



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00847

(22) Data de depozit: 03/12/2019

(41) Data publicării cererii:
30/06/2021 BOPI nr. 6/2021

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• VELEA SANDA, STR.ZAMBILELOR NR.6,
BL.60, ET.2, AP.5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO;
• GĂLAN ANA MARIA, ȘOS.SĂLAJ, NR.349,
BL.1, ET.5, AP.46, SECTOR 6, BUCUREȘTI,
B, RO;
• PAULENCO ANCA, STR.SÂNDULEȘTI,
NR.1, BL.Z11, SC.1, ET.10, AP.66,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU ȘI SISTEM DESCHIS DE CULTIVARE
A MICROALGELOR, INTEGRAT ÎN INSTALAȚIILE
DE BIOGAZ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de cultivare în două trepte a microalgelor, în condiții heterotrofe, utilizând ca mediu nutrient digestatul lichid provenit din instalațiile de biogaz și la un sistem deschis de cultivare a acestora, cu intensificarea procesului de creștere și a acumulării de lipide și fitocatalizatori în biomasa microalgală. Procedeu conform invenției valorifică total produsele și fluxurile secundare de fabricație ale instalațiilor de biogaz, astfel încât biomasa microalgală rezultată prin utilizarea ca mediu nutrient a digestatului lichid provenit din instalațiile de biogaz, după extracția de lipide și fitocatalizatori, este valorificată ca substrat în procesul de codigestie anaerobă, lipidele din biomasa microalgală, pretratată cu ultrasunete, fiind izolate prin extracție cu solvenți organici, în scopul utilizării acestora, în amestec cu digestatul solid, în procesul de piroliză termocatalitică, iar fitocatalizatorii extrași se

reutilizează pentru intensificarea procesului de codigestie anaerobă, procedeu realizând o reducere de 50% a conținutului de carbon organic, de peste 60% a conținutului de azot și de peste 90% a conținutului de fosfor din digestatul lichid după procesul de recoltare și concentrare a biomasei microalgale prin electrocoagulare și floculare, intensificarea procesului de creștere și a acumulării de lipide și de fitocatalizatori în biomasa microalgală realizându-se prin alternarea ciclurilor de 12 ore lumină/12 ore întuneric și alternarea iluminării cu lumină naturală și lumină artificială de culoare verde, obținându-se astfel o creștere de 40% a cantității de biomasă microalgală cu un conținut de lipide de 40...45% și un conținut de fitocatalizatori de 7% raportat la biomasa microalgală.

Revendicări: 5



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2019 847
Data depozit .. 03 - 12 - 2019 ..

PROCEDEU SI SISTEM DESCHIS DE CULTIVARE A MICROALGELOR, INTEGRAT IN INSTALATIILE DE BIOGAZ

Prezenta invenție se refera la un procedeu inovativ de cultivare in doua trepte a microalgelor, in conditii heterotrofe, cu utilizarea ca mediu nutrient a digestatului lichid provenit din instalatiile de biogaz si la un sistem deschis de cultivare a acestora, cu intensificarea procesului de crestere si a acumularii de lipide si fitocatalizatori in biomasa microalgala, prin iluminare alternativa cu lumina lumina naturala si artificiala de culoare verde.

Microalgele, organisme fotosintetizatoare cunoscute pentru abilitatea lor de a sechestra durabil dioxidul de carbon, sunt studiate intens in ultimii 20 de ani pentru potentialul lor ca bioresurse alternative pentru energii regenerabile. Este cunoscuta capabilitatea lor de a creste in diferite medii, apa de mare, apa dulce, ape reziduale si de a produce, intra si extracelular, un mare numar de componente bioactive valoroase cum ar fi lipide, antioxidanti, pigmenti, proteine, vitamine, steroli, toxine. si carbohidrati (Microalgae, a Potential Natural Functional Food source – a Review, Angélica Villarruel-López, Felipe Ascencio, Karla Nuño , Pol. J. Food Nutr. Sci. 2017;67(4):251–263,)

In conformitate cu cele mai recente evaluari tehnico-economice si ale ciclului de viata, ridicarea la scara a cultivarii si valorificarii biomasei microalgale poate fi rentabila numai in cadrul conceptului integrat de biorafinare (Bioresource Technology, vol.229, apr.2017,53-62).

Cultivarea si valorificarea integrata a biomasei microalgale rezultata din sisteme de crestere care utilizeaza ca mediu nutrient digestatul lichid provenit din instalatiile de biogaz reprezinta o optiune eficienta de reciclare si de utilizare a nutrientilor din apele reziduale. Digestatul lichid are o mare concentratie de nutrienti, in special carbon, azot, fosfor, potasiu, sulf, iar utilizarea acestuia ca mediu de cultura pentru microalge conduce la o crestere importanta a cantitatii de biomasa algala, prin efectul stresului exercitat de excesul de azot, si la reducerea semnificativa a costurilor legate de prepararea nutrientilor. Cultivarea microalgelor in digestatul lichid provenit din instalatiile de biogaz ofera avantaje semnificative in procesul de epurare a apelor reziduale si obtinerea concomitenta de biomasa microalgala valorificabila.

Compozitia biochimica a microalgelor este influentata de conditiile de cultura si anume, in cazul ciclurilor de 12 ore lumina /12 ore intuneric se observa o asimilare pronuntata a azotului in perioada de intuneric, in timp ce macronutrientii si pigmentii se acumuleaza in



perioada ciclului de lumina (Rodrigues, D.B. et al. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. Food Res.Int. 65, 144–148, 2014)

Limitarea nutrientilor, in special privarea de azot conduce la scaderea continutului de proteine, cresterea continutului de carbohidrati si polizaharide, dar si la inhibarea fotosintezei, respectiv la scaderea productiei de biomasa algala.

In general, o intensa iradiere luminoasa concomitenta cu privarea de azot sau fosfor conduce la cresterea continutului de lipide, in timp ce o iradiere luminoasa scazuta conduce la acumularea de fosfolipide si glicolipide. Stresul prin privare de nutrienti conduce, de asemenea, la generarea de radicali liberi si la schimbarea structurii de antioxidanti. Carotenoidele primare ca beta-caroten, clorofila, violaxantina si vaucherixantina se sintetizeaza in conditii normale de cultivare, in timp ce carotenoidele secundare se produc in conditii de stress de privare de azot.

Utilizarea digestatului lichid provenit din instalatiile de biogaz pentru prepararea mediului nutrient de crestere a tulpinii *Chlorella* sp a condus la concluzii utile referitoare la influenta raportul C/N din digestat asupra compozitiei biomasei algale rezultate (Debowski, M. et al. (2016) The influence of anaerobic digestion effluents (ADEs) used as the nutrient sources for *Chlorella* sp.cultivation on fermentative biogas production. Waste Biomass Valoriz. 8, 1153–1161)

O abordare holistica a fabricarii biogazului include integrarea unui sistem deschis de cultivare a microalgelor, nu numai din perspective valorificarii continutului decarbon, azot si fosfor din digestatul lichid ci si pentru cresterea eficientei fabricarii biogazului prin utilizarea biomasei microalgale ca sursa de fitocatalizatori pentru digestia anaeroba. (Enhancement of nutrient removal from swine wastewater digestate coupled to biogas purification by microalgae *Scenedesmus* spp. Bioresour. Technol. 202, 67–75).

Se cunosc procedee de cultivare a microalgelor, cu recircularea apei și a nutrienților, prin care se urmărește creșterea eficienței procesului de fotosinteză microalgală. Astfel, cererea de brevet de invenție WO2011/127167 se referă la un procedeu de recirculare a mediului nutrient de crestere rezultat dupa etapa de sedimentare/concentrare a biomasei microalgale. Procedeu propune reciclarea unei părți din mediul de cultura separat dupa faza de sedimentare a biomasei microalgale pentru a fi utilizat într-o noua etapa de cultură de microalgae.

Cererea de brevet WO 2010/123848 propune un procedeu de cultivare a microalgelor care au capacitatea de a crește pe ape industriale uzate suplimentate opțional cu CO₂ sau carbon



reprezentată de glucoză, zaharoză, fructoză, glicerol, metanol, acetat sau hidrolizat lignocelulozic, Cererea de brevet WO2012/035262 descrie un procedeu mixotrof de cultivare a algelor în prezența unei surse de lumină discontinuă, sub formă de flash-uri. Mediul de creștere este suplimentat cu diferite surse de carbon: 5 mM acetat, 5 g/l glucoză, 10 g/l lactoză, 10 g/l zaharoză și 5 g/l glicerol. Flash-urile de lumină, care sunt între 20 și 30 pe oră, au amplitudine egală sau superioară la 10 pEm-2s-1, și o durată cuprinsă între 20 secunde și 10 minute, Prin acest procedeu se acumulează cantități de biomasă cuprinse între 1,0 și 1,5 g/l, cu un conținut de lipide cu peste 30% mai ridicat decât cel din celulele acelorași alge cultivate autotrof, iar timpul de cultivare se reduce la mai puțin de 40 ore.

Brevetul de inventive US 2018/0119679 A1/03.05.2018 descrie un sistem simbiotic de cultivare a biomasei algale, în condiții heterotrofe, în care mediul de creștere ce conține carbon, azot și fosfor, separat după recoltarea biomasei algale este reutilizat în sistem de creștere heterotrof sau fotoautotrof, cu producere de biomasă algală și lipide pentru fabricarea biodieselului.

Invenția RO 130238 B1/2019 se referă la un procedeu de cultivare continuă a microalgelor, într-un sistem de două fotobioreactoare operate în cascadă, în ciclul autotrof – mixotrof, prin care se asigură recircularea apei și a unei părți din nutrienți. Biomasă algală, cultivată autotrof sau mixotrof, se separă din mediile de cultură prin electro-floculare și flotație. Prin electro-floculare sunt precipitați și unii dintre compușii organici a căror acumulare în mediul de cultură reduce productivitatea culturilor de microalge. Din biomasă algală se extrag lipidele, care se transesterifică la biodiesel. Mediul lichid recuperat din cultura autotrofă se utilizează, împreună cu glicerina brută recuperată de la trans-esterificare, și cu hidrolizatele de biomasă autotrofă, pentru cultivarea mixotrofă a algelor. Biomasă recalcitrantă la hidroliza enzimatică se convertește în biocărbune. Biocărbunele este utilizat pentru purificarea mediului lichid recuperat din ciclul de cultivare mixotrofă a algelor. Mediul lichid de la cultura mixotrofă, recuperat și purificat, se completează cu nutrienți minerali și este utilizat pentru cultivarea autotrofă a microalgelor. Din biomasă mixotrofă se obține un extract enzimatic cu acțiune complexă asupra plantelor de cultură.

Un dezavantaj comun al procedeelor descrise până în prezent este faptul că microalgele se cultiva în fotobioreactoare și/sau în bazine deschise, în care suplimentarea mediului de cultură se realizează prin adăugarea de compuși de sinteză chimică, în condițiile în care această suplimentare s-ar putea realiza prin reutilizarea fluxurilor secundare provenite din separarea



biomasei microalgale recoltate. Un alt dezavantaj este dat de faptul că suplimentarea se realizează predominant cu surse de carbon, în condițiile în care deficitul principal în producerea comercială de biocombustibili din micro-alge este cel al surselor de azot și fosfor (Chisti, 2013, J. Biotech., 167:2012-214).

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta invenție este aceea ca propune un procedeu și un sistem deschis de cultivare a microalgelor, în două trepte, în sistem heterotrof, integrat în instalația de biogaz, care utilizează ca mediu nutrient un amestec constituit din 1 parte digestat lichid rezultat din instalația de biogaz și 9 părți mediu nutrient recuperat de la faza de separare a biomasei microalgale recoltate zilnic, procedeu prin care se realizează recircularea mediului nutrient într-o nouă etapă de cultivare a microalgelor.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie un procedeu prin care se realizează valorificarea conținutului de carbon, azot și fosfor, din digestatul lichid rezultat din instalațiile de biogaz, prin utilizarea acestuia pentru prepararea mediului nutrient de creștere a microalgelor într-o nouă etapă de cultivare.

Un alt obiect al prezentei invenții este de a propune un procedeu de cultivare a algelor unicelulare în simbioză cu microorganismele provenite din co-digestia anaerobă a substraturilor organice suplimentate cu biomasa microalgala și/sau fitocatalizatori, compuși naturali constituiți din carotenoide și clorofila, extrasi din biomasa microalgala, care au rolul de a intensifica procesul de digestie anaerobă.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie un procedeu de intensificare a procesului de cultivare a microalgelor și de mărire a conținutului de lipide și fitocatalizatori în biomasa microalgala, prin aplicarea unor condiții dirijate de stress fizico-chimic prin alternarea ciclurilor de 12 ore iluminare naturală/artificială și a ciclurilor de 12 ore întuneric, care, în condițiile suplimentării mediului nutrient cu carbon, azot și fosfor din digestatul lichid, vor conduce la creșterea cu cca.40% a cantității de biomasa microalgala, precum și la creșterea cu cca.30% a conținutului de lipide.

Este un alt obiect al prezentei invenții de a descrie un procedeu de creștere a conținutului de fitocatalizatori, exprimat prin beta-caroten și clorofila, prin iradierea cu lumina artificială verde, în sistem pulsatoriu de câte 5-10 minute, la fiecare 30 minute de iluminare naturală.



Procedeeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

Cultivarea heterotrofa a microalgelor, într-un sistem deschis de cultivare, prevazut cu paleți de recirculare a suspensiei microalgale, și surse de lumina artificiala, pe un mediu nutritiv, care include, după primul ciclu de recoltare, mediu nutrient recuperat zilnic din suspensia microalgala supusa operatiilor de separare, in amestec 9:1 cu digestatul lichid evacuat zilnic din digester, dupa separarea acestuia prin filtrare/centrifugare de digestatul solid, și purificare pe carbune active.

Cultivarea heterotrofa a microalgelor in cicluri de 12 ore iluminare cu lumina naturala și, alternativ, cu lumina artificiala verde in sistem pulsatoriu, in flash-uri de 5-10 minute, la fiecare 30 de minute de iluminare in scopul intensificarii producerii de lipide și carotenoide primare, și 12 ore intuneric, in scopul asimilarii azotului, respectiv in scopul cresterii productiei de biomasa microalgala;

Recoltarea zilnica a unei cote de 10%, din suspensia de microalge, procesarea acesteia prin electro-coagulare și sedimentare, cu recuperarea mediului nutrient lichid și utilizarea acestuia, dupa purificare prin trecere pe carbune activ, in raport de 5 grame carbune activ la 1 litru de mediu nutrient recuperat, pentru prepararea amestecului de mediu nutrient cu cantitatea de digestat lichid recoltata zilnic și utilizarea amestecului pentru completarea mediului nutritiv de cultivare a microalgelor intr-o noua etapa.

Pretratarea cu ultrasunete a suspensiei concentrate de biomasa microalgala, extractia cu solventi organici polari a fitocatalizatorilor, extractia lipidelor microalgale cu amestec 2: 1 chloroform:methanol, valorificarea biomasei algale delipidizate/epuizate și a fitocatalizatorilor in procesul de codigestie anaeroba și utilizarea fractiei de lipide microalgale, in amestec cu digestatul solid recuperat, in procesul de piroliza pentru obtinerea de biochar și , ulei de piroliza ca aditiv pentru combustibil lichid usor.

Exemplele de realizare ale inventiei particularizeaza urmatoarele aspecte:

1. Pregătirea inoculului de tulpini de microalge, în mediu nutritiv Z sau BBM, în pahare Erlenmeyer, timp de 8-10 zile, la temperatura ambiantă, până la faza exponențială de creștere. Monitorizarea spectrofotometrica a extincției probelor recoltate zilnic pe lungimea de unda 678 nm a permis identificarea punctului de trecere de la faza creșterii inductive la perioada creșterii exponențiale a vitezei de creștere a masei algale a tulpinilor investigate. După atingerea fazei de



Adon

crestere exponentiala, inoculii au fost transferati in sistemul deschis de crestere la un raport volumetric de 1 volum inocul la 9 volume mediu nutritiv.

2. Cultivarea heterotrofa a microalgelor pe mediul mineral specific tulpinii algale care se cultiva, in bazin deschis, timp de 8 – 10 zile, pana la atingerea densitatii optice de 1,5-1,8 (determinata turbidimetric), cand se incepe recoltarea zilnica a 10% din volumul suspensiei microalgale, concomitent cu completarea sistemului cu mediu nutrient proaspat constituit din 1 parte de digestat lichid evacuat zilnic din digester si 9 parti mediu de crestere recuperat de la faza de recoltare zilnica a suspensiei microalgale. Prin procedeul propus se realizeaza reducerea cu peste 50% a concentratiei de carbon, cu 60 % a concentratiei de azot si cu 90% a concentratiei de fosfor, din digestatul lichid rezultat din instalatiile de biogaz, prin utilizarea acestuia pentru prepararea mediului nutrient de crestere a microalgelor intr-o noua etapa de cultivare,

3. Mentinerea parametrilor optimi de crestere, respectiv temperatura optima de crestere a microalgelor, in bazin deschis, este de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cu o fotoperioada de 12 ore, iluminat cu lumina solară, cu intensități care ating $800 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, suplimentată cu flash-uri de lumină verde cu intensitatea de $530 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, in fotoperioade de cate 5-10 minute la fiecare 30 minute.

4. Recoltarea biomasei microalgale evacuată zilnic, prin electrocoagulare, sedimentare/centrifugare si procesarea succesiva a acesteia in scopul extractiei fitocatalizatorilor si a fractiei lipidice cu solventi polari si, respectiv cu amestec cloroform:metanol, in raport 2 : 1;

5. Conversia, prin piroliza termocatalitica, în biocărbune și bio-ulei a digestatului solid separat din cota zilnica de digestat evacuat din digester, in amestec cu fracta lipidica extrasa din biomasa microalgala evacuată zilnic, dupa faza de electrocoagulare- concentrare/sedimentare.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

6. Monitorizarea zilnica a continutului de carbon organic, azot si fosfor din digestatul lichid rezultat din procesul de digestie anaeroba a substraturilor organice, precum si din mediu de crestere recoltat zilnic din sistemul deschis de cultivare a microalgelor arata in vederea eventualelor corectii ale mediului nutrient de cultivare a microalgelor cu nutrienți minerali, necesari in conditii standard, cu fotocolorimetrul Termoreactor Velp model ECO 8



Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- Reduce cu peste 50% continutul de carbon, cu 60 % continutul de azot și cu 90% continutul de fosfor din digestatul lichid rezultat din instalațiile de biogaz, prin utilizarea acestuia ca mediu nutrient de creștere a microalgelor;
- Asigură recircularea a peste 90% din apa utilizată pentru cultivarea micro-algelor, și reduce cu peste 50% consumul de nutrienți minerali;
- Crește, cu peste 40% continutul de biomasă microalgala în mediul nutrient de creștere, prin suplimentarea acestuia cu carbon organic, azot și fosfor;
- Crește, cu cca 30%, continutul de lipide microalgale, raportat la biomasă microalgala uscată, datorită suplimentării mediului de cultivare cu surse organice de carbon, azot și fosfor;
- Intensifică procesul intracelular de formare a fitocatalizatorilor, cu peste 40%, prin suplimentarea iluminării naturale cu flash-uri de lumină verde, cu intensitatea de $530 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, în fotoperioade de câte 5-10 minute la fiecare 30 minute;
- Favorizează adaptarea algelor cultivate heterotrof la condiții de mediu adverse, reprezentate de intensități mai ridicate ale iluminării și de concentrații ridicate de CO_2 în gazele de aerare a mediului de cultură, datorită prezentei de aminoacizi, precursori de fitohormoni;

Exemplu de realizare a invenției :

Tulpina algala utilizată este tulpina 424-1 de *Nannochloris* sp., provenită din colecția de tulpini a INCDCP-ICECHIM, depozitată sub numărul CCAP 251/10 la Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), SAM Research Services Ltd., Scottish Marine Institute, Argyll, UK. Inoculul necesar efectuării experimentului se prepară în pahare Erlenmeyer, timp de 8-10 zile, la temperatura ambiantă, până la faza exponențială de creștere. Monitorizarea spectrofotometrică a extincției probelor recoltate zilnic pe lungimea de undă 678 nm a permis identificarea punctului de trecere de la faza creșterii inductive la perioada creșterii exponențiale a vitezei de creștere a tulpinilor investigate. După atingerea fazei de creștere exponențială, inoculul a fost transferat în sistemul deschis de creștere la un raport volumetric de 1 volum inocul la 9 volume mediu nutritiv Zarrouk.

Se utilizează un sistem deschis de cultivare, de tip acvariu, de capacitate 30 litri, prevăzut cu sistem de agitare tip padele și o coloană de îmbogățire a mediului nutrient de creștere cu dioxid

de carbon, in care se introduce solutia de inocul, constituita din inoculul propriuzis, in cantitate de 1,2 litri si 10,8 litri mediu nutrient standard Zarrouk, a cărui compoziție este prezentată în tabelul 1 de mai jos.

Tab. 1.Compoziția mediului nutritiv Zarrouk

Componenți mediu	Zarouk
NaHCO ₃	16,80 g/l
K ₂ HPO ₄	0,50 g/l
NaNO ₃	1,875 g/l
K ₂ SO ₄	1,00 g/l
NaCl	1,00 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,20 g/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,04 g/l
Soluție de microelemente*	1 ml
Soluție de Fe chelatat**	5 ml

*Micronutrienți soluție stoc (g/l): H₃BO₃, 2,860; MnSO₄ · 4H₂O, 2,030; ZnSO₄ · 7H₂O 0,222; MoO₃ (85%) 0,018; Cu SO₄ · 5H₂O 0,079; Co(NO₃)₂ · 6H₂O 0,494.

** Pentru prepararea soluției stoc de Fe chelatat s-au dizolvat în 80 ml de apă distilată 0,69 g de FeSO₄ · 7H₂O și 0,93g Na₂EDTA. După fierbere pentru o scurtă durată de timp si răcire la temperatura camerei se aduce soluția finală la un volum de 100 ml.

Se cultivă heterotrof tulpina de *Nannochloris* sp., timp de circa 8 zile, pana la atingerea densitatii optice de 1,5 – 1,8 timp in care se pastreaza temperatura in intervalul 25 ± 2⁰C , fotoperioadă de 12 ore, iluminat cu lumina solară, cu intensități care ating 800 μE m⁻²s⁻¹ ,



suplimentată cu flash-uri de lumină verde cu intensitatea de $530 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, în fotoperioade de câte 5-10 minute la fiecare 30 minute.

Dupa 8-10 zile, când se ajunge în stadiul de creștere exponențială, se începe procesul de recoltare zilnică a câte 2 litri de suspensie microalgala, care se prelucrează pentru concentrare printr-un sistem de electro-coagulare și floclare-sedimentare, sistem care folosește un reactor tubular cu electrod de aluminiu. Se separă în acest mod, o cantitate de 0,6 litri masă microalgala concentrată (15 %) care se colectează pentru procesare ulterioară, în vederea extracției fitocatalizatorilor și a lipidelor microalgale. Mediul nutritiv lichid separat, în cantitate de 1,4 litri se analizează în vederea determinării conținutului de azot și fosfor și se utilizează în amestec cu o cota parte din digestatul lichid separat zilnic din digester, în vederea preparării mediului nutritiv pentru o nouă etapă de creștere.

Din masa microalgala concentrată se extrag succesiv fitocatalizatorii, cu acetona, și lipidele cu amestec de solvenți cloroform:metanol în raport de 2:1, conform metodelor descrise în literatură (Aris Hosikian, Su Lim, Ronald Halim, and Michael K. Danquah, *Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects*, International Journal of Chemical Engineering, 2010;) Himanshu Sati, Madhusree Mitra, Sandhya Mishra, Prashant Baredar, *Microalgal lipid extraction strategies for biodiesel production: A review*, Algal Research 38, 2019). Conținutul de fitocatalizatorii prezenți în biomasa microalgala astfel obținută, este de cca 7%, ceea ce reprezintă o creștere de 40% față de conținutul standard.

Determinarea cantitativă și calitativă a lipidelor microalgale se efectuează conform unei metode originale a autorilor, Ana-Maria Galan, Ioan Calinescu, Elena Radu, Elena-Emilia Oprescu, Gabriel Vasilevici, Sanda Velea, *Development of a new method for determination of the oil content from microalgae lipid fraction*, Rev. Chim. 68(4), 2017, 671-674).

Fracția lipidică extrasă și digestatul solid, condiționat, se procesează prin piroliză termocatalitică, Piroliza digestatului condiționat s-a realizat în sistem continuu, într-un reactor tubular din cuarț, poziționat în zona centrală a unui cuptor vertical prevăzut cu sistem automat de reglare a temperaturii. Principalii compuși obținuți, bio-oil și bio-carbune, au fost separate și identificați analitic în vederea utilizării acestora ca aditivi pentru combustibil lichid ușor și, respective, ca ameliorator de sol (D. Bombos, C. Calin, S. Velea, M. Bombos, R. Doukeh, G. Vasilevici, E.-E. Oprescu, *Bio-Fluxing Agent for Bitumen Road Based on Pyrolysis Bio-Oil*, Proceedings 2019, 29, 108; doi:10.3390/proceedings2019029108)





Determinarea continutului de carbon organic, azot si fosfor din digestatul lichid, mediul nutrient utilizat pentru culturi microalgale si mediul nutrient epuizat, obtinut din evacuarile zilnice, dupa operatia de separare- concentrare a biomasei microalgale, cu fotolorimetrul Termoreactor Velp model ECO 8, arata o reducere cu peste 50% a concentratiei de carbon, cu 60 % a concentratiei de azot si cu 90% a concentratiei de fosfor, din digestatul lichid rezultat din instalatiile de biogas.

*Adon.*

PROCEDEU SI SISTEM DESCHIS DE CULTIVARE A MICROALGELOR, INTEGRAT IN INSTALATIILE DE BIOGAZ

REVENDICARI

1.Procedeu conform inventiei *caracterizat prin aceea ca* include urmatoarele etape de cultivare a microalgelor: cultivarea heterotrofa a microalgelor pe mediul mineral Z sau BBM, specific tulpinii algale care se cultiva, in bazin deschis, timp de 8 – 10 zile, pana la atingerea densitatii optice de 1,5-1,8 (determinata turbidimetric), cand se incepe recoltarea zilnica a 10% din volumul suspensiei microalgale, concomitent cu completarea sistemului cu mediu nutrient proaspat constituit din digestat lichid evacuat zilnic din digestorul de codigestie anaeroba, si mediu de crestere recuperat de la faza de recoltare zilnica a suspensiei microalgale din bazinul de cultivare microalgae si reducerea in acest mod, cu peste 50% a concentratiei de carbon organic, cu 60 % a concentratiei de azot si cu 90% a concentratiei de fosfor, din digestatul lichid rezultat din instalatiile de biogaz; procesarea cotei de 10%, din suspensia de microalge, prin electro-coagulare și sedimentare, cu recuperarea mediului nutrient lichid și utilizarea acestuia, dupa purificare prin trecere pe carbune activ, in raport de 5 grame carbune activ la 1 litru de mediu nutrient recuperat, pentru prepararea amestecului de mediu nutrient cu cantitatea de digestat lichid recoltata zilnic si utilizarea amestecului pentru completarea mediului nutritiv de cultivare a microalgelor intr-o noua etapa; pretratarea cu ultrasunete a suspensiei concentrate de biomasa microalgala, extractia cu solventi organici polari a fitocatalizatorilor, extractia lipidelor microalgale cu amestec 2:1 chloroform:metanol, valorificarea biomasei algale delipidizate/epuizate si a fitocatalizatorilor in procesul de codigestie anaeroba si utilizarea fractiei de lipide microalgale, in amestec cu digestatul solid recuperat, in procesul de piroliza pentru obtinerea de biochar si , ulei de piroliza ca aditiv pentru combustibil lichid usor.

2.Procedeu conform revendicării *lcaracterizat prin aceea că* etapa de cultivare heterotrofa a microalgelor se realizeaza pe un mediu mineral Zarrouk, care include, după primul ciclu de recoltare, mediul lichid recoltat zilnic din bazinul de cultivare microalge, purificat și completat cu nutrienți minerali la nivelul mediului Zarrouk, in amestec 9:1 cu digestatul lichid



separat din digestorul instalatiei de biogaz și aerat cu 2,0 litri de amestec gazos cu 7,5% CO₂ pe min pe 10 litri de mediu nutrient;

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** microalgele se cultiva in sistem heterotrof, in bazin deschis, la temperatura optima de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cu o fotoperioadă de 12 ore, iluminat cu lumina solară, cu intensități care ating $800 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, suplimentată cu flash-uri de lumină verde cu intensitatea de $530 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, in fotoperioade de cate 5-10 minute la fiecare 30 minute, scopul intensificarii producerii de lipide si carotenoide primare, si 12 ore intuneric, in scopul asimilarii azotului, respectiv in scopul cresterii productiei de biomasa microalgala;

4. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** etapa de recoltare a biomasei de alge, cultivate in sistem heterotrof, se realizează prin electro-coagulare si floclulare-sedimentare, si procesarea succesiva a acesteia in scopul extractiei fitocatalizatorilor si a fractiei lipidice cu solventi polari si, respectiv cu amestec cloroform:metanol, in raport 2 : 1;

5. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** etapa de conversie în bio-cărbune și bio-ulei a digestatului solid separat din digestorul instalatiei de biogaz, in amestec cu fractia lipidica extrasa din biomasa microalgala, se realizeaza prin piroliza termocatalitica in sistem continuu, intr-un reactor tubular din quart, pozitionat in zona centrala a unui cuptor vertical prevazut cu sistem automat de reglare a temperaturii.

