dell'ambiente esterno. Tuttavia le colonne (come anche nei sistemi precedenti) vanno pulite periodicamente, per eliminare le cellule che aderiscono alle pareti, limitando il passaggio della radiazione luminosa. Il rimescolamento è garantito

da una pompa a diaframma e lo scambio gas-liquido avviene in corrispondenza delle connessioni tra i tubi (Di Martino & Stancaneili, 2015). I problemi di questo sistema sono il costo elevato, la fragilità dei tubi e il controllo della temperatura, quest'ultimo risolto mediante spray di acqua.

1.8- Life Cycle Assessment (LCA)

Il Life Cycle Assessment (LCA), definito dalla norma UNI EN ISO 14040 (ISO, 2006) come: “compilazione e valutazione attraverso tutto il ciclo di vita dei flussi in entrata e in uscita, nonché i potenziali impatti ambientali, di un sistema di prodotto” è, attualmente, l'approccio più utilizzato per la valutazione degli impatti ambientali di un prodotto.

La LCA fa parte degli strumenti Life Cycle Thinking (LCT), metodi che considerano gli impatti ambientali lungo tutto il ciclo di vita di un prodotto, servizio o processo, quindi dall'estrazione delle materie prime al fine vita.

In Europa, si comincia ad inserire l'analisi del ciclo di vita nelle politiche comunitarie nel 2001, con la pubblicazione da parte della commissione europea del Green Paper on Integrated Product Policy (European Commission).

Nel 2005 il Joint Research Centre pubblica il ILCD Handbook, ovvero delle linee guida per l'applicazione dell'approccio LCA.

L'UE ha promosso l'analisi del ciclo di vita all'interno della Politica Integrata dei Prodotti (IPP), che ha un ruolo essenziale nella strategia comunitaria per lo sviluppo sostenibile. La politica ambientale europea mira a far sì che il miglioramento ambientale vada di pari passo con il perfezionamento delle prestazioni dei prodotti e che allo stesso tempo favorisca la competitività dell'industria a lungo termine (ISPRA).

Il metodo LCA è un processo iterativo strutturato in quattro fasi:

- fase 1: definizione dell'obiettivo e del campo di applicazione;
- fase 2: inventario;
- fase 3: valutazione degli impatti;
- fase 4: interpretazione dei risultati.

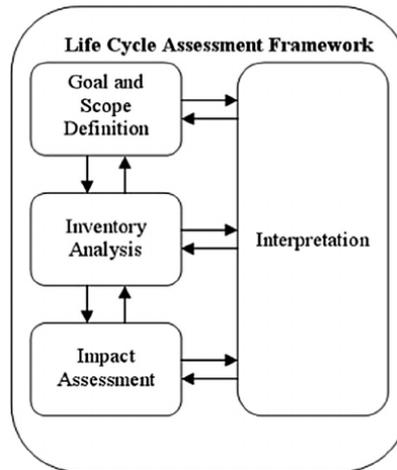


Figura 7: Schema Life Cycle Assessment (LCA).

Nella prima fase si definisce la motivazione per cui si necessita di uno studio LCA, ad esempio, ricerca e sviluppo, eco-design, green marketing (Ecolabel, GPP, EPD, ecc.), benchmarking (confronto con un prodotto di riferimento) o miglioramento del sistema di gestione dell'azienda.

Inoltre, si deve indicare chi ha commissionato lo studio e se i risultati ottenuti saranno resi pubblici o sfruttati per uso interno all'azienda.

La definizione del campo di applicazione consiste nel costruire un modello del sistema in esame, definirne i confini, quindi le unità di processo e i flussi di input e output da considerare.

Sulla base di una descrizione meticolosa del sistema, si definiscono i confini e si applica uno dei seguenti approcci:

- “from cradle to grave”: letteralmente “dalla culla alla tomba”, quindi si esamina l'intero ciclo di vita di un prodotto, dall'estrazione delle materie prime fino allo smaltimento. Quindi, in genere, si applica per analisi comparative tra prodotti diversi che forniscono lo stesso servizio;
- “from cradle to gate”: considera il prelievo delle materie prime e il processo produttivo. Solitamente è utilizzato per confrontare lo stesso tipo di bene, ma che è stato realizzato con processi e materie prime differenti;
- “gate to gate”: prende in considerazione solo le fasi produttive. Questo tipo di approccio è utile per confrontare processi diversi, che utilizzano le stesse materie prime, infatti non comprende la fase di estrazione.

Infine, un ulteriore approccio è quello detto “zero burden”, che non considera gli impatti relativi alla produzione del bene; è tipicamente applicato ai rifiuti, nel momento in cui un prodotto assume tale accezione. Per esempio, se si vogliono confrontare diverse modalità di trattamento e smaltimento di rifiuti, la modalità di produzione non è rilevante.

La comparabilità è garantita dalla definizione della stessa unità funzionale (UF), cioè una quantità finita che rappresenti il servizio fornito dal sistema di prodotto, per esprimere i dati e quindi i risultati nella medesima “unità di misura”.

L’analisi di inventario consiste nella raccolta ed elaborazione dei dati per riferirli all’unità funzionale. Per questa fase si prediligono i dati specifici del sistema (dati primari), cioè forniti direttamente dalle aziende coinvolte, nel caso in cui non siano disponibili si ricorre a fonti alternative, quali: banche dati dei software per LCA (dati secondari), medie e statistiche nazionali o letteratura scientifica (dati terziari).

La fase di inventario è la più onerosa e copre la maggior parte del tempo necessario all’intero studio, poiché le informazioni da ricavare sono molte e non sempre facili da ottenere. Infatti, per ridurre la mole di dati da gestire, si definiscono i criteri di cut-off, regole che permettono di omettere flussi irrilevanti dal punto di vista della massa, dell’energia o della significatività ambientale. Quindi si considerano, per esempio, solo i flussi che contribuiscono al 98% in massa, mentre il restante 2% viene trascurato perché non comporta un danno ambientale significativo.

L’analisi di inventario si conclude con l’allocazione, ossia l’attribuzione dei flussi ai vari prodotti e sottoprodotti, poiché solitamente i processi industriali hanno più di un prodotto. La norma ISO 14040 stabilisce di evitare la ripartizione dei flussi, quando possibile, altrimenti prediligere l’allocazione fisica a quella economica.

L’obiettivo della terza fase (Life Cycle Impact Assessment) è la valutazione dei potenziali impatti ambientali, a partire dai dati di inventario. Si individuano i fattori di stress specifici del sistema in esame (es: emissioni di CO₂, CH₄, CFC, NO_x, SO_x, ecc.) e si classificano nelle categorie d’impatto sulle quali influiscono (es: riscaldamento globale, acidificazione, assottigliamento dello strato di ozono, ecc.). Per la caratterizzazione si calcola, per ogni categoria d’impatto, l’Impact Score (IS), che è dato dalla sommatoria dei prodotti tra la massa della sostanza inquinante (m) e il fattore di caratterizzazione (CF), specifico per ogni categoria e sostanza.

$$IS = \Sigma (m_i \times CF_i)$$

Il fattore di caratterizzazione serve a convertire i contributi delle diverse emissioni in un'unica sostanza di riferimento, ad esempio per la categoria Global Warming, il CF è espresso in tonnellate di CO_{2eq}.

Quindi da uno studio si ottengono più valori, rappresentativi delle categorie d'impatto scelte, che costituiscono il cosiddetto profilo ambientale, rappresentato generalmente da un istogramma.

La classificazione e caratterizzazione sono fasi obbligatorie della valutazione degli impatti, invece normalizzazione e ponderazione sono facoltative, in quanto non ci sono ancora indicazioni precise e ufficiali su come applicarle, né solide basi scientifiche. La normalizzazione è importante per comprendere meglio i risultati, e attribuire una magnitudo rispetto ad un riferimento (A_i), oltre ad essere propedeutica alla fase di ponderazione. Si effettua moltiplicando l'Impact Score (IS_i) per il riferimento adatto (A_i):

$$N_i = IS_i \times A_i,$$

La norma ISO 14044 propone alcune tipologie di riferimenti:

- Impact Score totali di una data area geografica (che può essere globale, regionale o nazionale);
- Impact Score di una data area geografica su base pro-capite o di sistemi prodotto simili;
- Impact Score di uno scenario di base, per esempio un'alternativa del sistema prodotto studiato;
- Impact Score di una situazione target futura.

La ponderazione consiste nell'assegnazione di pesi alle categorie d'impatto considerate, sulla base della loro importanza relativa, e moltiplicando i valori normalizzati per i pesi.

La norma ISO 14044 non fornisce indicazioni per la ponderazione, e afferma che non deve essere utilizzata in studi che saranno resi pubblici e sfruttati per dichiarazioni comparative.

Invece, il metodo CML propone tre modalità:

- metodi basati su valori monetari;
- metodi basati su standard od obiettivi governativi;

- metodi basati sul giudizio di un panel di esperti.

Nelle linee guida viene consigliato di applicare più metodi di ponderazione e non un valore unico, ma un range di valori, per osservare come variano i risultati.

Infine, nella fase di interpretazione dei risultati si verifica il raggiungimento dell'obiettivo dello studio e il rispetto delle assunzioni fatte, dei confini del sistema e dell'unità funzionale stabilita. I risultati sono analizzati sulla base delle assunzioni fatte e alla luce di accuratezza, precisione e completezza raggiunte. Quindi si effettua il controllo di completezza (considerando la copertura ottenuta grazie ai dati primari, secondari e stimati, quindi di scarsa qualità) e di coerenza, si applica sia al caso analizzato, sia tra sistemi messi a confronto e consiste nel verificare se i presupposti, i metodi e i dati sono stati applicati in modo coerente in tutto lo studio.

Si identificano i contributi principali: le fasi del ciclo di vita più rilevanti, i processi fondamentali, i flussi elementari e le categorie di impatto più significativamente colpite. Quindi si individuano le scelte metodologiche (cut-off applicati, confini definiti, modellazioni effettuate), assunzioni, utilizzo di alcuni dati invece di altri, metodo di LCIA applicato, processi di normalizzazione e ponderazione effettuati. Tutto ciò proprio perché l'analisi del ciclo di vita è un metodo iterativo, quindi si ripercorrono tutte le fasi e si modificano le scelte effettuate, per produrre scenari diversi e vedere come cambiano i valori.

Sulla base dei risultati ottenuti con i vari scenari, si elaborano le conclusioni e le raccomandazioni, al fine di migliorare il modello elaborato e soddisfare le esigenze derivanti dagli obiettivi dello studio (ISO 14044, 2006) (ILCD handbook, 2010).

1.8.1- LCA sulla coltivazione microalgale

Gli studi LCA sulla coltivazione microalgale presenti in letteratura, riguardano soprattutto sistemi finalizzati alla produzione di biodiesel (Faried et al., 2017), mentre soltanto una parte marginale è incentrata sull'estrazione di composti bioattivi. Ad esempio, nello studio (Carneiro et al., 2017) è stata condotta un'analisi comparativa tra combustibili fossili, bioetanolo da colture agricole e biodiesel prodotto da microalghe. Gli impatti sono stati stimati sulla base di GWP, efficienza energetica ed uso del suolo. In questo modo è stato stimato il contributo dei biocarburanti alla mitigazione dei cambiamenti climatici, la loro

efficienza energetica e la competitività con la catena di produzione di beni alimentari. I risultati evidenziano che il biodiesel derivato dalle microalghe è l'alternativa più efficiente in termini di utilizzo del suolo rispetto ad altri biocarburanti, poiché non compete con le colture alimentari. Alcune modalità di produzione di biodiesel favoriscono una riduzione sostanziale delle emissioni ad effetto serra, altri invece hanno una performance peggiore del diesel prodotto da fonti fossili. Tuttavia, dal punto di vista energetico i biocarburanti prodotti grazie alle microalghe non possono competere con gli altri biocombustibili né con i combustibili fossili, in quanto l'energia ricavata è inferiore a quella necessaria per la loro coltivazione. Inoltre, non ci sono ancora tecnologie mature ed efficienti per la produzione di biodiesel da microalghe. Una pubblicazione riporta diversi studi LCA condotti sulla coltivazione di microalghe per la produzione di biodiesel e li confronta mostrando come l'applicazione del metodo LCA possa differire sotto alcuni aspetti (Collotta et al., 2016).

Un'altra recente pubblicazione riguarda un'analisi comparativa del ciclo di vita di coltivazione microalgale in vasche aperte e fotobioreattori tubolari a scala pilota, con lo scopo di individuare il sistema più sostenibile per la produzione di biomassa. Inoltre, le sperimentazioni sono state ripetute in stagioni diverse, per individuare gli effetti di condizioni ambientali differenti. I risultati hanno evidenziato che un impatto ambientale rilevante è dovuto al consumo energetico per la regolazione della temperatura. Un altro contributo considerevole è dovuto alla produzione di nutrienti. Inoltre, è emerso che le condizioni meteorologiche e la disponibilità di sorgenti per la regolazione della temperatura sono fattori determinanti per la selezione della localizzazione geografica e del sistema di coltivazione microalgale (Pérez-López et al., 2017).

L'utilizzo delle microalghe come fonte di proteine e di composti bioattivi ha applicazioni in diversi settori del mercato, ed è di gran lunga più sostenibile della produzione di biodiesel. Di recente è stato pubblicato uno studio sulla valutazione del ciclo di vita della coltivazione su scala industriale di *Chlorella vulgaris* e *Arthrospira platensis*, con successivi trattamenti della biomassa prodotta, per ricavarne prodotti commercializzabili nel settore alimentare. I risultati sono stati confrontati con i concentrati di proteine tradizionali, ed hanno mostrato un impatto maggiore per quelle ricavate dalle microalghe. Tuttavia, le proteine estratte dalla biomassa algale risultano più sostenibili dal punto di vista ambientale rispetto alla carne suina e di manzo (Smetana et al., 2017).

Phaeodactylum tricornutum è stata oggetto di una valutazione di ciclo di vita il cui scopo era determinare gli impatti ambientali del processo di coltivazione di tale specie e di estrazione dell'acido eicosapentaenoico e migliorarne il profilo ambientale. I risultati evidenziano che, a scala di laboratorio, i maggiori impatti sono dovuti al consumo energetico e alla sintesi dell'agente estraente, mentre a scala pilota (in fotobioreattore) i contributi principali sono la produzione della fonte di azoto, il trasporto e il fabbisogno elettrico. Inoltre, sono state proposte alcune alternative per ridurre gli impatti ambientali: cambiare l'agente estraente, utilizzare fertilizzanti a base d'azoto, valorizzare il residuo algale come ammendante nel terreno o come materia prima per la generazione di energia da digestione anaerobica (Pérez-López et al., 2014a).

2- Materiali e metodi

2.1- Il software GaBi 8.0

GaBi (prodotto da thinkstep) è uno dei software per la valutazione del ciclo di vita (LCA) ed ha applicazioni in diversi ambiti (thinkstep):

- eco-design: progettazione di prodotti con una minore impronta ambientale in termini di emissioni, riduzione di rifiuti e di consumo idrico;
- efficienza della catena produttiva: riduzione del consumo di energia, materiali e risorse, così da diminuire anche i costi di produzione, migliorare l'efficienza di progettazione, produzione, rifornimento e distribuzione;
- ottenimento di etichette ambientali, EPD, PEF;
- valutazione di carbon e water footprint;
- progettazione ed ottimizzazione del prodotto e del processo, per una riduzione dei costi di produzione;
- report ambientali e di sostenibilità.

I software LCA sono dotati di ampi dataset, molto utili soprattutto nel momento in cui si vuole inserire nel proprio modello un processo di cui però non si conoscono tutte le caratteristiche, quindi è sufficiente ricercare all'interno del database, tra i processi già caratterizzati e descritti nel dettaglio, quello più adatto al sistema in analisi. La banca dati di GaBi è facilmente accessibile e costantemente aggiornata, dettaglia costi, impatto ambientale ed energetico di estrazione e raffinazione di ogni singola materia prima, componente od elemento di manifattura (thinkstep).

GaBi permette di realizzare un modello sia utilizzando i processi e i flussi già presenti nelle diverse banche dati (GaBi Professional Database e Ecoinvent v.2 Database), sia creandone di nuovi, specifici per il ciclo di vita in esame. Inoltre, analizza gli impatti ambientali fornendo alternative per la fase di fabbricazione, distribuzione, riciclabilità, inquinamento e sostenibilità (thinkstep).

In questo studio è stato utilizzato il software GaBi per modellare il processo di coltivazione indoor di *P. tricornutum* in un fotobioreattore, dettagliato in tutte le sue fasi e flussi di input e output. Una volta completato il modello, il programma consente di calcolare sia gli

impatti ambientali complessivi, sia quelli relativi ad ogni fase della produzione, in funzione delle categorie d'impatto selezionate; in questo modo, è possibile individuare i processi maggiormente impattanti. I contributi di ogni fase vengono rappresentati in un istogramma: sulle ascisse sono riportate le categorie d'impatto e sulle ordinate la scala percentuale.

2.2- Il ruolo di Micoperi Blue Growth (MBG)

Micoperi è un'azienda che opera nel settore offshore petrolifero da più di 70 anni (Micoperi).

Nel 2014 nasce la start-up Micoperi Blue Growth (MBG) con lo scopo di inserirsi nel settore della ricerca delle biotecnologie e dello sviluppo e commercializzazione di prodotti naturali estratti da microalghe. L'azienda quindi mira allo sviluppo di sistemi di coltivazione e raccolta ad hoc per la produzione di biomassa algale su larga scala (t/anno), con elevati standard qualitativi e ottimizzazione delle modalità di estrazione dei composti attivi. A tale scopo MBG collabora con diversi enti e aziende nel campo delle biotecnologie: Micoperi, Università di Bologna, SWITH, Valagro, CNR e Proambiente.

L'azienda MBG è dotata di un'area di ricerca con laboratori biologici e chimici e una produttiva con strumenti e tecnologie di nuova generazione per sostenere la coltivazione di microalghe su larga scala.

All'interno di tale struttura sono stati costruiti sistemi specie-specifici per la produzione, la raccolta e la lavorazione della biomassa algale. In questo modo è possibile seguire tutto il sistema produttivo, garantire una raccolta a ciclo continuo e una produzione di microalghe con costi sostenibili, assicurando la tracciabilità e l'elevata qualità del processo.

Micoperi Blue Growth sfrutta come sistemi di coltivazione sia vasche aperte poco profonde con rimescolamento sia fotobioreattori di diverse dimensioni.

La banca algale contiene colture di diverse specie fra cui (MBG, 2014): *Arthrospira platensis*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina*, *Euglena gracilis*, *Porphyridium cruentum*, *Chlorella vulgaris* e *Phaeodactylum tricorutum*.

Micoperi Blue Growth (impianto di Ortona) ha condotto le sperimentazioni su *Phaeodactylum tricorutum* per il progetto GoBioM.

2.3- Sperimentazioni su *Phaeodactylum tricornutum*

Uno degli scopi del progetto GoBioM è valutare se la CO₂ di scarto da upgrading del biogas garantisca, in modo analogo alla CO₂ sintetica, la crescita e il medesimo livello di qualità della biomassa microalgale. Per verificare ciò è stata selezionata *Phaeodactylum tricornutum*, in quanto specie che predilige temperature non elevate, quindi adatta ad una coltivazione autunnale/invernale, ed interessante per le sue applicazioni industriali in quanto produttrice di acidi grassi polinsaturi (PUFAs).

I test con PT su piccola scala sono stati condotti nei laboratori dell'Università di Bologna (sede di Ravenna) e in un fotobioreattore da 120 L, presso l'impianto semi-industriale di Micoperi Blue Growth (Ortona). La CO₂ sintetica è solitamente stoccata in bombole sotto pressione, mentre la CO₂ di scarto dal processo di upgrading del biogas utilizzata in questa sperimentazione non è stata fornita compressa per motivi tecnici. Perciò per la sperimentazione si è proceduto utilizzando appositi sacchetti di plastica contenenti CO₂ di scarto diluita con aria al 18% a pressione atmosferica, per facilitare le operazioni di insufflazione all'interno delle colture.

Nel primo caso, le prove su PT con CO₂ sintetica e CO₂ di scarto, sono state condotte in parallelo e in tre repliche (Figura 8); in questo modo sono state garantite le stesse condizioni sperimentali di temperatura (20 °C) (Benavides et al., 2013) e illuminazione.



Figura 8: coltura di PT in bottiglie da 1 L, foto dal laboratorio di algologia dell'università di Bologna (sede di Ravenna).

Invece, le sperimentazioni in fotobioreattore (Figura 9) sono state eseguite in serie, in un primo momento con CO₂ sintetica e in seguito con CO₂ di scarto. I risultati dei test hanno mostrato che la CO₂ reflua non provoca alcuna inibizione sullo sviluppo delle cellule microalgali, anzi si nota un effetto positivo (anche se non significativo) sulla crescita, forse dovuto alla presenza di una piccola percentuale di metano nell'off gas da upgrading. Inoltre, al termine delle sperimentazioni è stata condotta un'analisi quali-quantitativa della biomassa algale, dalla quale non sono emerse particolari alterazioni dei parametri analizzati (e.g. composizione elementare e contenuto in proteine, polisaccaridi e lipidi). Tuttavia, la coltivazione è durata solo 15 giorni, per avere un dato solido e validato sarebbe opportuno ripetere i test su un periodo di tempo più lungo, al fine di verificare gli effetti della CO₂ non pura anche in fase avanzata di crescita.



Figura 9: esempio di coltura di PT in PBR, foto dal laboratorio di algologia dell'università di Bologna (sede di Ravenna).

2.4- Definizione dell'obiettivo e campo di applicazione (fase 1)

Lo scopo di tale studio è l'analisi del ciclo di vita della coltivazione indoor della specie microalgale *Phaeodactylum tricornutum*, in un fotobioreattore verticale da 120 L, per produrre biomassa secca da cui estrarre composti bioattivi per i settori della farmaceutica, nutraceutica, ecc. Più in particolare si vogliono confrontare due scenari: il primo utilizza CO₂ sintetica, mentre il secondo sfrutta CO₂ di scarto (non pura) del processo di upgrading del biogas.

Nei confini del sistema rientrano le seguenti fasi: sanificazione del fotobioreattore, preparazione del terreno di coltura indispensabile alla crescita cellulare, inoculo della coltura, coltivazione, raccolta, congelamento e liofilizzazione della biomassa. Questo studio LCA è di tipo "cradle to gate", poiché non prende in considerazione la fase di uso e fine vita del prodotto. Sono state trascurate le fasi di produzione e manutenzione degli impianti e di uso delle infrastrutture. Infine, il processo di estrazione di eventuali composti bioattivi dalla biomassa non è stato incluso poiché può variare molto in funzione del tipo di prodotto che si vuole ottenere; inoltre, non è una fase determinante per l'analisi comparativa di questo studio.

Il prodotto finale del processo di coltivazione di *Phaeodactylum tricornutum* è la biomassa algale, quindi è stata selezionata come unità funzionale (UF) 1 kg di biomassa secca.

2.4.1- Sanificazione

Per ogni ciclo produttivo viene effettuata la sanificazione del fotobioreattore, all'inizio, ovvero prima dell'inoculo, e ripetuta in media ogni 20 giorni, al termine della coltivazione, in seguito alla raccolta della biomassa prodotta. Il PBR viene sterilizzato con una soluzione di ipoclorito di sodio, e una di acido cloridrico per rimuovere le concrezioni saline. Quest'ultimo liquido di lavaggio viene inviato direttamente al trattamento delle acque, mentre la soluzione di ipoclorito viene fatta evaporare, e il residuo solido smaltito come rifiuto pericoloso.

2.4.2- Coltivazione

La coltivazione inizia con l'inoculo di *Phaeodactylum tricornutum*, che viene portata a volume con il terreno Medium f/2, nel fotobioreattore verticale da 120 L. La soluzione è

mantenuta in agitazione dal flusso d'aria (insufflata per mezzo di un compressore), per evitare che le cellule sedimentino o aderiscano alle pareti del PBR. La sperimentazione indoor è stata condotta a:

- Salinità 20;
- Temperatura 22°C;
- Luce 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (periodo luce-buio, 16:8 ore);
- Flusso di CO₂ a 3 L/min per 24 minuti al giorno, per un totale di 0,6 L/L di coltura (quindi 72 L al giorno).

L'anidride carbonica viene somministrata per regolare il pH, e alcuni test hanno mostrato un aumento della crescita e un prolungamento della fase esponenziale (Raymont & Adams, 1958).

Nel modello LCA, per il flusso di anidride carbonica di scarto è stata fatta l'assunzione "zero burden", ovvero la CO₂ proveniente dal processo di upgrading del biogas ed utilizzata nel processo di coltivazione viene considerata ad impatto zero. Questo perché solitamente la CO₂ separata dal biogas viene direttamente emessa in atmosfera, generando quindi inquinamento (Muñoz et al., 2015) (Lozanovski et al., 2014). Invece, sfruttandola nella coltivazione microalgale, si valorizza lo scarto di un processo utilizzandolo come input per un altro.

La durata di una coltivazione varia in funzione di diversi fattori, per esempio: specie, tasso di crescita, ambiente esterno, ecc.

2.4.3- Raccolta

La coltura viene monitorata giornalmente e prima che raggiunga la fase stazionaria, si effettua la raccolta, ovvero viene svuotato completamente il PBR, per estrarre tutta la biomassa, si effettua la sanificazione e si procede con un nuovo inoculo. La raccolta viene effettuata per mezzo di una centrifuga a flusso continuo, che produce una biomassa con un alto grado di umidità. La biomassa algale viene quindi posta nell'abbattitore e in seguito trasferita nel liofilizzatore per ottenere biomassa secca, con un contenuto d'acqua finale minimo.

2.5- Inventario (fase 2)

Nell'analisi di inventario sono stati considerati come input di materiali: i solventi di lavaggio (ipoclorito di sodio e acido cloridrico) alle specifiche diluizioni, l'acqua di rete e quella deionizzata, i nutrienti per il terreno di coltura e l'anidride carbonica.

Nello specifico, per la sterilizzazione di un PBR da 120 L vengono impiegati:

- 1,2 L di soluzione di ipoclorito di sodio, in 120 L di acqua di rete;
- 240 L di acqua per il risciacquo.

Al termine della sanificazione, il sodio ipoclorito viene smaltito in discarica; mentre per quanto riguarda la soluzione contenente l'acido cloridrico, poiché ha un carico organico molto basso, viene inviata direttamente ad un corpo idrico superficiale, anziché ad un impianto di trattamento.

Un ulteriore consumo d'acqua di rete è dovuto alla preparazione del terreno di coltura, con i nutrienti necessari. Al momento della raccolta, il terreno di coltura separato dalla biomassa può essere in parte scartato e in parte riciclato (con un opportuno reintegro dei macronutrienti azoto e fosforo), altrimenti viene direttamente mandato a trattamento, quindi interamente sostituito con terreno fresco.

I consumi elettrici sono stati calcolati sulla base della potenza delle apparecchiature usate e sulla durata di funzionamento:

- illuminazione artificiale del locale (una coppia di neon da 60 W ogni 20 m² di suolo occupato, cioè ogni 10 PBR) e 7 lampadine alogene da 15 W per il singolo PBR;
- unità di controllo: pHmetri, termometri fissi con centralina e computer associati, funzionanti 24 al giorno, di cui si stima un consumo di 1 kW per tutto l'impianto (perciò 24 kWh). Quindi per un PBR si considera il consumo totale diviso per il numero di reattori presenti nell'impianto, assumendo il consumo indipendente dal volume;
- compressore a vite, potenza 11 kW. Si considera un utilizzo medio a carico per 5 h e 10 minuti al giorno. Poiché rifornisce diversi sistemi di coltivazione di vario volume presenti in impianto, per ricavare il valore relativo al singolo PBR da 120 L, si assume il consumo proporzionale al volume;

- centrifuga a flusso continuo con potenza complessiva di 4,1 kW. Si calcola il consumo per raccogliere 1000 L di coltura, per riferirlo all'unità funzionale (1 kg di biomassa secca);
- abbattitore con 1,6 kW di potenza e capacità doppia rispetto al liofilizzatore (20 kg), quindi da 20 kg di biomassa raccolta, si ricavano 3 kg di biomassa secca. Si assume la durata del ciclo pari a 2,5 giorni;
- liofilizzatore con 12 kg di capacità massima, e assorbimento 32 ampere. Si considerano 2,5 giorni (come per l'abbattitore) per liofilizzare 10 kg di biomassa al 15 % di peso secco (quindi 1,5 kg di biomassa secca).

L'input giornaliero di CO₂ è di 72 L per un fotobioreattore da 120 L. Tuttavia, la quantità di anidride carbonica che può essere utilizzata dalle cellule microalgali per la loro crescita corrisponde a circa 1,8 volte la quantità di biomassa prodotta (Van den Broeke & Van der Gijp, 2011); perciò la CO₂ viene insufflata in eccesso, e la frazione che non viene stoccata è riemessa in atmosfera (Wijffels & Barbosa, 2010) (Collet et al., 2011) (Borowitzka, 1999).

Per la fase di trasporto dell'anidride carbonica è stato ipotizzato un impianto locale di trattamento di biogas che fornisce la CO₂ alla struttura di coltivazione microalgale, quindi un tragitto di circa 100 km, mentre nel caso della CO₂ pura si considera una distanza di 500 km.

Sono stati trascurati i consumi dell'impianto di condizionamento e non vengono inclusi nel sistema i processi di produzione di alcuni micronutrienti utilizzati per la preparazione del terreno di coltura, in quanto non disponibili nelle banche dati di riferimento; in ogni caso, i loro contributi sono ritenuti trascurabili, viste le ridotte quantità in gioco. Le tabelle che seguono (Tabella 3 e Tabella 4) riassumono i flussi di input e output riferiti all'unità funzionale.

Quindi, avendo a disposizione tutti i dati di inventario, si realizza un modello del processo, che si presenta come uno schema a blocchi collegato dai flussi di input e output (Figura 10). Tali flussi sono scalati in funzione di 1 kg di biomassa secca (UF); in altre parole, il software quantifica gli input necessari a produrre un 1 kg di biomassa e le emissioni generate.

Tabella 3: inventario per la produzione di 1 kg di biomassa secca (UF).

	1°scenario	2°scenario		
INPUT DA TECNOSFERA	Quantità	Quantità	U.d.m.	Database
Energia Totale:	2540	2331	MJ	Gabi
Luce artificiale	1004	860,2	MJ	Gabi
Sistemi di controllo	252,5	216,2	MJ	Gabi
Compressore	272,1	233,0	MJ	Gabi
Centrifuga	31,95	31,95	MJ	Gabi
Abbattitore	115,2	115,2	MJ	Gabi
Liofilizzatore	864,0	864,0	MJ	Gabi
Compressione CO ₂		10,00681	MJ	Gabi
Acqua di rete	2163	1996	L	Gabi
Acqua deionizzata	894,3	765,8	L	Gabi
CO ₂	21080	18050	g	Gabi
Sali marini	15000	15000	g	
KNO ₃ (come N)	99,80	99,80	g	Ecoinvent
Tiamina (B1)	50,00	50,00	g	
NaH ₂ PO ₄	37,32	37,32	g	Ecoinvent
Na ₂ SiO ₃	13,00	13,00	g	Ecoinvent
EDTA	3,590	3,590	g	Ecoinvent
FeCl ₃ (in soluzione al 40%)	4,725	4,725	g	Ecoinvent
Cobalamina (B12)	0,2500	0,2500	g	
Biotina (B7)	0,2500	0,2500	g	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,1800	0,1800	g	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,01372	0,01372	g	Ecoinvent
CoSO ₄ · 7H ₂ O	0,01200	0,01200	g	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,01000	0,01000	g	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,006000	0,006000	g	
Na ₂ SeO ₃	0,001360	0,001360	g	
NaClO (in soluzione al 15%)	1091	934,3	g	Ecoinvent
HCl (in soluzione al 32%)	414,6	355,0	g	Gabi

Tabella 4: output del processo di produzione di 1 kg di biomassa secca (UF).

	1°scenario	2°scenario	
OUTPUT	Quantità	Quantità	U.d.m.
Biomassa secca	1000	1000	g
Acque di scarico	2961	2678	L
NaClO	1091	934,3	g
CO ₂	19280	16260	g

2.6- Valutazione degli impatti (fase 3)

La terza fase, consistente nel convertire i flussi quantificati in impatti generati dal sistema in esame, viene realizzata con l'ausilio del software LCA GaBi.

Indoor cultivation of PT with synthetic/waste CO₂

GaBi piano di processo:Quantità di riferimento



Figura 10: schema di processo di coltivazione PT.

2.6.1 - Descrizione scenari

Viene eseguita un'analisi comparativa per confrontare il processo di coltivazione di *Phaeodactylum tricornutum* che utilizza CO₂ tecnica, con lo stesso processo che sfrutta invece CO₂ di scarto. Quindi si fa riferimento a due scenari differenti di cui si vanno a confrontare gli impatti.

1° scenario: indoor cultivation of PT with synthetic CO₂

Il primo scenario rappresenta la coltivazione indoor di PT in un PBR da 120 L con CO₂ sintetica.

Il piano principale comprende le fasi di: preparazione del fotobioreattore (photobioreactor preparing), coltivazione (culturing), raccolta (harvesting) e liofilizzazione (freeze-drying), e termina con la produzione di biomassa secca al 95%.

Il processo di preparazione del fotobioreattore (Figura 11) comprende la sanificazione del PBR, con le soluzioni di ipoclorito di sodio e acido cloridrico (evidenziati in giallo), l'invio della soluzione contenente acido cloridrico in un corpo idrico superficiale e del residuo solido di ipoclorito di sodio in discarica.

1 Photobioreactor preparing

GaBi piano di processi/Quantità di riferimento

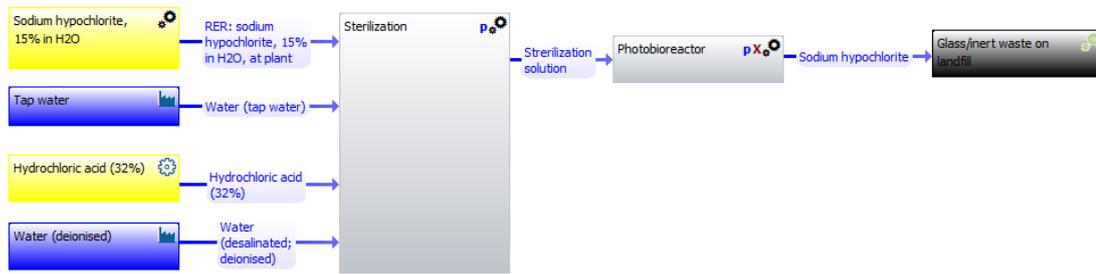


Figura 11: schema di processo, fase di preparazione del PBR.

La fase di coltivazione (Figura 12) considera anche la sintesi del terreno di coltura (Figura 13) e un eventuale ricircolo di questo, con il reintegro di azoto e fosforo, in rosa nella figura. La frazione non ricircolata viene mandata a trattamento. La normativa italiana consente lo scarico in sistemi fognari di acqua il cui COD (Chemical Oxygen Demand, domanda chimica di ossigeno) non sia superiore a 500 mg/L (Gazzetta Ufficiale, 2006). Il terreno di coltura ha un COD di 93 mg/L, quindi circa 1/5 del valore di un refluo medio, perciò è stato ridotto il volume del refluo che deve essere inviato a trattamento, in modo da rientrare nelle caratteristiche di un refluo medio.

L'unico trasporto considerato è quello delle bombole di anidride carbonica. Il processo selezionato per la produzione di CO₂ pura (synthetic CO₂ production) considera il noto processo Haber-Bosch, caratterizzato dalla sintesi di anidride carbonica e ammoniaca. Innanzitutto è necessario produrre il gas di sintesi che consiste in una miscela di azoto e idrogeno, il primo è ricavato dall'aria mediante frazionamento, l'idrogeno dal gas naturale mediante reforming del vapore. In questo modo si ottengono CO e CO₂, che possono essere convertiti in metano o ossidati interamente a CO₂ per la vendita. La conversione finale del gas di sintesi in ammoniaca è una reazione di equilibrio condotta ad alta temperatura e pressione.

2_Cultivation

GaBi piano di processo:Quantità di riferimento

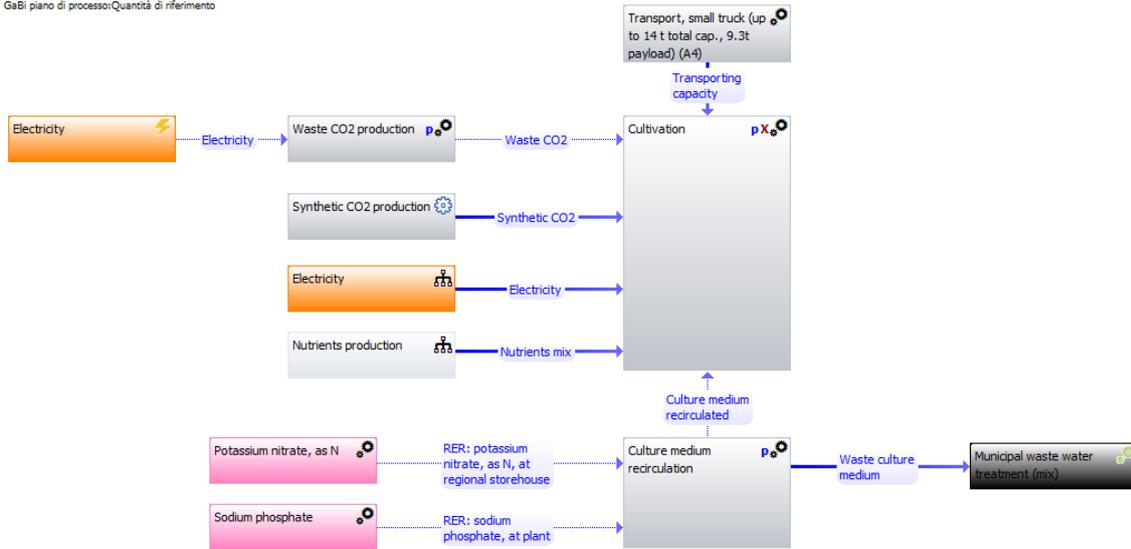


Figura 12: schema di processo, fase di coltivazione.

Nutrients production

GaBi piano di processo:Quantità di riferimento

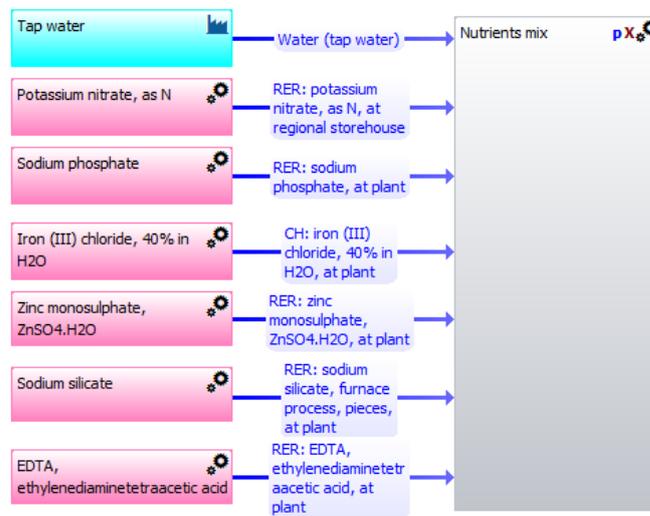


Figura 13: schema di processo, preparazione terreno di coltura.

Le fasi di raccolta (Figura 14) e liofilizzazione (Figura 15) comportano solamente un input energetico, per mettere in funzione, rispettivamente, la centrifuga a flusso continuo e l'abbattitore e liofilizzatore.

3_Harvesting

GaBi piano di processo:Quantità di riferimento



Figura 14: fase di raccolta.

4_Freeze-drying

GaBi piano di processo:Quantità di riferimento



Figura 15: fase di liofilizzazione.

I contributi elettrici (in arancione), relativi ad ogni fase, sono stati sommati, al fine di avere il consumo complessivo per un ciclo produttivo. Allo stesso modo sono stati aggregati i solventi di lavaggio (in giallo), l'acqua (in blu), i nutrienti (in rosa) e i processi di trattamento rifiuti e di acque di scarico (in nero). Così facendo si determinano sia gli impatti di ogni fase, sia quelli relativi ai gruppi creati.

2° scenario: indoor cultivation of PT with waste CO₂

Il modello con la CO₂ di scarto è impostato in modo analogo a quello precedente, ma si differenzia per l'assenza del processo di produzione dell'anidride carbonica pura, per l'inserimento della fase di compressione della CO₂ da upgrading del biogas per trasferirla nelle bombole e per la distanza percorsa dal camion per trasportarle. In questo scenario è stato ipotizzato un impianto locale di trattamento di biogas che fornisce la CO₂ al sistema di coltivazione microalgale, quindi un tragitto di circa 100 km, mentre nel caso della CO₂ pura, si considera una distanza di 500 km.

Infatti, in Figura 16 si può vedere che il processo di produzione di CO₂ sintetica (synthetic CO₂ production) non viene considerato, come si riconosce dalla freccia tratteggiata, ed è sostituito dal processo di produzione di CO₂ di scarto (waste CO₂ production), che implica anche un input energetico per la compressione.

2_Cultivation

GaBi piano di processo: Quantità di riferimento

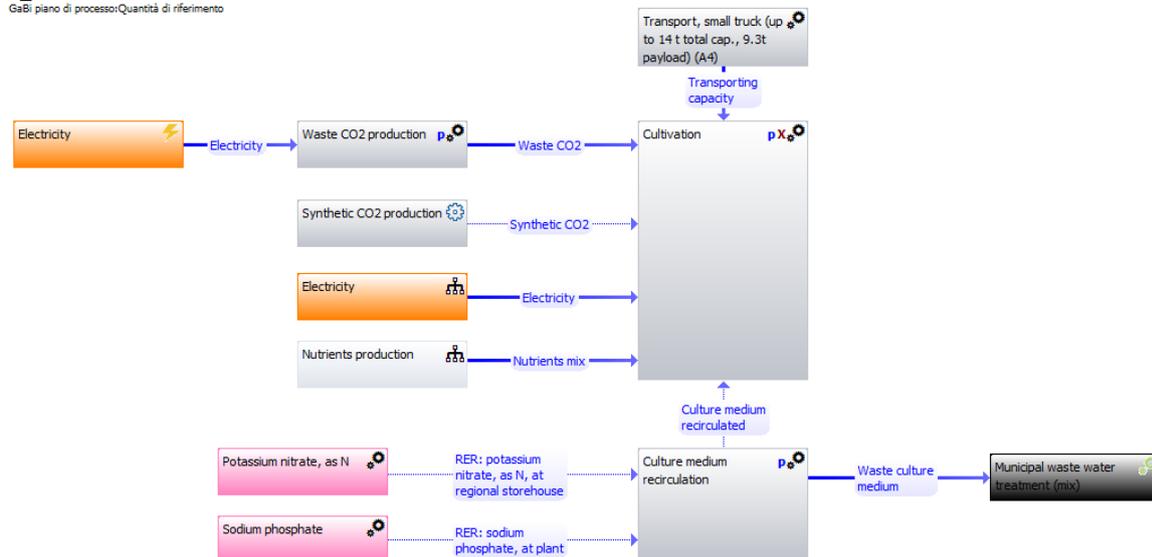


Figura 16: schema di processo, fase di coltivazione con CO₂ di scarto.

Il consumo elettrico per la compressione dell'anidride carbonica è stato stimato considerando l'energia necessaria a trasferirla in bombole a 50 atmosfere, con ipotesi di trasformazione adiabatica di un gas perfetto, effettuata da un compressore con un rendimento del 50%. Quindi, conoscendo la massa da comprimere da 1 a 50 atmosfere (25462,929 g, cioè 578,571 moli) applicando l'equazione di stato dei gas perfetti: $PV = nRT$, si ricava il volume iniziale: 13,9553 m³ ad una temperatura di 20 °C (293 K). La trasformazione adiabatica reversibile segue la legge $P_f V_f^\gamma = P_0 V_0^\gamma$, con la quale si calcola il volume finale, essendo noti gli altri fattori. Conoscendo il volume finale si ricava la temperatura finale, sempre utilizzando la legge dei gas perfetti, per poi quantificare l'energia interna: $\Delta U = C_v m \Delta T$. Infine si calcola il lavoro necessario per la compressione, con un rendimento (η) del 50%: $L = \frac{\Delta U}{\eta}$, quindi $L = \frac{1,96}{0,5} = 3,92$ kWh.

2.6.2- Categorie d'impatto

Il Life Cycle Impact Assessment di questo studio fa riferimento alle linee guida presentate nell'ILCD Handbook (ILCD/PEF recommendations v1.09) che considerano le 16 categorie d'impatto elencate di seguito.

Nel 2001 la Commissione Europea ha esaminato tutti i metodi di caratterizzazione ed ha assegnato a ciascuno un livello di qualità:

- Level I: Recommended and satisfactory (“consigliato e soddisfacente”);
- Level II: Recommended, some improvements needed (“consigliato, ma necessita perfezionamenti”);
- Level III: Recommended, but to be applied with caution (“consigliato, ma da applicare con attenzione”).

Acidification midpoint (AP, Level II)

L'acidificazione si riferisce all'abbassamento del pH in ambienti acquatici e terrestri, dovuto principalmente all'emissioni (NH_3 , NO_2 e SO_x) generate dalla combustione di composti fossili. I fattori di caratterizzazione (CF) sono espressi in moli di ioni H^+ equivalenti.

Climate change midpoint, excl and incl biogenic carbon (GWP, Level I)

La fonte per il fattore di caratterizzazione del climate change midpoint è il report dell'IPCC AR4 o AR5, riferito ad un orizzonte temporale di 100 anni. Il potenziale di riscaldamento globale (Global Warming Potential, GWP), che rappresenta l'effetto combinato del tempo di permanenza in atmosfera di ogni gas e la specifica efficacia nell'assorbimento della radiazione infrarossa emessa dalla Terra, è una misura di quanto un dato gas serra contribuisca al riscaldamento globale rispetto alla CO_2 . Infatti, per ogni sostanza è stato calcolato il fattore di caratterizzazione, per convertire tutti i contributi in emissioni di CO_2 equivalenti.

Ecotoxicity freshwater midpoint (EF, Level II/III)

Il metodo USEtoxTM, per l'eco-tossicità e la tossicità sull'uomo, è stato sviluppato nel 2005 come risultato della collaborazione di esperti di UNEP (United Nations Environment Program) e SETAC (Society for Environmental Toxicology and Chemistry). Sono stati

messi a confronto i metodi per la valutazione della tossicità, per raggiungere i seguenti obiettivi:

- identificare le specifiche differenze tra i modelli LCIA, per individuarne i componenti principali;
- costruire un modello approvato dalla comunità scientifica;
- fornire un set di fattori di caratterizzazione per la tossicità umana e l'eco-tossicità acquatica, tra cui scegliere.

I fattori di caratterizzazione sono stati sviluppati in funzione del comparto di emissione (aria, acqua e suolo). L'eco-tossicità considera, attualmente, solo gli effetti tossici sulle specie d'acqua dolce, non tiene conto degli effetti sugli altri ecosistemi, inclusi i sedimenti. CTUe, che sta per Comparative Toxic Unit for aquatic ecotoxicity, esprime la frazione delle specie potenzialmente a rischio, integrata nel tempo e su volume d'acqua dolce, per unità di massa della sostanza emessa.

Human toxicity midpoint, cancer effects and non-cancer effects (HT, Level II/III)

L'indice di tossicità umana, riflette il danno potenziale di un composto chimico rilasciato nell'ambiente; si basa sia sulla tossicità intrinseca della sostanza sia sulla sua dose potenziale. Questa è calcolata con un modello generico di esposizione, che descrive la distribuzione di una sostanza chimica in ambiente e tiene conto di una serie di vie di esposizione, inclusa l'inalazione, l'ingestione e il contatto dermico. CTUh (Comparative Toxic Unit for human) esprime l'aumento del numero di casi di malattia nella popolazione umana, per unità di massa di sostanza emessa.

Eutrophication freshwater midpoint (EPf, Level II)

L'eutrofizzazione è l'accrescimento smisurato di organismi vegetali in ecosistemi acquatici, dovuto all'eccesso di azoto e fosforo; ciò comporta un deficit di ossigeno e la degradazione dell'habitat.

Negli ambienti d'acqua dolce, il fosforo è considerato il fattore limitante, quindi si fa riferimento a questo elemento per valutare l'eutrofizzazione in acqua dolce, e la si esprime come kg di P_{eq} .

Eutrophication marine midpoint (EPm, Level II)

Negli ambienti marini, il fattore limitante è l'azoto, quindi per la caratterizzazione dell'eutrofizzazione marina si considerano i composti dell'azoto, espressi in kg N_{eq}.

Eutrophication terrestrial midpoint (EPt, Level II)

Il fattore limitante nell'eutrofizzazione terrestre, come in quella marina, è la concentrazione di azoto, quindi nei dataset ci sono i CF per NH₃ e NO₂ in aria. Da questi sono stati ricavati, stechiometricamente, i CF di NO, NH⁴⁺ e NO³⁻, quindi l'unità di misura è: moli di N_{eq}.

Ionizing radiation midpoint, human health (IR, Level II)

I fattori di caratterizzazione sono stati elaborati sulla base del modello USEtoxTM, i flussi elementari dei radionuclidi sono espressi in kBq U²³⁵ eq.

Land use midpoint (LU, Level III)

Diversi studi dimostrano che l'estinzione delle specie terrestri è provocata principalmente dalla perdita dell'habitat. L'occupazione degli ambienti naturali per l'agricoltura, silvicoltura, l'espansione delle aree urbane e gli usi industriali (es: l'estrazione mineraria) riducono sempre di più gli ecosistemi naturali. Ciò provoca l'estinzione locale di alcune specie, quelle che sopravvivono si spostano in un altro habitat sub-ottimale. Per questo motivo la categoria "land use" è rappresentativo della biodiversità. I fattori di caratterizzazione per l'uso del suolo sono stati studiati da membri di UNEP/SETAC Life Cycle Initiative e ricavati da un modello (Milà I Canals et al., 2007) e l'unità di misura è: kg Cdeficit_{eq}

Ozone depletion midpoint (OD, Level I)

Alcuni composti gassosi persistenti, liberati in atmosfera, possono incrementare il contenuto di cloro e bromo nella stratosfera, causando una riduzione della concentrazione dell'ozono stratosferico. La conseguenza è un aumento della radiazione solare, sulla superficie terrestre, in particolare quelle UVB, che come è noto, sono dannose per la salute umana. I fattori di caratterizzazione per le sostanze (le stesse del GWP) che contribuiscono all'assottigliamento dello strato d'ozono, sono determinati dalla World Meteorological Organisation WMO (1999) ed espressi in kg di CFC-11 equivalenti.

Particulate matter respiratory inorganics midpoint (PM, Level II/III)

I fattori di caratterizzazione per l'intake, il coefficiente di destino (per il livello di midpoint), di effetto e gravità (per il livello di endpoint), sono ricavati da modelli già elaborati (Humbert, 2009) (Rabl & Spadaro, 2004) (Greco et al., 2007) e dal modello USEtox. L'unità di misura è kg PM_{2.5eq}.

Photochemical ozone formation midpoint (POF, Level II)

Lo smog fotochimico è causato da emissioni naturali e antropiche nell'atmosfera e dalla loro reazione in presenza di luce solare. Il principale è l'ozono e la sua combinazione con i composti organici volatili (VOCs) e con l'ossido di azoto. L'ozono è un gas tossico, in quanto può causare disturbi respiratori nelle persone e negli altri mammiferi, oltre a ridurre i tassi di produzione primaria di piante acquatiche e terrestri. L'ozono agisce attraverso la formazione di radicali liberi, che sono implicati nella carcinogenesi e nella distruzione delle membrane cellulari. I CF per i composti organici volatili (VOCs), sono ricavati dalla combinazione delle emissioni ponderate del CF del metano e il CF di un generico composto VOCs. L'unità di misura per questa categoria d'impatto è kg NMVOC.

Resource depletion water midpoint (RDw, Level II)

Tale categoria d'impatto riflette la scarsità d'acqua, di una determinata qualità, in una specifica regione, e l'accessibilità tecnologica ed economica alla risorsa idrica. Per valutare l'esaurimento d'acqua, i CF sono stati elaborati sulla base dell'Ecological Scarcity Method (Frischknecht et al., 2008) e calcolati, a livello di midpoint, da EC-JRC. Come riferimento per calcolare l'entità dell'esaurimento è stato stimato un consumo medio europeo, espresso in m³_{eq}.

Resource depletion mineral, fossils and renewables (RDm, Level II)

Per l'esaurimento delle risorse, a livello di midpoint, i CF sono espressi come Abiotic Depletion Potential (ADP), ovvero "potenziale di esaurimento abiotico", quantificati in kg di antimonio equivalente per kg di estrazione (kg Sb_{eq}) (Gorrée et al., 2002) (van Oers et al., 2002).

2.7- Analisi di sensitività

L'analisi di sensitività viene effettuata al termine della terza fase, successivamente al controllo di completezza e coerenza, e consiste nel verificare come cambiano i risultati al variare di uno o più fattori e/o variabili, in modo da discriminare tra fattori influenti e non influenti. Lo scopo di tale analisi è valutare l'attendibilità dei risultati finali, delle conclusioni e raccomandazioni dello studio LCA e permette di individuare i dati di inventario su cui focalizzarsi per migliorare l'affidabilità del modello. L'analisi di sensitività va effettuata alla luce delle informazioni ottenute tramite l'analisi dei contributi (per identificare i temi significativi) e le informazioni sulle incertezze (nei dati di inventario, nei dati di impact assessment, nelle assunzioni, ecc.).

I dati ad alta sensitività e scarsa qualità, hanno priorità elevata, a seguire quelli con alta significatività e media incertezza oppure alta incertezza e media sensitività (Figura 17). I dati con bassa incertezza e bassa sensitività non necessitano di ulteriori affinamenti.

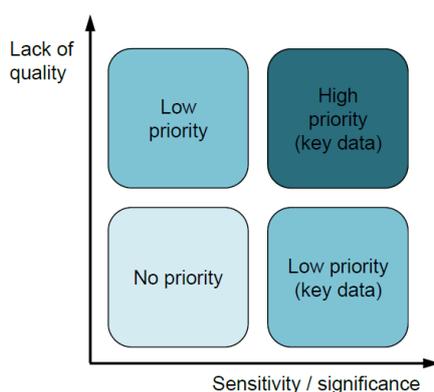


Figura 17: sensitività e qualità dei dati.

In questo studio l'analisi di sensitività è stata condotta considerando come scenario di riferimento quello con CO₂ sintetica, per valutare l'influenza dei seguenti parametri: produttività algale, quantità di ipoclorito di sodio utilizzato per la sanificazione, percentuale di ricircolo del terreno di coltura e fonte di energia elettrica.

Per la variazione della produttività algale si è fatto riferimento ai risultati delle sperimentazioni di cui al paragrafo 2.3. Sulla base di test precedenti, si è definito un range di variabilità di questo parametro tra 0,053 e 0,091 g/(L giorno) (Casciaro, 2015).

Di norma le soluzioni di lavaggio vengono riutilizzate più volte, fino ad esaurimento, ad esempio viene sfruttata la stessa per la sanificazione di più fotobioreattori in serie. Viene quindi valutata l'ipotesi di utilizzo di solo 1/5 della soluzione di lavaggio utilizzata nello scenario di riferimento (che rappresenta la modalità di lavoro di alcune linee produttive di MBG).

Al momento della raccolta, il terreno di coltura separato dalla biomassa può essere riutilizzato per un nuovo ciclo produttivo, in sostituzione del terreno fresco, dopo opportuno reintegro dei macronutrienti (azoto e fosforo). Per il fattore di ricircolo, impostato a zero nello scenario di riferimento, si valuta quindi una variazione fino al 100%, corrispondente a una situazione in cui è necessaria solamente una quantità di terreno fresco che compensi l'aliquota trattenuta dalla biomassa dopo la raccolta, e che tenga conto di un ricambio completo del terreno ogni 6 mesi. Di conseguenza, si va ridurre l'input di terreno fresco, da cui ci si aspetta una riduzione degli impatti nella fase di coltivazione. Dalla Figura 18 si può notare che i flussi di ricircolo e di reintegro dei nutrienti non sono più tratteggiati, come negli scenari precedenti, e che il volume di terreno fresco ("nutrients mix") si riduce, così come il flusso di refluo da inviare a trattamento.

2_Cultivation

GaBi piano di processo-Quantità di riferimento

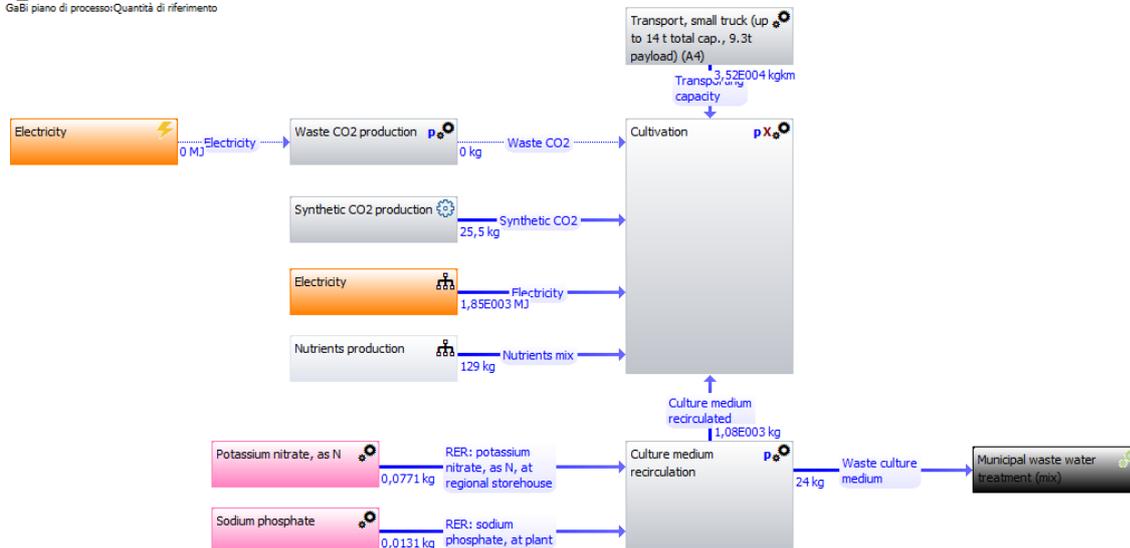


Figura 18: schema di processo, fase di coltivazione con ricircolo del terreno di coltura.

Dal punto di vista pratico, è possibile un ricircolo, solo con un reintegro opportuno dei macronutrienti (azoto e fosforo) che vengono consumati più rapidamente e perciò saranno

assenti nella soluzione ricircolata. Per fare ciò è indispensabile conoscere l'uptake di azoto e fosforo in funzione della crescita della biomassa algale, in un determinato intervallo di tempo.

Quindi, si calcolano i consumi giornalieri di azoto e fosforo (rispettivamente 3,99 mg/giorno e 0,61 mg/giorno) e, conoscendo la produttività giornaliera (0,056 g/(L giorno) per la CO₂ sintetica), si calcola il rapporto per ottenere la quantità di nutrienti necessaria per produrre un grammo di biomassa algale: 71,36 mg/g per l'azoto e 12,16 mg/g di biomassa. Analogamente si calcolano i valori per lo scenario con la CO₂ di scarto, ottenendo un consumo giornaliero di 4,54 mg/giorno di azoto e 0,62 mg/giorno di fosforo. Quindi per far crescere un grammo di biomassa servono 69,55 mg/g di azoto e 10,19 mg/g di fosforo.

Per il consumo elettrico dell'impianto, nello scenario di riferimento è stato considerato l'utilizzo del mix elettrico europeo. Si valuta la sostituzione di una parte di questo input di energia elettrica con un input di energia fotovoltaica autoprodotta, fino al 75% del fabbisogno. Considerando la minore produzione nel periodo invernale, si assume che in media sia possibile soddisfare con il fotovoltaico il fabbisogno energetico dell'impianto per 9 mesi su 12 in un anno.

3- Risultati e discussione

Di seguito sono presentati i risultati della LCA ottenuti mediante il software GaBi, per i diversi scenari considerati. Le tabelle riportano i contributi relativi di ogni fase produttiva, in funzione delle categorie d'impatto; questi sono poi rappresentati graficamente nel profilo ambientale, in cui i dati sono espressi in contributi percentuali.

3.1- Scenario indoor cultivation of PT with synthetic CO₂

I risultati dello scenario che ipotizza una coltivazione indoor con CO₂ sintetica sono illustrati in Figura 19. Come è possibile osservare, le fasi maggiormente impattanti, in quasi tutte le categorie d'impatto, sono la coltivazione e la liofilizzazione che contribuiscono per percentuali fra il 40% e 60% e fra il 10% e 40%, rispettivamente.

La fase di preparazione del fotobioreattore assume importanza per le seguenti categorie d'impatto: ecotossicità in acqua dolce (EF) (38%), eutrofizzazione in acqua dolce (EPf) (42%), tossicità umana (HTnc e HTc) (22% e 38%) e riduzione dello strato d'ozono (OD) (42%).

Infine, il processo di raccolta presenta un impatto minimo (inferiore al 5%) dovuto alla richiesta relativamente trascurabile di energia elettrica per il funzionamento della centrifuga a flusso continuo.

Tabella 5: risultati relativi allo scenario con CO₂ sintetica.

Impact category	Unit	CLEANING & STERILISATION	CULTIVATION	HARVESTING	FREEZE-DRYING	Total
AP	Mole of H+ eq	1,8E-02	6,3E-01	1,3E-02	4,7E-01	1,1E+00
GWP(ebC)	kg CO ₂ eq	5,4E+00	2,2E+02	3,9E+00	1,5E+02	3,8E+02
GWP(ibC)	kg CO ₂ eq	6,1E+00	2,2E+02	3,9E+00	1,5E+02	3,8E+02
EF	CTUe	1,1E+01	1,2E+01	1,2E-01	4,4E+00	2,8E+01
EPf	kg P eq	1,0E-03	9,6E-04	9,6E-06	3,6E-04	2,3E-03
EPm	kg N eq	5,5E-03	1,3E-01	2,4E-03	9,0E-02	2,3E-01
EPt	Mole of N eq	5,0E-02	1,3E+00	2,5E-02	9,2E-01	2,3E+00
HTc	CTUh	1,2E-07	2,7E-07	3,1E-09	1,2E-07	5,1E-07
HTnc	CTUh	8,8E-07	1,1E-06	1,3E-08	4,6E-07	2,4E-06
IR	kBq U ₂₃₅ eq	9,0E-01	8,3E+01	1,7E+00	6,4E+01	1,5E+02
LU	kg C deficit eq	3,9E+00	1,2E+02	2,4E+00	8,9E+01	2,2E+02
OD	kg CFC-11 eq	7,1E-08	9,1E-08	1,8E-10	6,5E-09	1,7E-07
PM	kg PM _{2,5} eq	1,2E-03	2,9E-02	5,8E-04	2,2E-02	5,2E-02
PO	kg NMVOC	1,2E-02	3,4E-01	6,5E-03	2,4E-01	6,0E-01
RDw	m ³ eq	6,3E-01	1,3E+01	2,6E-01	9,6E+00	2,3E+01
RDm	kg Sb eq	3,4E-05	7,5E-04	1,5E-05	5,7E-04	1,4E-03

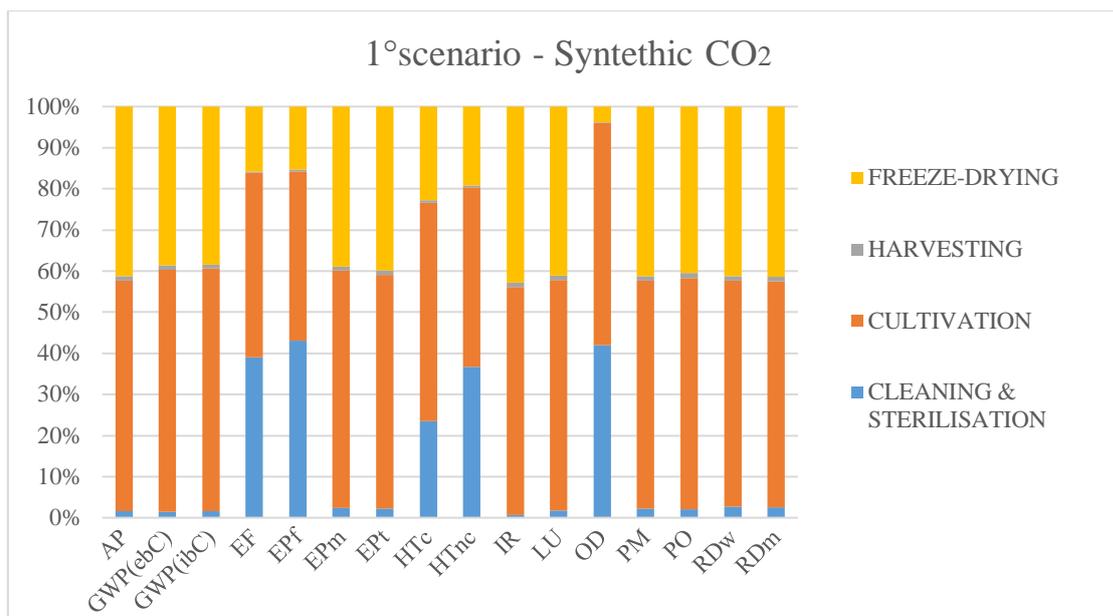


Figura 19: profilo ambientale degli impatti relativi allo scenario con CO₂ sintetica.

Nel grafico di Figura 20 sono riportati i risultati per il medesimo scenario ma secondo un altro criterio, ovvero per tipologia di processi, legati agli input e output del sistema produttivo: i processi di produzione degli input di elettricità, nutrienti, solventi e acqua, e i processi relativi al trattamento degli output costituiti da acque di scarico e rifiuti solidi; infine, la categoria “others” comprende tutto ciò che non rientra nelle precedenti. In questo modo si mettono in evidenza i contributi dei flussi principali lungo l’intero ciclo di vita. Si vede chiaramente che l’energia elettrica predomina rispetto agli altri flussi, fatta eccezione per cinque categorie d’impatto: ecotossicità in acqua dolce (EF), eutrofizzazione in acqua dolce (EPf), tossicità umana (HTnc e HTc) e assottigliamento dello strato d’ozono (OD), in cui è rilevante anche il contributo dei processi di produzione di solventi e nutrienti e in piccola parte anche dell’acqua. In particolare per l’eutrofizzazione d’acqua dolce si osservano alti contributi per la produzione di nutrienti e solventi perché i processi selezionati nell’elaborazione del modello rilasciano le emissioni in corpi d’acqua dolce. Inoltre, per la categoria d’impatto dell’assottigliamento dello strato d’ozono (OD) si può notare che il contributo dell’elettricità diventa minimo rispetto a quello di nutrienti e solventi.

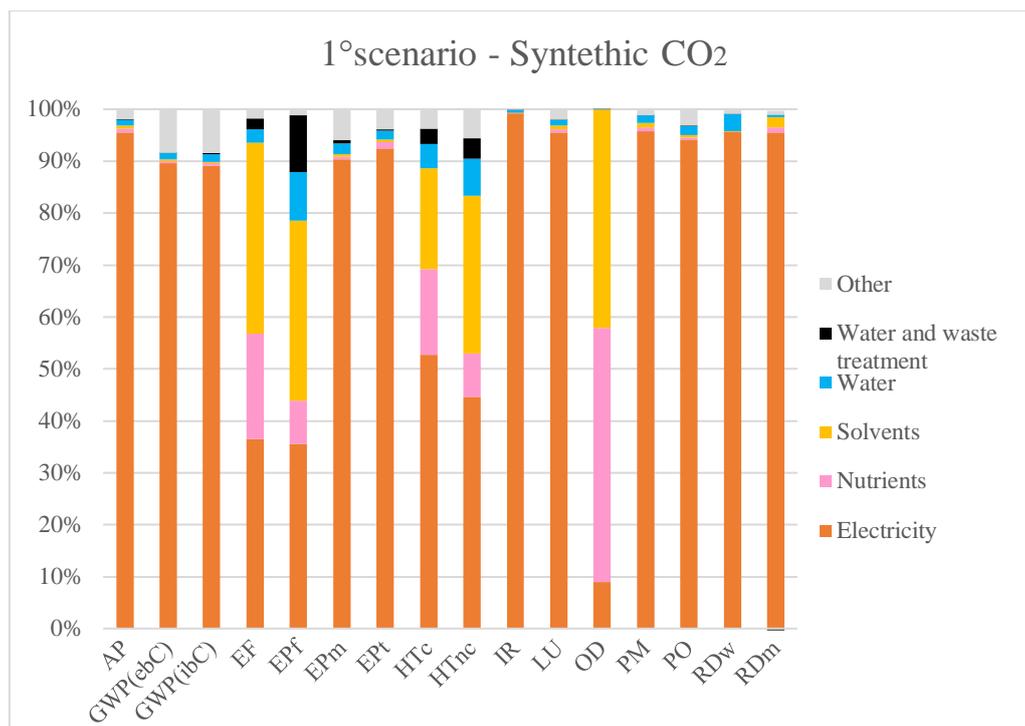


Figura 20: profilo ambientale degli impatti relativi ai processi di produzione, scenario con la CO₂ sintetica.

Si può notare che vi è un contributo importante dei solventi nelle stesse categorie d’impatto in cui è emerso essere rilevante la fase di preparazione del fotobioreattore.

Da ciò si deduce che nella fase di sanificazione sono più impattanti i processi di produzione dei solventi, in particolare dell’ipoclorito di sodio, anziché il loro smaltimento. A tal proposito sono state effettuate diverse modellazioni in funzione del processo di trattamento del rifiuto solido, dalle quali è emerso che è il processo di produzione dell’ipoclorito di sodio a provocare i maggiori impatti e non tanto la modalità di smaltimento di questo. Proprio per l’impatto connesso alla produzione di ipoclorito di sodio, è stata effettuata un’analisi di sensitività sulla potenziale riduzione del quantitativo utilizzato per la sanificazione di un unico fotobioreattore.

Infine, il consumo energetico nella fase di liofilizzazione è dovuto principalmente alla durata di funzionamento del liofilizzatore.

Nonostante la standardizzazione ottenuta seguendo le norme ISO14040 e ISO14044, non è facile confrontare i risultati di pubblicazioni che valutano la sostenibilità con il metodo LCA, a causa delle differenze nei confini di sistema, ciclo di vita e processi analizzati, tipo di approccio (“cradle to grave”, “cradle to gate” e “gate to gate”), aggregazione dei dati, metodo e categorie d’impatto, metriche ambientali considerate e dell’uso di dati

sperimentali, stimati o ricavati dalla letteratura (Handler et al., 2012). Inoltre, ci possono essere molte differenze dovute ai sistemi utilizzati, ai prodotti che si vogliono ottenere, al livello di qualità della biomassa che si vuole raggiungere e allo scopo finale di questa. In particolare, una distinzione fondamentale tra gli studi LCA sulle microalghe riguarda lo scopo della loro coltivazione: produzione di biocarburante o estrazione di composti bioattivi.

Di conseguenza confrontare studi LCA sulla coltivazione microalgale a scopi energetici con altri studi analoghi ma riferiti a sistemi per la produzione di composti ad alto valore aggiunto, non è sempre immediato e richiede quantomeno di contestualizzare i risultati; in alcuni casi non è sempre possibile a causa di unità funzionali diverse.

Come già accennato nel paragrafo 1.8.1, in letteratura sono presenti numerosi studi LCA sulla coltivazione microalgale a scopo energetico, mentre quelli che analizzano la sostenibilità della produzione di composti bioattivi sono in numero limitato.

Dai primi è emerso che, con le attuali tecnologie, la sintesi di biodiesel da microalghe non è sostenibile poiché l'energia ricavata è inferiore rispetto a quella necessaria per alimentare l'intero processo. Secondo diversi autori infatti, per produrre 1 MJ di biodiesel è stata stimata una richiesta energetica elevata che può variare da un minimo di 5 MJ fino a superare i 90 MJ (Monari et al., 2016) (Khoo et al., 2011) (Jorquera et al., 2010).

A conferma della notevole variabilità dei dati che si trovano in letteratura in un'altra pubblicazione viene riportato un range di input energetici pari a 870-920 MJ/kg di biomassa secca, variabile in funzione della specie algale (*Heterosigma akashiwo*, *Alexandrium minutum* e *Karlodinium veneficum*) coltivata in PBR indoor (Sevigné-Itoiz et al., 2012)

In ogni caso, si può notare che questi consumi relativi alle coltivazioni algali per scopi energetici sono sempre inferiori a quelli ottenuti dalla LCA presentata in questa tesi, ossia di 2540 MJ per un kg di biomassa secca. Questo può essere spiegato considerando che una produzione a fini energetici è tipicamente orientata alla massimizzazione della produttività, a discapito dell'aspetto qualitativo, attraverso l'ottimizzazione del processo produttivo per minimizzare i consumi. In particolare, in questo caso si ricorre solitamente a sistemi tecnologici di coltivazione meno energivori, quali le vasche aperte. Le stesse specie selezionate per la produzione sono qui caratterizzate da una più alta capacità di crescita, a parità di altre condizioni. Per l'estrazione dei composti bioattivi, invece, avviene il

contrario in quanto l'obiettivo è produrre una biomassa che rispetti gli elevati standard qualitativi.

Quindi, dal momento che dalla letteratura emerge chiaramente che la produzione di biodiesel da microalghe è altamente energivoro (Rodríguez et al., 2017) (Xu et al., 2011) (Jorquera et al., 2010), tanto più lo è il sistema di coltivazione analizzato in questo lavoro di tesi che ha un diverso obiettivo e analizza una specie algale con una bassa produttività.

Per quanto riguarda invece la coltivazione microalgale a scopi non energetici, è possibile riferirsi per un confronto agli studi di Pérez-López et al. (2014a), Pérez-López et al. (2014b) e Pérez-López et al. (2017).

Il primo di questi analizza il ciclo produttivo di biomassa algale su scala pilota in un PBR da 80 L per l'estrazione dei PUFAs (PolyUnsaturated Fatty Acids, acidi grassi polinsaturi). I confini del sistema, rispetto al nostro caso, comprendevano anche la fase di estrazione dei PUFAs.

In accordo con il presente lavoro di tesi, è emerso che gli impatti sono dovuti soprattutto alla fase di coltivazione, il consumo energetico e di conseguenza gli impatti connessi alla produzione di elettricità hanno un ruolo dominante, e inoltre i consumi idrici sono paragonabili (3508 L rispetto a 3057 L di questo studio).

Tuttavia, sono presenti alcune differenze: in questo lavoro di tesi la produttività è nettamente inferiore (0,056 g/(L giorno) rispetto a 0,32 g/(L giorno)) e i consumi elettrici sono più elevati (2540 MJ per kg di biomassa secca, rispetto a 128,3 MJ/kg).

Tali discrepanze possono essere dovute a diverse modalità di coltivazione, raccolta, liofilizzazione e di produzione delle materie prime, nell'articolo però non è esplicitato com'è stato stimato l'input energetico e precisamente quali apporti comprenda, quindi potrebbero essere stati omessi alcuni contributi. Inoltre, lo studio di Pérez-López et al. (2014a), pur riferendosi alla stessa specie algale, utilizza dati di produzione relativi ad una microalga diversa (*Tetraselmis suecica*), e ciò spiegherebbe la discrepanza nei valori di produttività. Infine, mentre nel presente lavoro sono stati utilizzati dati primari riferiti ad una coltivazione in un impianto semi-industriale, nella pubblicazione esaminata sono stati utilizzati dati di letteratura per una serie importante di input.

Inoltre, è evidente che se la produttività algale aumenta, espressa come biomassa prodotta per unità di tempo e di volume, è possibile conseguire una riduzione dell'energia necessaria

per produrre un kg di biomassa, in virtù di tutti quei contributi energetici che si mantengono costanti rispetto a tempo e volume di coltivazione. Questo avviene ad esempio per i consumi legati all'illuminazione del fotobioreattore, all'insufflazione di aria e alle unità di controllo.

Avendo applicato due metodi differenti, ossia: CML 2 baseline 2001 V 2.04 nell'articolo di Pérez-López et al. (2014a) e ILCD nella LCA presentata in questa tesi, le uniche categorie d'impatto confrontabili sono il GWP e l'OD.

Il valore del GWP (47,3 kg di CO₂ eq) è inferiore perché i consumi elettrici sono minori, rispetto all'analisi condotta in questo lavoro di tesi (380 kg di CO₂ eq), mentre l'OD è più alto di un ordine di grandezza (5,2·10⁻⁶ e 1,7·10⁻⁷ kg di CFC-11 eq) a causa della produzione dell'agente estraente, ossia il cloroformio; questa differenza di impatti è dovuta al fatto che nel presente studio non è stata inclusa la fase di estrazione, e di conseguenza nemmeno la produzione di un solvente necessario a tale scopo.

Quindi, nonostante la specie algale e le fasi produttive esaminate siano le stesse, i consumi energetici e gli impatti possono variare molto a causa delle assunzioni fatte, dei contributi considerati e del grado di ottimizzazione del sistema produttivo.

Anche un'altra pubblicazione di Pérez-López et al. (2014b) riguardante l'analisi di ciclo di vita della coltivazione di una specie algale diversa, *T. suecica* in un PBR da 80 L, riporta consumi energetici inferiori a quelli calcolati in questo lavoro di tesi: 247,3 MJ per un kg di *T. suecica* e rispetto a 2540 MJ per un kg di *P. tricornutum*. Tale differenza è dovuta al fatto che il sistema analizzato per la coltivazione di PT è un impianto sperimentale non ottimizzato, per cui i consumi sono elevati, per di più *P. tricornutum* è una specie algale caratterizzata da minore produttività.

Una recente pubblicazione (Pérez-López et al., 2017) dimostra come i range dei valori di consumi, produttività e impatti siano molto variabili in funzione di diversi fattori, ad esempio il periodo dell'anno in cui avviene la coltivazione. Infatti, si mostra come per la stessa specie algale, la produttività può variare anche di un ordine di grandezza: 0,5685 g/(L giorno) in estate, 0,241 g/(L giorno) in autunno e 0,0792 g/(L giorno) in inverno. I consumi elettrici logicamente aumentano con il calo della produttività: 992,4 MJ in estate, 2698 MJ in autunno, 12929 MJ in inverno, per 1 kg di biomassa secca. La produttività riportata nel presente lavoro, 0,056 g/(L giorno), si avvicina a quella indicata nell'articolo

di Pérez-López et al. (2017) relativa alla situazione invernale, 0,0792 g/(L giorno). Dato che i consumi energetici variano in funzione della capacità produttiva, quando quest'ultima raggiunge valori inferiori, i consumi aumentano, e come si può vedere nel caso invernale (0,0792 g/(L giorno)) sono stimati pari a 12929 MJ/kg, cinque volte tanto quelli calcolati in questo lavoro di tesi e relativi ad una produttività anche inferiore (0,056 g/(L giorno)).

Gli impatti stimati in termini di GWP variano in un range tra 214 e 2665 kg di CO₂ eq per kg di biomassa secca, intervallo in cui rientra il valore (380 kg di CO₂ eq) ottenuto dalla valutazione degli impatti dello scenario con CO₂ sintetica presentata in questa tesi.

Riassumendo, nell'analisi di ciclo di vita oggetto del presente lavoro di tesi sono stati trovati dei valori per i consumi elettrici più elevati rispetto a quelli riportati in letteratura, probabilmente perché sono stati inclusi maggiori contributi e perché si riferiscono ad un impianto semi-industriale reale non ottimizzato e non sono il risultato di stime teoriche o di estrapolazioni da altri studi. Inoltre, si sono osservate produttività più basse rispetto a quelle riportate in letteratura. A questo proposito però bisogna sottolineare che i risultati presenti in letteratura spesso sono il prodotto di sperimentazioni in laboratorio e in piccola scala, dove sicuramente le condizioni ideali per la crescita sono mantenute sempre costanti garantendo il massimo sviluppo. In altri test su scala pilota (PBR da 70 L) PT ha raggiunto produttività di 0,053 g/(L giorno) e 0,091 g/(L giorno) (Casciaro, 2015), in linea con le sperimentazioni con CO₂ tecnica e CO₂ di scarto: 0,056 g/(Lgiorno) e 0,065 g/(Lgiorno). In generale, si può concludere che gli studi LCA sulla coltivazione microalgale non a scopo energetico dimostrano che la fase più impattante è la coltivazione e che il consumo elettrico ha un ruolo dominante sul totale degli impatti, risultato confermato anche in questo lavoro di tesi.

3.2- Scenario indoor cultivation of PT with waste CO₂

I risultati riguardanti lo scenario di una coltivazione indoor con CO₂ di scarto sono riportati (Tabella 6 e Figura 21) in modo analogo a quelli precedenti, e non si notano sostanziali differenze nei contributi relativi di ogni fase. Infatti, le fasi che generano l'impatto più alto si confermano essere la coltivazione e la liofilizzazione, con una variazione rispetto al caso con la CO₂ sintetica da circa 60% a 55% per la prima, e da circa 40% a 45% per la seconda. Probabilmente ciò è dovuto ad una riduzione degli impatti nella coltivazione, legata

all'utilizzo di CO₂ non industriale, che quindi comporta un aumento relativo del contributo della fase di liofilizzazione, che invece si mantiene invariata nei valori assoluti. Inoltre, nella fase di coltivazione si ha che i consumi energetici sono caratterizzati da una dipendenza rispetto alla produttività, in particolare i primi diminuiscono all'aumentare della seconda, come avviene passando dal primo al secondo scenario. Invece, i consumi relativi alle fasi di raccolta e liofilizzazione, ovvero l'energia necessaria per raccogliere e liofilizzare un kg di biomassa, non variano con la produttività, restando quindi i medesimi tra il primo e il secondo scenario.

Tabella 6: risultati relativi allo scenario con CO₂ di scarto.

Impact category	Unit	CLEANING & STERILISATION	CULTIVATION	HARVESTING	FREEZE-DRYING	Total
AP	Mole of H+ eq	1,6E-02	5,3E-01	1,3E-02	4,7E-01	1,0E+00
GWP(ebC)	kg CO ₂ eq	4,6E+00	1,7E+02	3,9E+00	1,5E+02	3,2E+02
GWP(ibC)	kg CO ₂ eq	5,2E+00	1,6E+02	3,9E+00	1,5E+02	3,2E+02
EF	CTUe	9,3E+00	1,1E+01	1,2E-01	4,4E+00	2,5E+01
EPf	kg P eq	8,5E-04	8,7E-04	9,6E-06	3,6E-04	2,1E-03
EPm	kg N eq	4,7E-03	1,1E-01	2,4E-03	9,0E-02	2,0E-01
EPt	Mole of N eq	4,2E-02	1,1E+00	2,5E-02	9,2E-01	2,1E+00
HTc	CTUh	1,0E-07	2,3E-07	3,1E-09	1,2E-07	4,5E-07
HTnc	CTUh	7,6E-07	8,6E-07	1,3E-08	4,6E-07	2,1E-06
IR	kBq U ₂₃₅ eq	7,7E-01	7,1E+01	1,7E+00	6,4E+01	1,4E+02
LU	kg C deficit eq	3,3E+00	1,0E+02	2,4E+00	8,9E+01	2,0E+02
OD	kg CFC-11 eq	6,1E-08	9,0E-08	1,8E-10	6,5E-09	1,6E-07
PM	kg PM _{2,5} eq	9,8E-04	2,5E-02	5,8E-04	2,2E-02	4,8E-02
PO	kg NMVOC	1,1E-02	2,8E-01	6,5E-03	2,4E-01	5,4E-01
RDw	m ³ eq	5,4E-01	1,1E+01	2,6E-01	9,6E+00	2,1E+01
RDm	kg Sb eq	2,9E-05	6,4E-04	1,5E-05	5,7E-04	1,3E-03

Anche in questo caso si osserva che la fase di sanificazione diventa rilevante per le categorie d'impatto: eutrofizzazione d'acqua dolce (EPf) (41%), assottigliamento dello strato d'ozono (OD) (39%), ecotossicità (EF) (38%), tossicità umana (HTc e HTnc) (35% e 22%).

Dal grafico (Figura 22) si evince che anche in questo caso i contributi elettrici (da 10% a 95%) sono la causa principale di impatto, seguiti dalla produzione di solventi (20-40%) e nutrienti (10-50%). Analogamente al primo scenario si può notare che le categorie dove il ruolo dei solventi è determinante sono le stesse nelle quali emerge il contributo della fase di sanificazione.

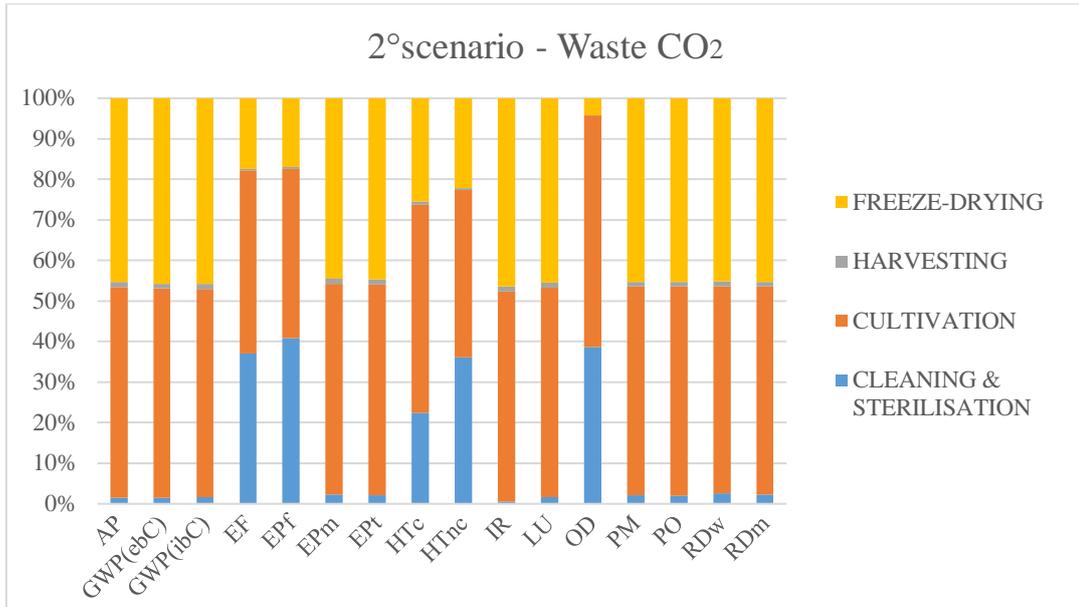


Figura 21: profilo ambientale degli impatti relativi allo scenario con CO₂ di scarto.

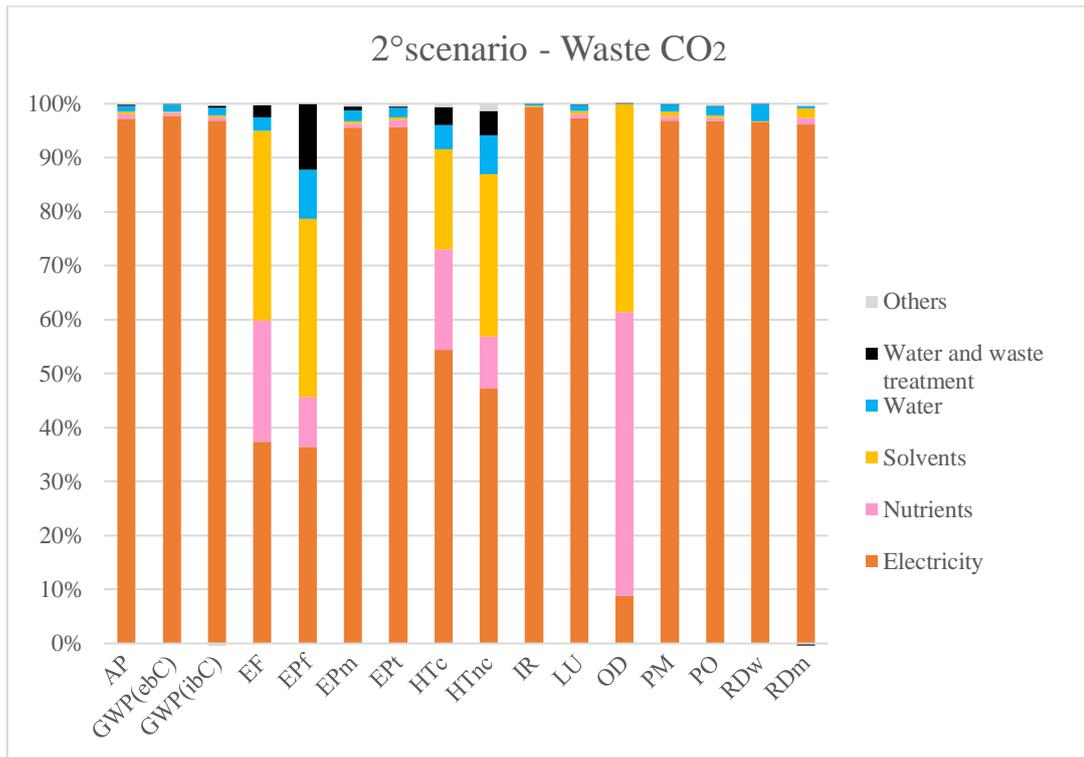


Figura 22: profilo ambientale degli impatti relativi ai processi di produzione, scenario con la CO₂ sintetica.

Le sperimentazioni su *Phaeodactylum tricornutum* hanno dimostrato che la CO₂ di scarto, proveniente dal processo di upgrading del biogas a biometano, non solo non inibisce la crescita, ma al contrario la stimola; infatti la produttività risulta maggiore rispetto a quella

della coltura insufflata con CO₂ pura. È evidente che tale risultato necessita di conferma tramite ulteriori test su scala maggiore.

È ormai dimostrato da numerosi studi che insufflare le colture algali con CO₂ comporta un incremento della produttività rispetto ad una situazione con solo aria, indipendentemente dalla purezza ed origine della CO₂ (Cuellar-Bermudez et al., 2015).

Inoltre, sulla base dei risultati di sperimentazioni su coltivazioni algali con reflui gassosi contenenti CO₂ provenienti da altri processi produttivi, si può affermare che l'anidride carbonica in sé non inibisce la crescita. Si deve comunque tener presente che, in queste sperimentazioni il contenuto di CO₂ risultava nettamente inferiore (6-13%) rispetto al caso dell'off-gas da upgrading (circa 90%) considerato per questa tesi (Dochua et al., 2005) (Yoshihara et al., 1996).

Invece, il problema derivante dall'utilizzo di flussi di scarto è legato alla presenza, oltre che della CO₂, di eventuali sostanze pericolose come NO_x, SO_x e metalli pesanti che possono essere accumulati dall'alga.

Nel caso di una produzione a scopi energetici, la contaminazione da parte di sostanze nocive può essere accettabile, finché non venga inficiata la produttività, mentre per applicazioni nell'industria chimica, cosmetica, alimentare, ecc., la qualità della biomassa è fondamentale, quindi è importante che il flusso di CO₂ non contenga tali sostanze contaminanti. Ciò nonostante gli studi raramente danno indicazioni sui parametri qualitativi della biomassa, eccezion fatta per alcune indicazioni sul contenuto lipidico, su cui comunque si trovano risultati discordanti (incremento in Lizzul et al., (2014), decremento in Chiu et al. (2011)).

L'off-gas di scarto dal processo di upgrading del biogas a biometano, utilizzato per le sperimentazioni con *Phaeodactylum tricorutum*, aveva una composizione di circa 90% CO₂, 10% di CH₄ e residui di O₂ e H₂S. Quindi, in questo caso specifico, considerata anche la provenienza del flusso, ci si può aspettare che siano assenti particolari sostanze nocive, sebbene rimanga necessario verificare sperimentalmente che la qualità della biomassa prodotta sia idonea ad applicazioni quali l'estrazione di composti bioattivi per i settori alimentare, cosmetico, farmaceutico ecc.

Quindi, comprovate la buona produttività algale e la qualità del prodotto finale ottenuto con l'utilizzo della CO₂ non industriale, che dovrà almeno essere comparabile al livello

raggiunto con la CO₂ sintetica, sarà in ogni caso necessario verificare che la normativa permetta di effettuare la coltivazione con CO₂ di scarto.

A tal proposito non esiste ancora una normativa riguardante l'utilizzo della CO₂ per la coltivazione microalgale a scopo alimentare, ma solo per l'utilizzo del diossido di carbonio nel settore alimentare. Innanzitutto, la biomassa algale non può essere insufflata con un reflu che contenga composti potenzialmente dannosi per la salute umana, quindi attualmente si fa riferimento agli stessi limiti imposti per la produzione nel settore alimentare, ovvero CO₂ al 99,8% (Rivoira) (SOL Group).

Nel caso specifico della coltivazione di *Phaeodactylum tricornutum*, si potrebbe comunque sfruttare il flusso di CO₂ di scarto, in quanto è un'alga con numerose applicazioni in campo agricolo e cosmetico, per le quali non è necessario il rispetto delle caratteristiche stringenti specifiche del settore alimentare.

3.3- Analisi comparativa

I risultati dell'analisi comparativa (Figura 23) tra i due casi mostrano chiaramente che gli impatti per lo scenario "waste CO₂" sono inferiori del 10-15% rispetto a quello "synthetic CO₂". Questa differenza è dovuta all'assenza del processo di produzione dell'anidride carbonica, perché nel secondo scenario la CO₂ di scarto non ha impatti associati alla sua produzione, essendo un rifiuto di un altro processo produttivo, ossia quello di upgrading del biogas. Inoltre, la produttività è leggermente superiore nel secondo caso (0,065 g/(Lgiorno) anziché 0,056 g/(Lgiorno)), quindi gli impatti, a parità di biomassa prodotta, risultano maggiori nel primo scenario.

I due scenari si differenziano anche per il tragitto percorso dai camion che trasportano le bombole di anidride carbonica dall'impianto di sintesi a quello di coltivazione microalgale, 500 km nello scenario con CO₂ sintetica e 100 km in quello con CO₂ di scarto. Tuttavia, come si può vedere dai grafici (Figura 20 e Figura 22), il peso del processo di trasporto, che rientra nella categoria "others", è trascurabile, quindi questa differenza di chilometraggio non influisce particolarmente.

Si nota che per la categoria d'impatto di GWP l'utilizzo di CO₂ di scarto comporta un miglioramento più ampio, dovuto al fatto che le emissioni dirette di CO₂ derivanti dal processo di coltivazione derivano da un flusso di CO₂ biogenica.

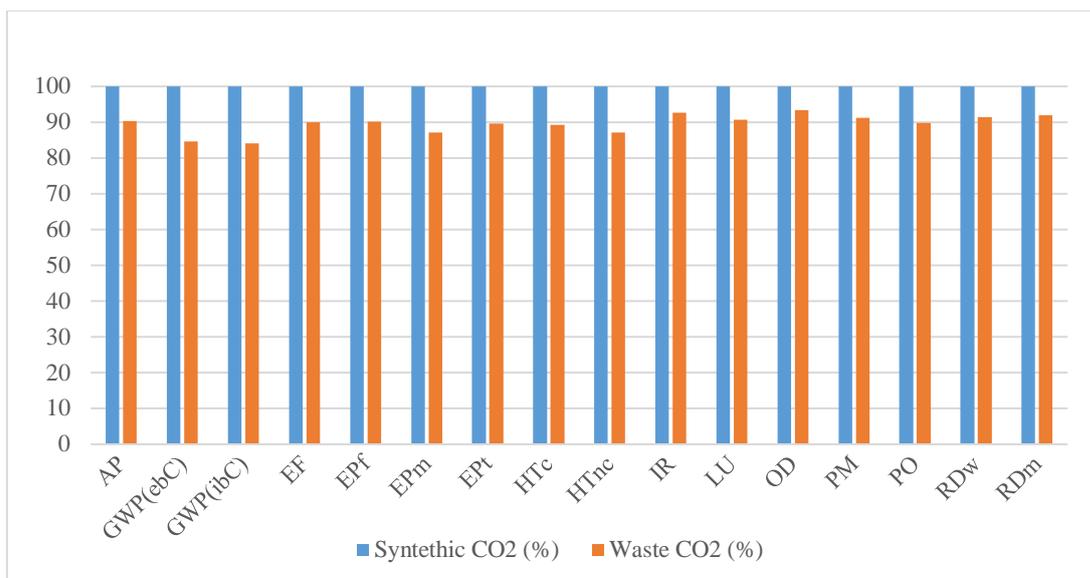


Figura 23: confronto degli impatti complessivi dei due scenari.

3.4- Risultati dell'analisi di sensitività

La Tabella 7 presenta i risultati dell'analisi di sensitività, rappresentati anche nel grafico in Figura 24, nello specifico sono riportate le variazioni percentuali degli indicatori per ciascuna categoria d'impatto corrispondenti alla variazione dei parametri (mix elettrico, produttività, ricircolo e ipoclorito di sodio).

Tabella 7: risultati dell'analisi di sensitività.

Impact category	Unit	Rif.	Solvente per la sanificazione	Ricircolo del terreno di coltura	Produttività biomassa algale		Fonte di energia elettrica
			- 80% NaClO	100% ricircolo	Produttività -5%	Produttività +63%	75% fotovoltaico
AP	Mole of H+ eq	1,13E+00	-0,38%	-0,44%	3,0%	-22%	-60%
GWP(ebC)	kg CO2 eq	3,78E+02	-0,20%	-0,25%	3,2%	-23%	-59%
GWP(ibC)	kg CO2 eq	3,79E+02	-0,18%	-0,43%	3,1%	-23%	-60%
EF	CTUe	2,77E+01	-30%	-11%	3,2%	-24%	42%
EPf	kg P eq	2,32E-03	-28%	-15%	3,4%	-25%	-23%
EPm	kg N eq	2,32E-01	-0,34%	-0,82%	3,1%	-23%	-58%
EPT	Mole of N eq	2,30E+00	-0,31%	-0,59%	3,0%	-22%	-58%
HTc	CTUh	5,05E-07	-16%	-12%	3,0%	-22%	62%
HTnc	CTUh	2,41E-06	-24%	-7,6%	3,5%	-26%	232%
IR	kBq U235 eq	1,49E+02	-0,10%	-0,03%	3,0%	-22%	-72%
LU	kg C deficit eq	2,16E+02	-0,50%	-0,28%	3,0%	-22%	-65%
OD	kg CFC-11 eq	1,68E-07	-34%	-17%	2,5%	-18%	-6,3%
PM	kg PM2,5 eq	5,23E-02	-0,68%	-0,44%	3,0%	-22%	-40%
PO	kg NMVOC	5,96E-01	-0,34%	-0,39%	3,0%	-22%	-56%
RDw	m³ eq	2,33E+01	-0,04%	-0,68%	3,0%	-22%	-69%
RDm	kg Sb eq	1,36E-03	-1,6%	-0,04%	3,0%	-22%	400%

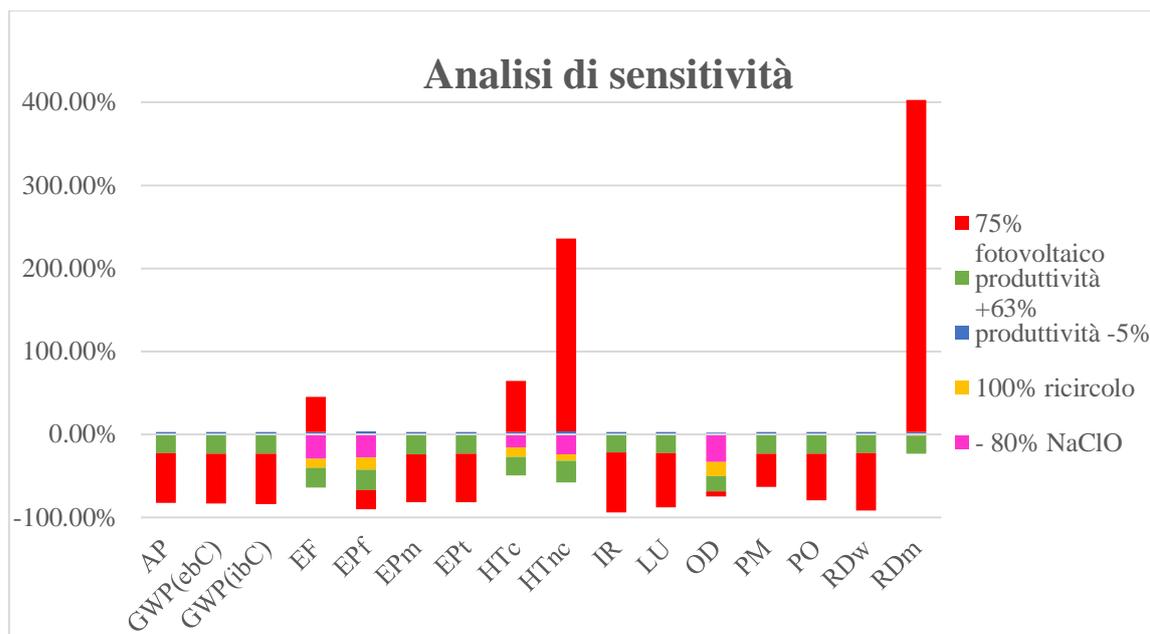


Figura 24: risultati dell'analisi di sensitività.

Per buona parte delle categorie d'impatto, il parametro a maggior sensitività è il mix elettrico, nello specifico l'ipotesi di introdurre una quota pari al 75% di fotovoltaico consente di ridurre in maniera decisiva l'impatto per una serie di categorie: IR (-72%), RDw (-69%), LU (-65%), AP, GWP, EPt e EPm (di circa -60%), PO (-56%) e PM (-40%). Tuttavia, allo stesso tempo utilizzando la stessa soluzione si osserva un peggioramento per alcune categorie d'impatto: EF (+42%), HTc (+62%), HTnc (+232%), RDm (+400%); per quest'ultime l'impatto è rispettivamente triplicato e quintuplicato. Ciò è probabilmente dovuto ai materiali utilizzati per le realizzazione dei pannelli fotovoltaici.

Infine, per EPf (-23%) e OD (-6%) si nota una riduzione, anche se più contenuta: ciò significa che il parametro "mix elettrico" per queste categorie d'impatto ha una media sensitività.

La produttività ha un'alta sensitività in tutte le categorie d'impatto anche se minore rispetto al mix elettrico. In particolare si osserva che nella situazione di produttività maggiore di quelle valutate (+63% rispetto allo scenario di riferimento) si ha una riduzione degli impatti tra -18% e -26%.

Il parametro connesso al riciccolo ha una media sensitività per cinque categorie d'impatto: OD (-17%), EPf (-15%), HTc (-12%), EF (-11%), e HTnc (-7%), mentre assume una bassa sensitività per tutte le altre.

Anche il parametro dell'ipoclorito di sodio ha una moderata sensibilità sulle medesime categorie d'impatto: OD (-34%), EF (-30%), EPf (-28%), HTnc (-24%) e HTc (-16%). La riduzione del quantitativo di ipoclorito di sodio e l'introduzione di un ricircolo completo del terreno di coltura influiscono sulle stesse categorie d'impatto dove la sanificazione e le preparazioni del terreno di coltura assumevano importanza. Quindi ridurre la quantità di ipoclorito utilizzata e inserire un ricircolo completo sono due possibilità per ridurre gli impatti provocati dalla produzione dei solventi per la sanificazione e dei nutrienti per il terreno di coltura.

In conclusione, con opportuni accorgimenti è possibile ridurre gli impatti connessi a tale sistema produttivo: riduzione del quantitativo di solventi di lavaggio, impostazione di un ricircolo completo e utilizzo di una percentuale di energia da fonte fotovoltaica. In particolare, nella maggior parte delle categorie d'impatto è possibile raggiungere un miglioramento del 60-70%, fatta eccezione per EF, HTxc, HTnc e RDm dove si osserva un peggioramento dovuto all'introduzione di un'importante quota di fotovoltaico.

4- Conclusioni

L'obiettivo della tesi era valutare la sostenibilità ambientale del processo di coltivazione di *Phaeodactylum tricornutum*, applicando l'approccio LCA per mezzo del software GaBi. Nello specifico è stata condotta un'analisi comparativa tra l'utilizzo di CO₂ pura e CO₂ di scarto proveniente dal processo di upgrading del biogas a biometano, al fine di osservare le differenze negli impatti ambientali dei due scenari.

Dallo studio è emerso che l'utilizzo della CO₂ di scarto dal processo di upgrading in alternativa a quella sintetica può portare ad una riduzione significativa degli impatti ambientali. Le riduzioni variano da un minimo del 7% per la categoria d'impatto OD ad un massimo del 16% per la categoria GWP. Tale miglioramento della prestazione ambientale è dovuto a due fattori ossia all'assenza del processo di produzione dell'anidride carbonica e degli impatti associati e all'aumento della produttività nello scenario con la CO₂ di scarto. Tuttavia, bisogna tener presente che la possibilità e il livello di crescita dell'alga possono variare in funzione della composizione del gas di scarto contenente CO₂ che a sua volta dipende dal processo e dall'impianto da cui deriva.

Inoltre, l'utilizzo di CO₂ di scarto nella coltivazione microalgale, anche se consente di migliorare la produttività, deve essere supportato da analisi qualitative della biomassa prodotta che dimostrino il raggiungimento degli standard di qualità voluti.

Dai risultati dell'analisi di sensitività si può affermare che una possibilità di ridurre in maniera importante gli impatti deriva dalla scelta del mix elettrico, ad esempio dall'introduzione di una quota di fotovoltaico autoprodotta, e da un aumento della produttività, potenzialmente ipotizzabile osservando i risultati riportati da altri studi.

In conclusione, si può affermare che l'utilizzo di anidride carbonica di scarto dal processo di upgrading del biogas risulta una valida e possibile alternativa a quella sintetica, in quanto permette di migliorare la prestazione ambientale del processo produttivo senza ridurre la produttività. Tuttavia, la prestazione ambientale potrebbe essere ulteriormente migliorata agendo su altri fattori chiave, quali la fonte di energia elettrica.

5- Bibliografia

- Abatzoglou, N., & Boivin, S. (2009). A review of biogas purification processes. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 3(1), 42-71. <https://doi.org/10.1002/bbb.117>
- Andriani, D., Wresta, A., Atmaja, T. D., & Saepudin, A. (2014). A review on optimization production and upgrading biogas through CO₂ removal using various techniques. *Appl Biochem Biotechnol*, 172(4), 1909–1928. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0652-x>
- Basu, S., Khan, A. L., Cano-Odena, A., Liu, C., & Vankelecom, I. F. J. (2010). Membrane-based technologies for biogas separations. *Chem. Soc. Rev.*, 39(2), 750–768. <https://doi.org/10.1039/B817050A>
- Bauer, F., Hulteberg, C., Persson, T., & Tamm, D. (2013). Biogas upgrading – Review of commercial technologies. *Swedish Gas Technology Centre, SGC*, 82. <https://doi.org/SGC Rapport 2013:270>
- Beggel, F., Nowik, I. J., Modigell, M., Shalygin, M. G., Teplyakov, V. V., & Zenkevitch, V. B. (2010). A novel gas purification system for biologically produced gases. *Journal of Cleaner Production*, 18 (1). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2010.06.015>
- Bitaubé Pérez, E., Caro Pina, I., & Pérez Rodríguez, L. (2008). Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 520–525. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.02.007>
- Borkowski, M. G., Zaimes, G. G., & Khanna, V. (2012). Integrating LCA and thermodynamic analysis for sustainability assessment of algal biofuels: Comparison of renewable diesel vs. biodiesel. In *IEEE International Symposium on Sustainable Systems and Technology*. <https://doi.org/10.1109/ISSST.2012.6227997>
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. In *Journal of Biotechnology* 70, 313–321. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8)
- Burlew, J. S. (1976). *Algal Culture From Laboratory To Pilot Plant*. Carnegie Institution of Washington Publication 600 Washington, D. C.
- Carneiro, M. L. N. M., Pradelle, F., Braga, S. L., Gomes, M. S. P., Martins, A. R. F. A., Turkovics, F., & Pradelle, R. N. C. (2017). Potential of biofuels from algae: Comparison with fossil fuels, ethanol and biodiesel in Europe and Brazil through life cycle assessment (LCA). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 73, 632-653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.152>
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A., & Malcata, F. X. (2006). Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress*, 22(6), 1490-1506. <https://doi.org/10.1021/bp060065r>
- Cheng, L., Zhang, L., Chen, H., & Gao, C. (2006). Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and Purification Technology*, 50(3), 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.12.006>
- Chrismadha T;Borowitzka, M. A. (1994). Effect of cell-density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum-tricornutum*

grown in a tubular photobioreactor. *Journal Of Applied Phycology*, 6(1), 67–74.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1007/BF02185906>

Commissione Europea, 2012. *L'innovazione per una crescita sostenibile: una bioeconomia per l'Europa*.

Collet, P., Hélias Arnaud, A., Lardon, L., Ras, M., Goy, R. A., & Steyer, J. P. (2011). Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology*, 102(1), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.154>

Collotta, M., Busi, L., Champagne, P., Mabee, W., Tomasoni, G., & Alberti, M. (2016). Evaluating microalgae-to-energy -systems: different approaches to life cycle assessment (LCA) studies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 10(6), 883-895 <https://doi.org/10.1002/bbb.1713>

Cuellar-Bermudez, S. P., Garcia-Perez, J. S., Rittmann, B. E., & Parra-Saldivar, R. (2015). Photosynthetic bioenergy utilizing CO₂: An approach on flue gases utilization for third generation biofuels. *Journal of Cleaner Production*, 98, 53–65.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.03.034>

Daniela Thrän, E. B., Tobias Persson, Mattias Svensson , Jaqueline Daniel-Gromke, Jens Ponitka, M. S., & Baldwin, J. (2014). *Biomethane Status and Factors Affecting Market Development and Trade*, 1, 1-92. *IEA Bioenergy*. Retrieved from <http://www.iea-biogas.net/files/daten-redaktion/download/Technical>

Desbois, A. P., Lebl, T., Yan, L., & Smith, V. J. (2008). Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), 755–764. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1714-9>

Doucha, J., Straka, F., & Lívanský, K. (2005). Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 17(5), 403–412. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-8701-7>

European Commission -- Joint Research Centre -- Institute for Environment and Sustainability. (2010). *International Reference Life Cycle Data System (ILCD) Handbook -- General guide for Life Cycle Assessment -- Detailed guidance. Constraints*. <https://doi.org/10.2788/38479>

Fariad, M., Samer, M., Abdelsalam, E., Yousef, R. S., Attia, Y. A., & Ali, A. S. (2017). Biodiesel production from microalgae: Processes, technologies and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.199>

Frischknecht, R., Steiner, R., & Jungbluth, N. (2009). *The Ecological Scarcity Method – Eco-Factors 2006. A method for impact assessment in LCA. Environmental Studies No. 0906*.
<https://doi.org/citeulike-article-id:12461602>

Gazzetta Ufficiale, 2006. *Decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152*. Decreto legislativo.

Gazzetta Ufficiale, 2014. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Naseri, A. T., Montazeri-Najafabady, N., Mobasher, M. A., & Dabbagh, F. (2012). Microalgae biofuel potentials (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(2), 126–144. <https://doi.org/10.1134/S0003683812020068>

- Greco, S. L., Wilson, A. M., Spengler, J. D., & Levy, J. I. (2007). Spatial patterns of mobile source particulate matter emissions-to-exposure relationships across the United States. *Atmospheric Environment*, *41*(5), 1011–1025. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.09.025>
- Grima, E. M., Pérez, J. A. S., Camacho, F. G., Sevilla, J. M. F., & Fernández, F. G. A. (1996). Productivity analysis of outdoor chemostat culture in tubular air-lift photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, *8*(4–5), 369–380. <https://doi.org/10.1007/BF02178580>
- Guinée, J. B., Heijungs, R., Huppes, G., Kleijn, R., de Koning, A., van Oers, L., ... Gorrée, M. (2002). life cycle assessment. Operational guide to the ISO standards. I: LCA in perspective. Ila: Guide. Iib: Operational annex. III: Scientific background. *The Netherlands: Ministry of ...*, 692. <https://doi.org/10.1007/BF02978784>
- Handler, R. M., Canter, C. E., Kalnes, T. N., Lupton, F. S., Kholiqov, O., Shonnard, D. R., & Blowers, P. (2012). Evaluation of environmental impacts from microalgae cultivation in open-air raceway ponds: Analysis of the prior literature and investigation of wide variance in predicted impacts. *Algal Research*, *1*(1), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.02.003>
- Huguen, P., Le Saux, G., Beil, M., Cagnon, F., Greninger, A., Wellinger, A., & Bravin, F. (2010). Perspectives for a european standard on biomethane: a biogasmax proposal. *Europe*, (December 2010), 27.
- Humbert, S. (2010). *Geographically differentiated life-cycle impact assessment of human health. Dissertation Abstracts International: Section B: The Sciences and Engineering*. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=psyh&AN=2010-99220-018&site=ehost-live>
- Illman, A. M., Scragg, A. H., & Shales, S. W. (2000). Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, *27*(8), 631–635. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00266-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00266-0)
- International Standard Organization. (2006). ISO 14044, Environmental management — Life cycle assessment — Requirements and guidelines. *Environmental Management*, *2006*, 54. <https://doi.org/10.1136/bmj.332.7555.1418>
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E. A., Embiruçu, M., & Ghirardi, M. L. (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, *101*(4), 1406–1413. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.038>
- Kao, C. Y., Chiu, S. Y., Huang, T. T., Dai, L., Hsu, L. K., & Lin, C. S. (2012). Ability of a mutant strain of the microalga Chlorella sp. to capture carbon dioxide for biogas upgrading. *Applied Energy*, *93*, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.12.082>
- Khoo, H. H., Sharratt, P. N., Das, P., Balasubramanian, R. K., Narahariseti, P. K., & Shaik, S. (2011). Life cycle energy and CO₂ analysis of microalgae-to-biodiesel: Preliminary results and comparisons. *Bioresource Technology*, *102*(10), 5800–5807. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.055>
- Kim, S., Choi, K., & Chung, J. (2013). Reduction in carbon dioxide and production of methane by biological reaction in the electronics industry. *International Journal of Hydrogen Energy*, *38*(8), 3488–3496. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.007>

- Kinsella, J. E., Lokesh, B., & Stone, R. A. (1990). Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *52*(1), 1–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2193500>
- Leaf, A., Xiao, Y. F., Kang, J. X., & Billman, G. E. (2003). Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Pharmacology and Therapeutics*, *98*(3), 355–377.
- Lebeau, T., & Robert, J.-M. (2003). M I N I - R E V I E W Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. *Appl Microbiol Biotechnol*, *60*, 612–623. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1176-4>
- Leonzio, G. (2016). Upgrading of biogas to bio-methane with chemical absorption process: Simulation and environmental impact. *Journal of Cleaner Production*, *131*, 364–375. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.05.020>
- Lewin, J. C. (1958). The Taxonomic Position of *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of General Microbiology*, *18*(2), 427–432. <https://doi.org/10.1099/00221287-18-2-427>
- Lindberg, A., & Rasmuson, A. C. (2006). Selective desorption of carbon dioxide from sewage sludge for in situ methane enrichment--part I: pilot-plant experiments. *Biotechnology and Bioengineering*, *95*(5), 794–803. <https://doi.org/10.1002/bit.21015>
- Liu, J., & Hu, Q. (2013). *Chlorella*: Industrial Production of Cell Mass and Chemicals. In *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (pp. 327–338). <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch16>
- López, J. C., Quijano, G., Souza, T. S. O., Estrada, J. M., Lebrero, R., & Muñoz, R. (2013). Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: State of the art and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4734-z>
- Lozanovski, A., Lindner, J. P., & Bos, U. (2014). Environmental evaluation and comparison of selected industrial scale biomethane production facilities across Europe. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, *19*(11), 1823–1832. <https://doi.org/10.1007/s11367-014-0791-5>
- Luo, G., Wang, W., & Angelidaki, I. (2014). A new degassing membrane coupled upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor to achieve in-situ biogas upgrading and recovery of dissolved CH₄ from the anaerobic effluent. *Applied Energy*, *132*, 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.07.059>
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., & Miyashita, K. (2005). Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *332*(2), 392–397. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.002>
- Martino, V. Di. (2015). Colture indoor di microalghe finalizzate alla produzione di biomasse da destinare a produzioni zootecniche e..., (March).
- Massa, M., Buono, S., Langellotti, A. L., Castaldo, L., Martello, A., Paduano, A., ... Fogliano, V. (2017). Evaluation of anaerobic digestates from different feedstocks as growth media for *Tetrademus obliquus*, *Botryococcus braunii*, *Phaeodactylum tricornutum* and *Arthrospira maxima*. *New Biotechnology*, *36*, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.007>

- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217-232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Milà I Canals, L., Bauer, C., Depestele, J., Dubreuil, A., & Knuchel, R. F. (2007). Key elements in a framework for land use impact assessment within LCA. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 12(1), 5–15. <https://doi.org/10.1065/lca2006.05.250>
- Miltner, M., Makaruk, A., Krischan, J., & Harasek, M. (2012). Chemical-oxidative scrubbing for the removal of hydrogen sulphide from raw biogas: Potentials and economics. *Water Science and Technology*, 66(6), 1354–1360. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.329>
- Miyairi, S. (1995). CO₂ assimilation in a thermophilic cyanobacterium. *Energy Conversion and Management*, 36(6–9), 763–766. [https://doi.org/10.1016/0196-8904\(95\)00116-U](https://doi.org/10.1016/0196-8904(95)00116-U)
- Monari, C., Righi, S., & Olsen, S. I. (2016). Greenhouse gas emissions and energy balance of biodiesel production from microalgae cultivated in photobioreactors in Denmark: A life-cycle modeling. *Journal of Cleaner Production*, 112, 4084–4092. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.08.112>
- Muñoz, R., & Guieysse, B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.011>
- Muñoz, R., Meier, L., Diaz, I., & Jeison, D. (2015). A review on the state-of-the-art of physical/chemical and biological technologies for biogas upgrading. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(4), 727–759. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9379-1>
- Nordberg, ??ke, Edstr??m, M., Uusi-Penttil??, M., & Rasmuson, ??ke C. (2012). Selective desorption of carbon dioxide from sewage sludge for in-situ methane enrichment: Enrichment experiments in pilot scale. *Biomass and Bioenergy*, 37, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.12.012>
- Nordlander, E., Olsson, J., Thorin, E., & Nehrenheim, E. (2017). Simulation of energy balance and carbon dioxide emission for microalgae introduction in wastewater treatment plants. *Algal Research*, 24, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.026>
- Patterson, T., Esteves, S., Dinsdale, R., & Guwy, A. (2011). An evaluation of the policy and techno-economic factors affecting the potential for biogas upgrading for transport fuel use in the UK. *Energy Policy*, 39(3), 1806–1816. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2011.01.017>
- PC, C. (2006). N-3 Polyunsaturated Fatty Acids, Inflammation, and Inflammatory Diseases. *Am J Clin Nutr*, 83:1505S-1.
- Pérez-López, P., de Vree, J. H., Feijoo, G., Bosma, R., Barbosa, M. J., Moreira, M. T., ... Kleinegris, D. M. M. (2017). Comparative life cycle assessment of real pilot reactors for microalgae cultivation in different seasons. *Applied Energy*, 205, 1151–1164. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.08.102>
- Pérez-López, P., González-García, S., Allewaert, C., Verween, A., Murray, P., Feijoo, G., & Moreira, M. T. (2014). Environmental evaluation of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum*. *The Science of the Total Environment*, 466–467, 991–1002. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.105>

- Pérez-López, P., González-García, S., Ulloa, R. G., Sineiro, J., Feijoo, G., & Moreira, M. T. (2014). Life cycle assessment of the production of bioactive compounds from *Tetraselmis suecica* at pilot scale. *Journal of Cleaner Production*, *64*, 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.07.028>
- Persson, M. (2003). Evaluation of Upgrading Techniques for Biogas. *Environmental Engineering*, (October). <https://doi.org/SGC142>
- Petersson, A., & Wellinger, A. (2009). Biogas upgrading technologies—developments and innovations. *IEA Bioenergy*, *20*. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.09.003>
- Raven, J. A., Cockell, C. S., & De La Rocha, C. L. (2008). The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *363*(1504), 2641–2650. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0020>
- Raymont, J. E. G., & Adams, M. N. E. (1958). Studies on the Mass Culture of *Phaeodactylum*. *Limnology and Oceanography*, *III*(2). <https://doi.org/http://dx.doi.org/>
- Reboloso-fuentes, M. M., Navarro-pÉrez, A., Ramos-miras, J. J., & Guil-guerrero, J. L. (2001). Biomass nutrient profiles of the microalga *Phaeodactylum Tricornutum*. *Journal of Food Biochemistry*, *25*(1), 57–76. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2001.tb00724.x>
- Rodríguez, R., Espada, J. J., Moreno, J., Vicente, G., Bautista, L. F., Morales, V., ... Dufour, J. (2017). Environmental analysis of *Spirulina* cultivation and biogas production using experimental and simulation approach. *Renewable Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.05.076>
- Ross, B. M., Seguin, J., & Sieswerda, L. E. (2007). Omega-3 fatty acids as treatments for mental illness: which disorder and which fatty acid? *Lipids in Health and Disease*, *6*(1), 1-21. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-21>
- Ryckebosch, E., Drouillon, M., & Vervaeren, H. (2011). Techniques for transformation of biogas to biomethane. *Biomass and Bioenergy*, *35*(5), 1633-1645. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.033>
- Sánchez Mirón, A., Cerón García, M. C., Contreras Gómez, A., García Camacho, F., Molina Grima, E., & Chisti, Y. (2003). Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, *16*(3), 287–297. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00072-X)
- Serejo, M. L., Posadas, E., Boncz, M. A., Blanco, S., García-Encina, P., & Muñoz, R. (2015). Influence of biogas flow rate on biomass composition during the optimization of biogas upgrading in microalgal-bacterial processes. *Environmental Science and Technology*, *49*(5), 3228–3236. <https://doi.org/10.1021/es5056116>
- Seigné Itoiz, E., Fuentes-Grünwald, C., Gasol, C. M., Garcés, E., Alacid, E., Rossi, S., & Rieradevall, J. (2012). Energy balance and environmental impact analysis of marine microalgal biomass production for biodiesel generation in a photobioreactor pilot plant. *Biomass and Bioenergy*, *39*, 324–335. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.01.026>
- Shi, X. M., & Chen, F. (1999). Production and rapid extraction of lutein and the other lipid-soluble pigments from *Chlorella protothecoides* grown under heterotrophic and mixotrophic

conditions. *Nahrung - Food*, 43(2), 109–113. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3803\(19990301\)43:2<109::AID-FOOD109>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3803(19990301)43:2<109::AID-FOOD109>3.0.CO;2-K)

Silva Benavides, A. M., Torzillo, G., Kopecký, J., & Masojídek, J. (2013). Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass and Bioenergy*, 54, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.03.016>

Sinnott, R. K. (2005). *Coulson & Richardson's Chemical Engineering Design*. ELSEVIER - *Coulson & Richardson's Chemical Engineering series* (Vol. 6). [https://doi.org/10.1016/S1385-8497\(00\)00184-4](https://doi.org/10.1016/S1385-8497(00)00184-4)

Smetana, S., Sandmann, M., Rohn, S., Pleissner, D., & Heinz, V. (2017). Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment. *Bioresource Technology*, 245, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.113>

Strevett, K. A., Vieth, R. F., & Grasso, D. (1995). Chemo-autotrophic biogas purification for methane enrichment: mechanism and kinetics. *The Chemical Engineering Journal and The Biochemical Engineering Journal*, 58(1), 71–79. [https://doi.org/10.1016/0923-0467\(95\)06095-2](https://doi.org/10.1016/0923-0467(95)06095-2)

Thies, F., Garry, J. M. C., Yaqoob, P., Rerkasem, K., Williams, J., Shearman, C. P., ... Grimble, R. F. (2003). Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet*, 361(9356), 477–85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12468-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12468-3)

Tredici, M. R. (2004). Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 178–214). <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch9>

Tredici, M. R., & Zittelli, G. C. (1998). Efficiency of sunlight utilization: Tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 57(2), 187–197. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980120\)57:2<187::AID-BIT7>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980120)57:2<187::AID-BIT7>3.0.CO;2-J)

Tynell, Å., Börjesson, G., & Persson, M. (2007). Microbial growth on pall rings: A problem when upgrading biogas with the water-wash absorption technique. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 141(2–3), 299–319. <https://doi.org/10.1007/BF02729069>

van Oers, L., Koning, A. De, Guinée, J. B., & Huppes, G. (2002). Abiotic resource depletion in LCA. *Public Works and Water Management*, 1, 1–75. Retrieved from depletion; LCA; materials, minerals

Wang, B., Li, Y., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 707–718. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y>

Weinberg, J., Kaltschmitt, M., & Wilhelm, C. (2012). Analysis of greenhouse gas emissions from microalgae-based biofuels. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2(2), 179–194. <https://doi.org/10.1007/s13399-012-0044-4>

Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2010). An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science*, 329(5993), 796–799. <https://doi.org/10.1126/science.1189003>

- Xu, L., Wim Brilman, D. W. F., Withag, J. A. M., Brem, G., & Kersten, S. (2011). Assessment of a dry and a wet route for the production of biofuels from microalgae: Energy balance analysis. *Bioresource Technology*, *102*(8), 5113–5122. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.066>
- Yoshihara, K. I., Nagase, H., Eguchi, K., Hirata, K., & Miyamoto, K. (1996). Biological elimination of nitric oxide and carbon dioxide from flue gas by marine microalga NOA-113 cultivated in a long tubular photobioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *82*(4), 351–354. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89149-5](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89149-5)
- Zendejas, F. J., Benke, P. I., Lane, P. D., Simmons, B. A., & Lane, T. W. (2012). Characterization of the acylglycerols and resulting biodiesel derived from vegetable oil and microalgae (*Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum*). *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(5), 1146–1154. <https://doi.org/10.1002/bit.24395>
- Zhang, K., Miyachi, S., & Kurano, N. (2001). Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: Effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *55*(4), 428–433. <https://doi.org/10.1007/s002530000550>
- Zhou, W., Li, Y., Min, M., Hu, B., Chen, P., & Ruan, R. (2011). Local bioprospecting for high-lipid producing microalgal strains to be grown on concentrated municipal wastewater for biofuel production. *Bioresource Technology*, *102*(13), 6909–6919. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.038>

6- Sitografia

- Bezzi, G., 2016. Le bioenergie in Italia: l'esperienza del modello BiogasDoneRight. [Online] Available at: [HYPERLINK "http://www.globalbioenergy.org/fileadmin/user_upload/gbep/docs/2016_events/Tavola_Rotonda_Italia_18_March_2016/14.BEZZI.pdf"](http://www.globalbioenergy.org/fileadmin/user_upload/gbep/docs/2016_events/Tavola_Rotonda_Italia_18_March_2016/14.BEZZI.pdf) [Accessed 29 agosto 2017].
- Biomether, 2012. [Online] Available at: [HYPERLINK "http://www.biomether.it/p/upgrading.html"](http://www.biomether.it/p/upgrading.html)
- CIB, 2016. Piattaforma biometano. [Online] Available at: [HYPERLINK "http://www.snam.it/export/sites/snam-rp/repository/media/energy-morning/allegati_energy_morning/20161110_1.pdf"](http://www.snam.it/export/sites/snam-rp/repository/media/energy-morning/allegati_energy_morning/20161110_1.pdf) [Accessed agosto 2017].
- Dale, B., 2015. Biogasdoneright, Anaerobic digestion and Soil Carbon Sequestration A sustainable, low cost, reliable and win win BECCS solution. [Online] Available at: [HYPERLINK "https://www.consorziobiogas.it/wp-content/uploads/2017/05/Biogasdoneright-No-VEC-Web.pdf"](https://www.consorziobiogas.it/wp-content/uploads/2017/05/Biogasdoneright-No-VEC-Web.pdf) [Accessed 28 agosto 2017].
- EBA, 2016. Biogas channel. [Online] Available at: [HYPERLINK "http://www.biogaschannel.com/it/news-ed-eventi/eba-secondo-gli-ultimi-dati-leuropa-conta-17376-im/94/"](http://www.biogaschannel.com/it/news-ed-eventi/eba-secondo-gli-ultimi-dati-leuropa-conta-17376-im/94/)
- EBA, 2016. EBA. [Online] Available at: [HYPERLINK "http://european-biogas.eu/2016/12/21/eba-launches-6th-edition-of-the-statistical-report-of-the-european-biogas-association/"](http://european-biogas.eu/2016/12/21/eba-launches-6th-edition-of-the-statistical-report-of-the-european-biogas-association/)
- European Commission, n.d. Green Paper on IPP, European Commission, Environment Industry, Integrated Product Policy. [Online] Available at: [HYPERLINK "http://ec.europa.eu/environment/ipp/2001developments.htm"](http://ec.europa.eu/environment/ipp/2001developments.htm)
- GoBioM, P., 2017. Progetto GoBioM. [Online] Available at: [HYPERLINK "http://gobiom.crpa.it/nqcontent.cfm?a_id=14093&tt=t_bt_app1_www"](http://gobiom.crpa.it/nqcontent.cfm?a_id=14093&tt=t_bt_app1_www)
- GSE, 2015. Biometano. [Online] Available at: [HYPERLINK "http://www.gse.it/it/Gas%20e%20servizi%20energetici/Biometano/Pagine/default.aspx"](http://www.gse.it/it/Gas%20e%20servizi%20energetici/Biometano/Pagine/default.aspx) [Accessed 26 agosto 2017].
- ISPRA, n.d. Politica Integrata dei Prodotti (IPP). [Online] Available at: [HYPERLINK "http://www.isprambiente.gov.it/it/temi/sviluppo-sostenibile/strumenti-per-lo-sviluppo-sostenibile/politica-integrata-dei-prodotti-ipp"](http://www.isprambiente.gov.it/it/temi/sviluppo-sostenibile/strumenti-per-lo-sviluppo-sostenibile/politica-integrata-dei-prodotti-ipp) [Accessed 20 settembre 2017].
- MBG, M.B.G., 2014. Micoperi Blue Growth. [Online] Available at: [HYPERLINK "http://www.micoperibg.eu/"](http://www.micoperibg.eu/) [Accessed 12 ottobre 2017].
- Micoperi, n.d. MICOPERI. [Online] Available at: [HYPERLINK "http://www.micoperi.com/it/profilo"](http://www.micoperi.com/it/profilo) [Accessed 12 ottobre 2017].
- Micoperi, n.d. MICOPERI. [Online] Available at: [HYPERLINK "http://www.micoperi.com/it"](http://www.micoperi.com/it) [Accessed 12 ottobre 2017].

- Ministro dello Sviluppo Economico, 2013. DM 5 2013. [Online] Available at: [HYPERLINK](#) "http://www.gse.it/it/Gas%20e%20servizi%20energetici/GSE_Documenti/Biometano/D M_5_12_2013_Biometano.pdf" [Accessed 26 agosto 2017].
- Rabl, A. & Spadaro, J.V., 2004. The RiskPoll software, version is 1.051. [Online] Available at: [HYPERLINK](#) "www.arirabl.com." [Accessed 2017].
- Rivoira, G., n.d. Anidride carbonica. [Online] Available at: [HYPERLINK](#) "http://www.rivoiragroup.it/it-it/gases/buy-liquid-or-compressed-carbon-dioxide-gas" [Accessed 16 novembre 2017].
- Snam, 2016. Piattaforma biometano. [Online] Available at: [HYPERLINK](#) "http://www.snam.it/export/sites/snam-rp/repository/media/energy-morning/allegati_energy_morning/20161110_1.pdf" [Accessed 29 agosto 2017].
- SOL Group, n.d. Anidride carbonica. [Online] Available at: [HYPERLINK](#) "http://www.sol.it/it/la-nostra-offerta/gas-e-prodotti-settore-industriale/gas/gas-principali/anidride-carbonica" [Accessed 16 novembre 2017].
- thinkstep, n.d. thinkstep GaBi. [Online] Available at: [HYPERLINK](#) "http://www.gabi-software.com/italy/software/gabi-software/gabi/" [Accessed 17 ottobre 2017].