

POLITECNICO DI MILANO

SCUOLA DI INGEGNERIA CIVILE E AMBIENTALE

Laurea Magistrale in Ingegneria per l'Ambiente e il Territorio



Integrazione di microalghe nei processi di  
trattamento delle acque reflue:

Prove di pretrattamento e prove di crescita della  
biomassa algale.

Relatore: Prof.ssa Elena Ficara

Correlatore: Dott.ssa Micol Bellucci

Tesi di Laurea Magistrale di:

Olimpia Guidani

Matricola 882959



## SOMMARIO

---

La coltivazione di microalghe integrata nei processi di trattamento delle acque reflue rappresenta una promettente strategia per la rimozione di inquinanti dalle acque e per la contemporanea produzione di biomassa, che può essere successivamente convertita in bioenergia tramite digestione anaerobica. Tuttavia la bassa biodegradabilità del substrato rende necessaria l'applicazione di pretrattamenti, a seguito dei quali si rileva una grandissima variabilità in termini di resa metanigena conseguita.

Le sperimentazioni effettuate nell'ambito del presente lavoro di tesi si prefiggono come obiettivo quello di valutare l'effetto dei pretrattamenti su diverse popolazioni algali e l'integrazione della specie *E. gracilis* nei processi di depurazione delle acque reflue.

Per conseguire il primo obiettivo è stato sviluppato un protocollo analitico che ha previsto l'esecuzione di misure sia su scala microscopica che macroscopica ed una prova finale di BMP al fine di studiare gli effetti specifici di ogni pretrattamento su popolazioni algali differenti e ricercare una misura in grado di predire l'incremento nella resa metanigena a prescindere dalla popolazione pretrattata.

Aggregando le misure effettuate è stato possibile costruire dei macroindicatori per comprendere gli effetti dei pretrattamenti su popolazioni algali differenti e descrivere le modalità di azione di ogni pretrattamento. I risultati ottenuti indicano che i pretrattamenti risultati efficaci non hanno provocato l'idrolisi della parete cellulare né il rilascio di metaboliti interni, bensì hanno reso biodisponibile il materiale più lentamente biodegradabile.

In generale i campioni pretrattati hanno mostrato una grande variabilità negli incrementi conseguiti: né i pretrattamenti su popolazione mista, né i pretrattamenti sulle alghe della specie *Scenedesmus obliquus* si sono rivelati efficaci, mentre i pretrattamenti su *Chlorella sorokiniana* e su *Euglena gracilis* hanno prodotto incrementi rispettivamente fino al 77% e fino al 17%.

Data la buona degradabilità di partenza e quella conseguita a seguito di pretrattamenti chimici del campione di *Euglena gracilis*, il secondo obiettivo della sperimentazione ha previsto l'esecuzione di due prove di coltivazione in batch della specie *E. gracilis*, per valutarne la crescita su refluo proveniente da macellazione; i risultati ottenuti mostrano che la crescita su refluo è stata fortemente inibita. Si rendono tuttavia necessarie ulteriori prove per una valutazione più completa.

## ABSTRACT

---

Microalgae cultivation integrated inside wastewater treatment processes is a promising strategy for both pollutant removal and biomass production, that can be converted in bioenergy. Anaerobic digestion is considered the most direct and efficient route to obtaining biofuels from microalgae. However anaerobic digestion is not straight forward due to several technical restraints, above all the recalcitrant substrate constituents and the cell wall degradability. Biomass pretreatments are thus required to enhance the final methane yield, unfortunately the results obtained by pretreated microalgae are deeply variable and poorly understood, due to the substrate's inter-specific variability.

The first objective of this research is to evaluate the effects of pretreatments on different algal populations and which of these effects actually contribute on biodegradability enhancement. The second aim is to evaluate the feasibility of *E. gracilis* growth on slaughterhouse wastewater.

To achieve the first goal a protocol of measurements both on microscopic and macroscopic scale has been developed that also included a final BMP test. Specific effects of pretreatments on different substrates has been observed and different measurements has been aggregated to create some markers able to describe the modifications occurred due to the pretreatments. Data shows that neither cell wall partial hydrolysis nor solubilisation of internal metabolites increase final methane yield, while fragmentation and size reduction seem to have a positive effect.

However, pretreatments on *Scenedesmus obliquus* and on mixed population didn't enhance final methane yield.

Due to its high biodegradability and the positive effects of chemical pretreatments, *E. gracilis* has proven to be a promising substrate to anaerobic digestion. For this reason, its growth on wastewater has been studied. Two batch experiments has been conducted to compare *E. gracilis*' growth on medium with its growth on wastewater. Data shows that wastewater characteristics inhibited algal growth. However, more experiments are needed to better understand optimum growth condition and the feasibility of the specie's cultivation on wastewaters.

# INDICE DEI CONTENUTI

---

INTRODUZIONE .....	12
1.1    OBIETTIVO DELLA TESI.....	14
2    STATO DELL'ARTE .....	15
2.1    MICROALGHE: LE CARATTERISTICHE PRINCIPALI.....	15
2.1.1    STRUTTURA CELLULARE .....	15
2.1.2    COMPOSIZIONE BIOCHIMICA DELLA CELLULA .....	22
2.1.3    METABOLISMO.....	22
2.1.4    CURVE DI CRESCITA E FATTORI AMBIENTALI LIMITANTI .....	27
2.1.5    CAMBIAMENTI NELLA COMPOSIZIONE DELLE CELLULE INDOTTI DA FATTORI AMBIENTALI .....	30
2.2    LA COLTIVAZIONE INTEGRATA DI MICROALGHE IN IMPIANTI DI DEPURAZIONE DI ACQUE REFLUE.....	32
2.2.1    SISTEMI DI COLTIVAZIONE TRADIZIONALI.....	32
2.2.2    LA COLTIVAZIONE INTEGRATA IN IMPIANTI DI DEPURAZIONE DELLE ACQUE REFLUE 35	
2.2.3    VALORIZZAZIONE DELLA BIOMASSA COLTIVATA SU REFLUI.....	38
2.3    PRODUZIONE DI METANO: DIGESTIONE ANAEROBICA DI MICROALGHE .....	43
2.3.1    LA DIGESTIONE ANAEROBICA: DESCRIZIONE E INDUSTRIALIZZAZIONE DEL PROCESSO.....	43
2.3.2    LA PRODUZIONE DI BIOGAS IN EUROPA ED IN ITALIA .....	45
2.3.3    CARATTERISTICHE DEL SUBSTRATO E RESA DI METANO .....	46
2.3.4    DIGESTIONE ANAEROBICA DI MICROALGHE: CRITICITA' E POSSIBILI SOLUZIONI....	48
2.3.5    PRETRATTAMENTI DELLA BIOMASSA ALGALE .....	51
2.3.6    MISURE PER LA VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DEI PRETRATTAMENTI .....	59
3    MATERIALI E METODI.....	67
3.1    ORIGINE DEI MATERIALI.....	67
3.1.1    BIOMASSA ALGALE .....	67
3.1.2    INOCULO ANAEROBICO.....	69
3.1.3    MEDIUM DI CRESCITA PER LA COLTIVAZIONE DI E. GRACILIS.....	69
3.2    PRETRATTAMENTI DELLA BIOMASSA ALGALE .....	70
3.2.1    VALUTAZIONE DELL' EFFICACIA DEI PRETRATTAMENTI.....	71
3.2.2    METODI PER LA VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DEI PRETRATTAMENTI .....	72
3.2.3    ELENCO DELLE PROVE DI PRETRATTAMENTO.....	73

3.3	PROVE DI BMP .....	74
3.3.1	METODI ANALITICI PER L'ESECUZIONE DELLE PROVE DI BMP .....	76
3.3.2	MODELLI PER LA STIMA DELLA PRODUZIONE DI BIOGAS .....	76
3.3.3	ELENCO DELLE PROVE DI BMP ESEGUITE .....	78
3.4	COLTIVAZIONE DI EUGLENA GRACILIS .....	78
3.4.1	FOTOREATTORI.....	78
3.4.2	PIANO SPERIMENTALE .....	80
3.4.3	METODI ANALITICI E PROCEDURE SPERIMENTALI PER LE PROVE DI COLTIVAZIONE 82	
3.4.4	MODELLI PER LA VALUTAZIONE DELLA CRESCITA ALGALE .....	82
3.5	ELABORAZIONI STATISTICHE .....	83
4	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	84
4.1	PROVE DI PRETRATTAMENTO: RISULTATI.....	84
4.1.1	CAMPIONE DI POPOLAZIONE MISTA: SET "PM" .....	88
4.1.2	CAMPIONE DI <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i> : SET "CHL" .....	90
4.1.3	CAMPIONE DI <i>SCENEDESMUS OBLIQUUS</i> : SET "SC" .....	95
4.1.4	CAMPIONE DI <i>EUGLENA GRACILIS</i> : SET "EU" .....	100
4.2	PROVE DI PRETRATTAMENTO: DISCUSSIONE .....	106
4.2.1	SIGNIFICATIVITÀ DELLE MISURE UTILIZZATE.....	106
4.2.2	VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEI PRETRATTAMENTI .....	112
4.2.3	VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DEI PRETRATTAMENTI NELLE RESE DI BMP .....	114
4.3	PROVE DI CRESCITA: RISULTATI.....	118
4.4	PROVE DI CRESCITA: DISCUSSIONE DEI RISULTATI.....	126
5	CONCLUSIONI .....	131
	APPENDICE .....	134
	BIBLIOGRAFIA.....	141

## INDICE DELLE FIGURE

---

Figura 2.1: Rappresentazione schematica di una microalga eucariote e di un suo cloroplasto. (Hu, 2014) .....	16
Figura 2.2: 2A:immagine TEM della parete di una colonia di due <i>S. pannonicus</i> . “tl” = parete trilaminare, “ca”=strato denso dell’involucro esterno, “w”=parete interna di cellulosa, “p”=membrana plasmatica. Le frecce indicano le vescicole che si formano sullo strato a bassa densità dell’involucro esterno che riveste la colonia. 2B: reticolo formato da pectina sull’involucro esterno di parete (strato elettronicamente poco denso). (Staehein & Pickett-Heaps, 1975)).....	20
Figura 2.3: b=parete di tipo 1. D=parete di tipo 2. H=parete di tipo 3. (Yamada & Sakaguchi, 1982) .....	21
Figura 2.4: Rappresentazione schematica del metabolismo fotosintetico autotrofo. (Richmond, 2013) .....	25
Figura 2.5: : Spettro di assorbimento di un’alga verde, immagine presa da (Hellwig, 2014). .....	27
Figura 2.6: Modello di crescita in batch in condizioni ottimali .....	28
Figura 2.7: Relazione attività fotosintetica- irradiazione. ....	29
Figura 2.8: Tasso di crescita-Temperatura del medium. (Ota, Takenaka, Sato, Lee Smith, & Inomata, 2015) .....	29
Figura 2.9: schema dell’intera filiera tradizionale di coltivazione, separazione, sottocaggio e valorizzazione della biomassa algale (Jankowska, et al., 2017).. .....	32
Figura 2.10: schema esemplificativo della relazione simbiotica di un consorzio alghe-batteri. (Muñoz & Guieysse, 2006). .....	36
Figura 2.11: Carico di azoto da effluenti di allevamento al campo (kg/ha) su base comunale (Regione Lombardia, 2018). .....	37
Figura 2.12: possibile layout impiantistico di un processo integrato di depurazione acque reflue e coltivazione algale su separato liquido del digestato. ....	37
Figura 2.13: Produzione e tecnologie di processo di biocombustibili a partire da biomassa microalgale. Immagine da (Cheah, et al., 2016). .....	38
Figura 2.14: Schema del processo di digestione anaerobico. (Gerardi, 2003).....	44
Figura 2.15: relazione tra solubilizzazione percentuale e incremento nella produzione di metano di biomassa algale pretrattata con diversi pretrattamenti (Passos, Uggetti, Carrère, & Ivet, 2014). .	60
Figura 2.16: A : Gradi di rottura della parete cellulare. Immagine da (Yap, Crawford, Dumsday, Scales, & Martin, 2014). B: metodi diretti ed indiretti di quantificazione della distruzione cellulare. Immagine da (Spiden E. , Scales, Kentish, & Martin, 2013) .....	63
Figura 3.1: Raceway presente all’interno del depuratore di Bresso-Niguarda (MI) .....	67
Figura 3.2: Interpolazione dei dati sperimentali della prova di BMP del campione CHL.B con il modello dell’Eq. 3.6.....	77
Figura 3.3:schema del sistema di fotobioreattori per la coltivazione di <i>Euglena gracilis</i> . Immagine gentilmente concessa dal Ing. Dott. Simone Rossi. ....	79
Figura 3.4: Esempio di linearizzazione su piano semilogaritmico della curva di assorbanza appartenenti alla colonna C1, fase 0 e interpolazione dei dati. ....	83
Figura 3.5: Valutazione del giorno di inizio della fase esponenziale. 4.2 A: $t_{0,exp}=2$ . 4.2 B: $t_{0,exp}=5$ . .....	83
Figura 4.1: Elaborazione dello spettro di assorbimento grezzo: eliminazione del rumore di fondo e valutazione della $\lambda_{picco}$ . ....	85
Figura 4.2: Delimitazione delle aree che racchiudono le popolazioni presenti nel campione. A sinistra: in verde i detriti e i batteri. In azzurro e in porpora la popolazione algale ed in viola il rumore	

di fondo. A destra è mostrato in grigio il riquadro entro il quale i solidi vengono considerati alghe. .....	86
Figura 4.3: Aree individuate sul piano FSC-SSC e scostamento della mediana dei campioni considerati rispetto al campione non trattato.....	86
Figura 4.4: Variazioni in termini assoluti ed in termini relativi nei valori di APC. ....	87
Figura 4.5: Fotografie scattate tramite fotocamera interna del microscopio a fluorescenza utilizzato per le osservazioni. PM.NT A(10x), tutte le altre immagini sono immagini al 40x. ....	88
Figura 4.6: Andamento delle produzioni specifiche cumulate di biogas (linee continue) e curve interpolanti (linee tratteggiate) della prova di BMP del set PM. ....	89
Figura 4.7: Immagini catturate tramite microscopio a fluorescenze del campione CHL. CHL.NT (20x). CHL.B (20x). CHL.S (20x). CHL.A (40x, ingrandimento). CHL.T1 (40x, ingrandimento). CHL.T2 (40x). .....	91
Figura 4.8: Spettri di assorbimento netti dei campioni CHL.NT, CHL.T1 e CHL.T2.....	92
Figura 4.9: Variazioni in termini di SSC causate dai pretrattamenti termici rispetto al campione non trattato. ....	93
Figura 4.10: Variazioni in termini di APC causate dai pretrattamenti termici rispetto al campione non trattato.....	93
Figura 4.11: Correlazione tra mortalità e decremento dell'APC mostrata sul piano APC-FITC e come istogramma. ....	93
Figura 4.12: Andamento delle produzioni specifiche cumulate di biogas (linee continue) e curve interpolanti (linee tratteggiate). ....	94
Figura 4.13: Fotografie del set SC scattate tramite fotocamera interna del microscopio a fluorescenza. SC.NT (40x). SC.B (40x). C: SC.T1 (40x). SC.T2 (40x, ingrandimento). SC.S (20x). SC.A (40x,ingrandimento). SC.E (40x).....	96
Figura 4.14: spettri di assorbimento netti dei campioni SC.NT, SC.T1, SC.T2, SC.S, SC.E .....	97
Figura 4.15:Variazioni in termini di SSC mostrate sul piano SSC-FSC e come istogrammi dei campioni SC.T1, SC.T2, SC.E. ....	97
Figura 4.16: Variazioni significative in termini di autofluorescenza sul canale PerCP nel set di prove CHL. Le percentuali tra parentesi mostrano la porzione di campione non trattato compreso nelle aree che individuano il 99% dei campioni pretrattati.....	98
Figura 4.17: Confronto in termini di FSC tra il campione SC.NT e SC.S.....	99
Figura 4.18: Produzione specifica cumulata di biogas della prova di BMP del campione SC. ....	100
Figura 4.19: Immagini scattate tramite fotocamera del microscopio ottica del campione utilizzato per la prova BMP del sett EU.: EU.NT (100x). EU.T1 (40x). EU.T2. EU.A (40x, 40x). M,N: EU.B (40x, 40x, 100x, 40x). ....	101
Figura 4.20: Variazioni nel piano FSC-SSC del campione EU.....	102
Figura 4.21: istogrammi PerCP- densità cellulare dei campioni della prova EU. ....	103
Figura 4.22: Spettri di assorbimento sul campione filtrato (A) delle prove EU.T1, EU.T2, EU.A e sul campione totale (B).....	103
Figura 4.23: Andamento della resa netta cumulata di biogas nelle prove di BMP del set EU.....	104
Figura 4.24: Incremento % di OD260 in funzione dell'incremento % di CODsol. ....	106
Figura 4.25: Correlazione tra OD680 e OD260 sul filtrato nei campioni pretrattati non termicamente .....	107
Figura 4.26: rilascio di azoto totale in funzione del rilascio di CODsol nei campioni pretrattati termicamente PM, SC, CHL .....	107
Figura 4.27: Variazione dell'OD750 in funzione della densità degli eventi.....	109
Figura 4.28: correlazione tra riduzione delle dimensioni e incremento dell'OD 680. ....	109

Figura 4.29: Valori di pH(A), Temperatura (B), Ossigeno disciolto (D) nell'intera durata della Fase 1. Ossigeno disciolto misurato tra il giorno 8 e il giorno 9 della Fase 1 (C) .....	119
Figura 4.30: Andamenti dei parametri di crescita e di rimozione nei reattori C1,C2, C3 e C4. SSV (A), torbidità (B), OD 680 (C), concentrazione di ammonio (D), fosfati (E) e COD solubile (F).....	120
Figura 4.31: stima del rateo di crescita esponenziale nelle colonne C1 e C4. ....	121
Figura 4.32: correlazione tra le variabili OD 680-SST (A) e OD 680-SSV(B).....	121
Figura 4.33: Valori di pH (A), Temperatura (B), OD nelle prime 48 h (C) e OD nel corso dell'intera prova (D).....	123
Figura 4.34: Andamenti dei parametri di crescita e di rimozione nei colonne C.R.1,C.R.2 e C.M.4 misurati nel corso della Fase 2.. densità cellulare (A), torbidità (B), OD 680 (C), concentrazione di ammonio (D), fosfati (E) (asse verticale sx: C.R.1 e C.R.2 per t<15 d; asse verticale dx C.M.4 e C.R.1,C.R.2 per t>15 d), COD solubile (F). ....	124
Figura 4.35: Stima del rateo di crescita e del coefficiente di determinazione R2 nel reattore C.M.4. ....	125
Figura 4.36: Curva di crescita nel reattore C4. ....	127
Figura 4.37: Andamento del pH nel colonne C.R.1 tra il giorno 2 ed il giorno 4.....	129
Figura 0.1: Rappresentazione del campione CHL.NT. A sx: FSC-SSC. In alto a dx: APC-FITC. In basso a dx: FSC-APC. ....	135
Figura 0.2: rappresentazione del campione CHL.NT sui piani FSC-SSC e FSC-APC con relativi istogrammi .....	135
Figura 0.3: rappresentazione del set CHL sui piani FSC-SSC e FSC-APC con relativi istogrammi ...	136
Figura 0.4: Rappresentazione del campione SC.NT. A sx: FSC-SSC. In alto a dx: PerCPC-FITC. In basso a dx: FSC-PerCP. ....	137
Figura 0.5: rappresentazione del campione SC.NT sui piani FSC-SSC e FSC-PerCP con relativi istogrammi .....	137
Figura 0.6: Rappresentazione del set SC sui piani FSC-SSC e FSC-PerCP e relativi istogrammi. ....	138
Figura 0.7: : Rappresentazione del campione SC.NT. A sx: FSC-SSC. In alto a dx: APC-FITC. In basso a dx: FSC-APC .....	139
Figura 0.8: Rappresentazione del campione EU.NT sui piani FSC-SSC e FSC-APC con relativi istogrammi .....	139
Figura 0.9: Rappresentazione del set EU sui piani FSC-SSC e FSC-APC e relativi istogrammi. ....	140

## INDICE DELLE TABELLE

---

Tabella 2.1 : composizione della parete cellulare e percentuale in peso rispetto alla cellula. Riadattata da (Torres, et al., 2013). .....	17
Tabella 2.2: zuccheri semplici rilevati nella parete cellulare, espressi come % zuccheri neutri totali. Riadattata da (Blumreisinger, Meindl, & Loos, 1983). Ra, ramnosio. Fuc, Fucosio. Ara, arabinosio. Xyl, xylosio. Man, mannosio. Gal, galattosio. Glc, glucosio. X1,2: ND. ....	18
Tabella 2.3: presenza di parete trilaminare e algaenan in diverse specie algali.....	19
Tabella 2.4: Composizione percentuale di alcune specie algali in termini di macronutrienti. Tabella riadattata da (Roberts, Heaven, & Banks, 2016) e (Sialve, Bernet, & Bernard, 2009) (Hsueh, Li, Chen, & Chu, 2009).....	22
Tabella 2.5: Rese in termini di gasolio e ettari necessari per soddisfare la domanda mondiale di gasolio. (Shuba & Kifle, 2018), (FAO, 2017). ....	39
Tabella 2.6: BMP e TMP a confronto per diverse specie algali. ....	49
Tabella 2.7: Dati di letteratura relativi ai pretrattamenti termici a basse temperature. (*) = $sCODp/sCOD0*100$ . (**) = $[(VSs/VS)p-(VSs/VS)0]/(VSs/VS)0$ . (***) = $[sCODp-sCOD0]/sCOD0*100$ . (****) = $sCODp-sCOD0/(COD0-sCOD0)*100$ . (*****) = $CODlost=(CODp-COD0)/COD0*100$ . ....	53
Tabella 2.8: Dati di letteratura relativi ai pretrattamenti termici ad alte temperature. (*) = $sCODp-sCOD0/(COD0-sCOD0)*100$ . (**) = Carboidrati_sol/Carboidrati_tot. (***) = $sCOD/CODtot$ . (****) = $(cell/ml)p/(cell/ml)0*100$ . (*****) = $[(VSs/VS)p-(VSs/VS)0]/(VSs/VS)0$ . ....	55
Tabella 2.9: principali risultati in termini di incremento di produzione di metano a seguito di pretrattamento enzimatico. (*) = mgVSs/L. (**) = $sCOD/CODtot*100$ . (***) = $(sCODp-sCOD0)/(CODtot-sCOD0)$ . # risultati in termini di biogas.....	58
Tabella 2.10: Principali misure eseguite nell'ambito della valutazione dei pretrattamenti per la digestione anaerobica. Pedice 0: valore prima del pretrattamento. Pedice p: valore post pretrattamento. ....	62
Tabella 2.11: metodi di quantificazione della distruzione di una cellula algale.....	63
Tabella 3.1: Provenienza e specie della biomassa algale utilizzata nel corso della sperimentazione. ....	67
Tabella 3.2: caratteristiche medie del substrato di crescita in alimento al raceway e della sospensione algale presente al suo interno relative al mese di dicembre 2018 .....	68
Tabella 3.3: Caratteristiche dei campioni centrifugati. ....	68
Tabella 3.4: caratteristiche medie dell'inoculo utilizzato per la prova BMP_1, BMP_3, BMP_4. ...	69
Tabella 3.5: Caratteristiche del medium Cramers & Meyers (M) e del medium modificato (M*). .	69
Tabella 3.6: Caratteristiche del refluo R.....	70
Tabella 3.7: analisi svolte per la valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti .....	71
Tabella 3.8: Elenco prove di pretrattamento svolte. ....	74
Tabella 3.9: Prove di BMP effettuate e codici assegnati ad ogni prova. ....	78
Tabella 3.10: Proprietà delle soluzioni di crescita della fase 1. ....	80
Tabella 3.11: Proprietà dell'alimento delle colonne C1, C2 e C4. I valori contrassegnati da * indicano che la misura è avvenuta il giorno 1 della sperimentazione. ....	81
Tabella 3.12: Parametri misurati e frequenza del monitoraggio. ....	81
Tabella 4.1: Misure per la valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti e informazione restituita attesa.....	84
Tabella 4.2: Codici prova assegnati al set composto da popolazione mista.....	88
Tabella 4.3: Misure su scala macroscopica eseguite per la valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti nella prova di BMP del set PM. ....	89

Tabella 4.4: Risultati delle prove di BMP del set PM. ....	90
Tabella 4.5: Codici prova assegnati al set CHL composto da <i>C. sorokiniana</i> .....	90
Tabella 4.6 Misure eseguite su scala macroscopica del set CHL.....	91
Tabella 4.7: Conte eseguite tramite citofluorimetro del set CHL. ....	94
Tabella 4.8: Risultati finali del set CHL ottenuti nelle prove di BMP.....	95
Tabella 4.9: Codici prova assegnati al campione composto da <i>Scenedesmus obliquus</i> .....	95
Tabella 4.10: Misure per la valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti sul campione SC.....	96
Tabella 4.11: Conte eseguite tramite citofluorimetro per il campione SC.....	99
Tabella 4.12: Risultati finali della prova di BMP del set SC. ....	100
Tabella 4.13: Codici prova assegnati al campione EU. ....	100
Tabella 4.14: Misure a scala macroscopica eseguite sui campioni EU.....	102
Tabella 4.15: Conte degli eventi totali e delle popolazioni rilevate nei campioni EU tramite citofluorimetro. ....	104
Tabella 4.16: Risultati finali delle prove di BMP del set EU ....	105
Tabella 4.17: Informazioni ricavate dalle misure, macro-indicatori da cui estrarre le informazioni e misure a supporto. ....	112
Tabella 4.18: Ratei di crescita e relativo coefficiente di determinazione $R^2$ .....	121
Tabella 4.19: Calcolo della produttività di biomassa nei colonne durante la fase 1 al termine della fase esponenziale. ....	122
Tabella 4.20: ratei di rimozione, rimozione specifica (R) e apporto stechiometrico di nutrienti per grammo di biomassa sintetizzata (S). ....	122
Tabella 4.21: Produttività calcolata al termine della fase esponenziale.....	125
Tabella 4.22: calcolo del rateo di rimozione dei nutrienti e dei parametri R e S nella colonna C.M.4. .....	125

# 1 INTRODUZIONE

---

La sfida del nostro secolo è quella di garantire l'accesso alle risorse per tutti gli esseri umani e allo stesso tempo di preservare i delicati equilibri del nostro Pianeta, come espresso chiaramente dai Sustainable Development Goals, redatti da tutti gli Stati membri delle Nazioni Unite nel 2015.

La rapida crescita demografica e l'aumento della richiesta di beni di consumo ha portato negli ultimi decenni ad un utilizzo spropositato di materie prime, estratte dagli ecosistemi naturali, trasformate in beni di consumo ed infine accumulate nell'ambiente sotto forma di rifiuti (Michelini, Moraes, Cunha, Costa, & Ometto, 2017).

Tra i rifiuti più complessi da gestire sono annoverate le acque reflue (Levine & Asano, 2004). L'aumento dei consumi idrici per scopi agricoli, industriali e domestici infatti produce ingenti quantità di acque inquinate, che necessitano di essere trattate prima di poter essere reimmesse nell'ambiente. Stime condotte da AQUASTAT suggeriscono che globalmente la produzione di acque reflue municipali è superiore a 330 km<sup>3</sup> l'anno, di cui il 40% viene restituito all'ambiente senza subire alcun processo di trattamento, con gravi ripercussioni sulla salute umana e sull'ambiente (AQUASTAT, 2014).

Fin dagli anni '70 i processi di trattamento delle acque reflue comprendono tecnologie altamente efficienti e robuste per quanto riguarda la rimozione di solidi grossolani, solidi sospesi e materia organica biodegradabile (Metcalf & Eddy, 2014), mentre i processi per la rimozione di nutrienti e microinquinanti sono ancora poco utilizzati per via degli alti costi o per mancanza di una tecnologia adeguatamente sviluppata.

La presenza di nutrienti e microinquinanti nelle acque reflue altera gravemente gli ecosistemi dei corpi idrici recettori. L'apporto di alti carichi di nutrienti causa l'eutrofizzazione degli ecosistemi acquatici, un processo pressoché irreversibile che porta alla perdita di biodiversità, all'alterazione delle proprietà chimico-fisiche dell'acqua e non ultima all'incremento della sua tossicità, che si ripercuote indirettamente anche sulla salute umana. La conseguenza più evidente di questo processo è probabilmente la formazione delle così dette "zone morte", ampie aree costiere nelle quali il livello dell'Ossigeno disciolto è talmente basso da causare la moria degli organismi acquatici superiori e dunque da non garantire la sopravvivenza di un ecosistema. A partire dal 1960 i casi di formazione di zone morte documentati in letteratura sono raddoppiati ogni dieci anni con ritmo costante (Diaz & Rosenberg, 2008), e si stima che oltre il 50% dei laghi europei e nord-americani sia interessato da eutrofizzazione (International Lake Environment Committee, 1994).

Il problema dell'eutrofizzazione si manifesta in maniera particolarmente acuto nelle zone ad alta vocazione agro-zootecnica, come la regione Lombardia, a causa del massiccio uso di fertilizzanti e della produzione di digestato proveniente da reflui zootecnici, particolarmente carichi di azoto. I processi convenzionali di rimozione dell'azoto per le industrie agro-zootecniche di piccola e media dimensione risultano economicamente non sostenibili (Pretolani, 2008) e ad oggi i limiti dettati dalle normative vigenti in queste aree sensibili per ridurre il problema dell'eutrofizzazione e dell'inquinamento delle acque di falda (Direttiva Nitrati 91/676/CEE) risultano perlopiù non rispettati.

La gestione di un problema così complesso necessita di un cambio di paradigma nel nostro sistema economico. Le acque reflue infatti contengono al loro interno un alto carico inquinante ma allo stesso tempo rappresentano una fonte costante di nutrienti, materia organica, energia termica ed energia potenziale (van der Hoek, de Fooij, & Struker, 2016). Queste risorse, se valorizzate adeguatamente, possono essere utilizzate per la produzione di nuovi beni ed energia. Il sistema circolare così descritto trasforma i rifiuti in nuova ricchezza e permette dunque di soddisfare le necessità di una popolazione in crescita e garantirne il benessere gestendo al contempo le risorse del pianeta in modo sostenibile.

La coltivazione integrata di microalghe all'interno degli impianti di depurazione è un perfetto paradigma di economia circolare; in diversi studi infatti le microalghe si sono dimostrate in grado di crescere su reflui di origine municipale, agro-zootecnica e industriale, dimostrandosi al contempo efficaci nella rimozione dei nutrienti, assimilati per la sintesi cellulare. Le efficienze di rimozione dei composti dell'azoto si attestano spesso su valori superiori al 90% (Hena, Fatimah, & Tabassum, 2015), (Kim, et al., 2014) mentre quella dei fosfati è solitamente intorno al 70% (Delgadillo-Mirquez, Lopes, Taidi, & Pareau, 2016). Studi dimostrano inoltre che le microalghe sono in grado di rimuovere per assimilazione il contenuto di metalli pesanti presenti nelle acque (de-Bashan & Bashan, 2010). Il biorisanamento di acque reflue mediante crescita di microalghe dunque costituisce un promettente trattamento da integrare all'interno della filiera di depurazione delle acque.

Dopo la crescita, il secondo step fondamentale è costituito dalla valorizzazione della biomassa accresciuta su refluo. I prodotti di maggior interesse in questo caso risultano essere i biocombustibili, gli acidi grassi volatili (VFA) e i biofertilizzanti (Brennan & Owende, 2010), in un'ottica di bioraffineria è inoltre possibile integrare più di un processo all'interno della filiera di valorizzazione, in modo da massimizzare le rese di produzione.

Nell'ambito della produzione di bioenergetica, il processo di digestione anaerobica rappresenta la scelta più diretta per la valorizzazione della biomassa algale. Rispetto ad altri processi infatti la digestione anaerobica di microalghe è caratterizzata da una più alta resa di conversione e non necessita di particolari processi preliminari (Montigelli, Tedesco, & Olabi, 2015). Tuttavia la grande resistenza opposta dalla parete cellulare rispetto all'azione degli enzimi escreti dai batteri inficia in maniera importante sulla biodegradabilità finale (Torres, et al., 2013), inoltre le caratteristiche strutturali della parete sono altamente specie-specifiche ed influenzate da fattori ambientali (Baudeflet, Ricochon, Linder, & Muniglia, 2017), ragion per cui i dati reperibili in letteratura riguardo le rese di metano ottenute sono spesso discordi. Per aumentare la produzione finale di metano una delle tecniche alle quali si ricorre più frequentemente consiste nel pretrattamento della biomassa con risultati molto variabili. Le cause di questa variabilità sono poco indagate e la loro indagine costituisce uno degli obiettivi della presente sperimentazione.

Nonostante i promettenti risultati ottenuti dalle microalghe sia in fase di coltivazione che in fase di valorizzazione, spesso le prove presenti in letteratura hanno mostrato risultati discordi, non solo nei processi di digestione anaerobica, ma anche in fase di crescita e in altre tecniche di valorizzazione. Sono necessari quindi ulteriori studi per poter massimizzare la resa di ogni fase descritta e poter quindi integrare efficacemente la coltivazione della biomassa algale all'interno della filiera depurativa.

## 1.1 OBIETTIVO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi si inserisce all'interno del più ampio progetto IMAP (Integration of Microalgal Based Processes in wastewater treatment), finanziato da Fondazione Cariplo e sviluppato grazie alla proficua collaborazione tra il Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale del Politecnico di Milano e il Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Terra dell'Università degli Studi di Milano Bicocca.

La sperimentazione è stata condotta in parallelo, indagando sia le potenzialità della crescita di biomassa algale su acque reflue sia la sua valorizzazione.

In particolare per quanto l'indagine sulla valorizzazione della biomassa, sono state condotte prove di pretrattamento su diversi substrati algali successivamente sottoposti a prove di BMP, per valutare l'efficacia dei pretrattamenti nei processi di digestione anaerobica e le modalità di azione che i pretrattamenti hanno nei confronti di biomasse algali differenti. L'intento delle prove è stato inoltre quello di ricercare uno o più indicatori del buon esito di un pretrattamento, in grado dunque di risolvere la problematica della grande specificità dei substrati trattati e di spiegare la variabilità nei risultati delle prove di metanogenesi presenti in letteratura e ottenuti nel corso della corrente sperimentazione. A tal fine è stato sviluppato un protocollo che ha previsto l'esecuzione di misure per la valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti sia su scala microscopica che su scala macroscopica.

Secondo obiettivo della tesi è stato quello di valutare la crescita della specie *E. gracilis* su refluo derivante da macellazione. Per via delle caratteristiche della sua parete cellulare, l'alga *E. gracilis* si presenta infatti come un substrato più facile da degradare da parte dei batteri anaerobici e dunque risolve almeno in parte il problema della scarsa biodegradabilità della biomassa algale normalmente utilizzata. Data la potenzialità della specie nell'ambito della valorizzazione, è stata dunque indagata anche la sua capacità di crescere su refluo, al fine di valutare globalmente la fattibilità di una possibile integrazione di *E. gracilis* all'interno dei processi di depurazione delle acque reflue.

Le modalità, le misure effettuate e i risultati ottenuti saranno descritte nei Cap. 4 e Cap. 5 del presente elaborato.

## 2 STATO DELL'ARTE

---

### 2.1 MICROALGHE: LE CARATTERISTICHE PRINCIPALI

Le microalghe sono un insieme di organismi unicellulari, fotoautotrofi, accomunati dalla presenza di clorofilla A come principale pigmento fotosintetico.

Sono piante tallofite, mancano cioè di radici, stelo e foglie e non presentano un rivestimento sterile attorno alle cellule riproduttive (Lee, 2008). Il numero di specie identificate ad oggi è di circa 100000, di cui ne sono state caratterizzate circa 35000 (Jankowska, et al., 2017).

Oltre agli organismi eucarioti unicellulari, appartenenti al regno dei protisti, in questa definizione sono compresi anche i cianobatteri, che nelle più recenti classificazioni non sempre vengono considerati come microalghe, in quanto organismi procarioti appartenenti al regno dei monera, talvolta chiamati "alghe azzurre" (Lee, 2008).

La maggiore differenza tra le cellule di questi due gruppi di organismi sta nel fatto che i procarioti presentano il materiale intracellulare libero all'interno del citoplasma, risultano infatti assenti organuli specializzati rivestiti da membrane. Gli eucarioti invece presentano organelli racchiusi all'interno di apposite membrane. I procarioti sono dunque caratterizzati da una più semplice struttura cellulare e da questi si sono successivamente evolute le cellule eucariote.

Le microalghe sono organismi estremamente adattabili, che riescono a vivere in ecosistemi molto diversi tra loro; abitano principalmente ambienti acquatici, sono presenti nelle acque marine, dolci e salmastre, ma sono state anche rinvenute su rocce, in simbiosi con i licheni ad esse aderiti o in ambienti desertici (Lee, 2008).

All'interno degli ecosistemi acquatici le microalghe costituiscono il phytoplankton e rappresentano la base della catena alimentare degli ecosistemi in cui abitano (Reynolds, 2006).

Nonostante il phytoplankton rappresenti meno dell'1% in peso dell'intera biomassa fotosintetica presente sul nostro pianeta, esso è responsabile di circa il 45% della produzione primaria netta di tutto il pianeta (Falkowski, 2013). Esso dunque cattura circa la metà della CO<sub>2</sub> emessa in atmosfera per svolgere l'attività fotosintetica e produce circa la metà dell'ossigeno presente sulla Terra.

#### 2.1.1 STRUTTURA CELLULARE

Nelle microalghe, in quanto organismi unicellulari, ogni singola cellula è fisicamente separata dall'ambiente esterno tramite una parete cellulare ed è in grado di autosostentarsi (Se-Kwon, 2015).

Le cellule procariote hanno una struttura più semplice, mancano infatti di elementi specializzati separati da membrane che nelle cellule eucariote sono chiamati organuli (o organelli). Le cellule procariote classificate come microalghe comprendono l'intera classe dei cianobatteri; tutte le altre microalghe appartengono invece al dominio eucariote, hanno dunque al loro interno i plastidi, i mitocondri, l'apparato di Golgi, un nucleo ed eventualmente uno o più flagelli che protendono verso l'esterno (Lee, 2008).

Il sistema cellulare è separato dall'ambiente esterno tramite la *membrana plasmatica*, che si comporta come una barriera selettiva che regola il flusso di materia in entrata ed in uscita dal

protoplasma; esternamente alla membrana si colloca la parete cellulare, caratterizzata da una maggiore rigidità (Se-Kwon, 2015).

La Fig. 2.1 mostra schematicamente la composizione di una cellula algale eucariote e di un suo cloroplasto.

Il *cloroplasto* è il componente cellulare che permette alle microalghe di svolgere la fotosintesi (Se-Kwon, 2015). All'interno dei cloroplasti si trovano i tilacoidi, nei quali si svolge il complesso delle "light reactions" della fotosintesi, la membrana tilacoidale separa l'organello dallo stroma, all'interno del quale avviene il ciclo delle "dark reactions" (Richmond, 2013), come mostrato in Fig. 2.1.

Nelle alghe procariote tuttavia, non essendoci organuli specializzati, non è presente un vero e proprio cloroplasto, ma i suoi costituenti, i tilacoidi, sono sparsi all'interno della cellula.

I cloroplasti contengono inoltre materiale genetico e materiale per la sintesi di nuovi composti, nonché prodotti di accumulo derivanti dall'attività fotosintetica sotto forma di granuli di amido (Lee, 2008).

In ogni cellula algale eucariote il cloroplasto è avvolto da due membrane che fungono da involucro, inoltre possono essere presenti una singola o doppia membrana appartenente al reticolo endoplasmatico in alcuni ordini algali (Lee, 2008).

In Figura 2.1 si riconoscono il *nucleo*, che contiene il materiale genetico e tutte le informazioni biologiche per programmare e coordinare le attività dell'organismo, l'*apparato di Golgi*, organulo preposto a rielaborare, selezionare e trasportare i prodotti del reticolo endoplasmatico e a completare la formazione delle biomolecole necessarie alla cellula (Lee, 2008), i *mitocondri*, organuli in cui avviene la respirazione cellulare per ricavare l'ATP necessaria al sostentamento dei processi vitali della cellula (Se-Kwon, 2015), il *reticolo endoplasmatico*, un complesso sistema di endomembrane interno all'interno del quale avviene la sintesi e il trasporto di nuove proteine e di altri importanti componenti della cellula e i *flagelli*, che costituiscono l'apparato locomotore dell'alga (Lee, 2008).

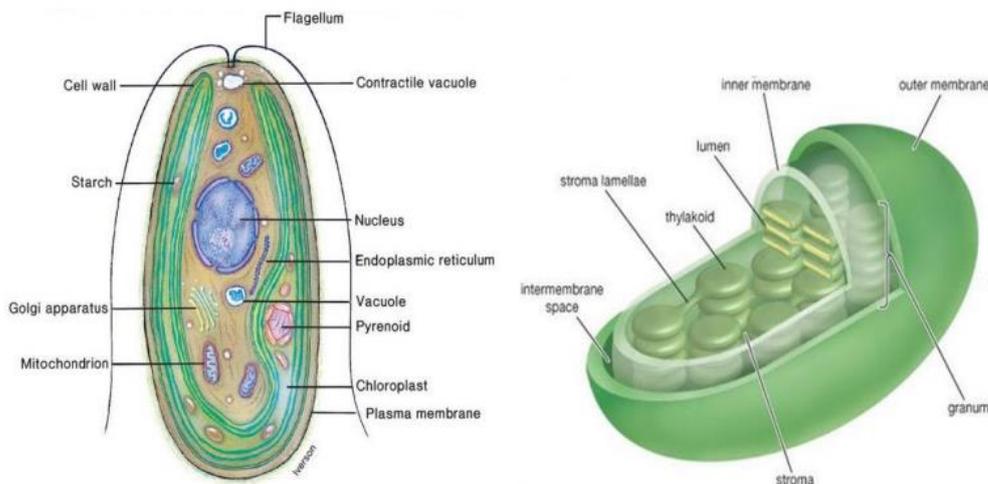


Figura 2.1: Rappresentazione schematica di una microalga eucariote e di un suo cloroplasto. (Hu, 2014)

### Morfologia e composizione della parete cellulare

La parete cellulare delle alghe ha una struttura complessa, estremamente variabile e tuttavia poco studiata (Baudeflet, et al., 2017).

È principalmente costituita da polisaccaridi e glicoproteine e risulta essere molto resistente, tanto da rappresentare il maggiore ostacolo nell'utilizzo della biomassa per scopi antropici (Gerken, et al., 2012). Per questo motivo la sua conformazione merita di essere esaminata in modo approfondito.

Generalmente la parete cellulare delle alghe è formata da due componenti: la componente microfibrillare, che rappresenta lo scheletro della parete, e la componente amorfa, che costituisce una matrice all'interno della quale è inserita la struttura microfibrillare (Lee, 2008). La conformazione appena descritta caratterizza la parete primaria delle cellule appartenenti al regno delle piante ed è composta principalmente da cellulosa, la cui struttura cristallina o semicristallina conferisce rigidità all'intera cellula e ne controlla la crescita; la matrice amorfa è invece composta da pectine, zuccheri semplici e altri polimeri (Thomas, et al., 2013).

Oltre alla parete primaria, le alghe possono presentare uno o più involucri esterni, di natura estremamente variabile, che conferiscono alla cellula ulteriore resistenza. Esistono poi specie che non presentano alcuna struttura assimilabile a quella di una parete cellulare (Torres, et al., 2013), o ancora cellule che sono formate principalmente da parete glicoproteica (Arnold, et al., 2015).

I maggiori componenti della parete delle specie algali studiate risultano essere i carboidrati, tra cui principalmente cellulosa, emicellulosa e zuccheri neutri (Torres, et al., 2013); la distribuzione di questi ultimi risulta specie-specifica e la percentuale di proteine può variare tra l'1% per alcune specie di *Chlorella* fino a superare il 30% w/w per alcune specie del genere *Pleurastrum* (Blumreisinger, et al., 1983).

Le tabelle che seguono riassumono le percentuali di composti osservati in diverse specie algali Tabella 2.1 e la distribuzione dei monosaccaridi presenti nella parete Tabella 2.2.

Tabella 2.1 : composizione della parete cellulare e percentuale in peso rispetto alla cellula. Riadattata da (Torres, et al., 2013).

Specie algale	Parete cellulare	Composizione parete cellulare		
	% w/w	% Carboidrati	% Proteine	% ND <sup>1</sup>
<i>Chlorella vulgaris</i> (acqua dolce)	20.00	30.00	2.46	67.54
<i>Chlorella vulgaris</i> (acqua salata)	26.00	35.00	1.73	63.27
<i>Chlorella saccharophila</i>	-	54.00	1.70	44.30
<i>Chlorella fusca</i>	-	68.00	11.00	20.00
<i>Chlorella fusca</i>	-	80.00	7.00	13.00
<i>Scenedesmus obliquus</i>	-	39.00	15.00	46.00
<i>Kirchneriella lunaris</i>	23.00	75.00	3.96	21.04
<i>Klebsormidium flaccidum</i>	36.70	38.00	22.60	39.40
<i>Ulothrix belkæ</i>	25.00	39.00	24.00	37.00
<i>Pleurastrum terrestre</i>	41.00	31.50	37.30	31.20
<i>Pseudoclonium basiliense</i>	12.80	30.00	20.00	50.00
<i>Monoraphidium braunii</i>	-	47.00	16.00	37.00
<i>Ankistrodesmus densus</i>	-	32.00	14.00	50.00

<sup>1</sup> ND comprende l'insieme di acidi uronici, glucosammine e composti non determinati.

Tabella 2.2: zuccheri semplici rilevati nella parete cellulare, espressi come % zuccheri neutri totali. Riadattata da (Blumreisinger, Meindl, & Loos, 1983). Ra, ramnosio. Fuc, Fucosio. Ara, arabinosio. Xyl, xylosio. Man, mannosio. Gal, galattosio. Glc, glucosio. X1,2: ND.

Specie algale	Ra	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	X1	X2
<i>Chlorella vulgaris, a</i>	47	0	1.6	7.1	1.7	26	3.6	13	0
<i>Chlorella vulgaris, b</i>	45	0	9	19	6.7	18	1.7	<1	0
<i>Chlorella vulgaris, c</i>	54	<1	6.6	10	5.4	14	<1	<1	8.8
<i>Chlorella saccharophila</i>	26	0	2.2	3.3	18	27	22	1.2	0
<i>Chlorella fusca</i>	2.4	<1	<1	<1	66	0	30	<1	0
<i>Scenedesmus obliquus</i>	<1	1.6	0	0	25	0	22	0	0
<i>Monoraphidium Braunii</i>	4.2	<1	0	1.7	72	0	19	0	0
<i>Ankistrodesmus densus</i>	1.7	0	0	<1	79	0	73	0	0

Le alghe più facilmente idrolizzabili risultano essere quelle senza parete o con parete proteica; al contrario esistono alghe particolarmente refrattarie all'idrolisi a causa della presenza di biopolimeri particolarmente resistenti che oggi vengono indicati con il nome di "algaenan biopolymers" e che si collocano all'interno di strutture protettive trilaminari, spesse tra i 10 e 20 nm, (Torres, et al., 2013), chiamate TLS (Trilaminar Sheets), al cui interno l'algaenan viene prodotta e vi permane (Allard & Templier, 2000).

L'algaenan, un tempo assimilata alla sporopollenina che riveste le spore e i pollini di alcune piante, è un biopolimero alifatico non idrolizzabile; alla sua presenza spesso è stata attribuita la recalcitranza di alcune specie algali rispetto alla degradazione batterica (Gunnison & Alexander, 1975). La composizione elementare dell'algaenan osservata nelle diverse specie di alghe risulta piuttosto simile: questa costituisce dall'1% al 6% in peso della cellula, presenta una struttura poco ramificata e ad alto contenuto di Carbonio. I maggiori elementi costituenti dell'algaenan sono catene carboniose C30-34 mono o poli-insature di acidi grassi idrossilici (cioè lunghe catene di atomi di carbonio e idrogeno con uno o più doppi legami C=C, un gruppo finale carbossilico -COOH e uno ossidrilico -OH) tenuti insieme tra loro da legami eteri ed esteri, i quali contribuiscono a formare una struttura estremamente resistente (Gerken, et al., 2012). La sua quantificazione avviene isolandola tramite idrolisi basica con KOH e successivamente acida con HCl o con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, oppure attraverso acetolisi con acido trifluoroacetico; grazie all'azione di questi agenti chimici avviene l'idrolisi di tutti i carboidrati di parete dei due strati esterni della TLS e può essere così quantificato il biopolimero algaenan, che dunque si rivela resistente rispetto a questo tipo di attacchi idrolitici (Gelin, et al., 1999).

Secondo quanto riportato da Kodner et al (Kodner, et al., 2009), diversi studi hanno dimostrato la presenza dell'algaenan nelle alghe appartenenti al phylum delle chlorophytae, delle heterokontophytae e in alcune specie appartenente al phylum delle dinophytae. È tra le alghe verdi (le chlorophytae), però, che la presenza dell'algaenan risulta più frequente, in particolare è stata rinvenuta spesso tra le alghe verdi del genere *Scenedesmus*, *Chlorella* e in alcune specie di *Chlamydomonas*.

È importante sottolineare la diversa incidenza del biopolimero tra i vari generi: esso infatti risulta quasi sempre presente nelle *Scenedesmus sp.*, mentre all'interno del genere *Chlorella* esistono molte specie in cui l'algaenan non è stata rinvenuta, come per la specie *C. vulgaris*, e specie in cui

la sua presenza dipende dalle condizioni ambientali in cui l'alga è cresciuta e dall'età cellulare. (Loos & Meindl, 1982), (Kodner, Summons, & Knoll, 2009).

L'algaenan non è mai stata rilevata al di fuori della parete trilaminare, esistono tuttavia studi in cui sono state osservate alghe aventi una parete trilaminare (TLS) ma assenza di algaenan come nel caso delle specie *Myrmecia sp.* e *Pseudochlorella sp.* (Brunner & Honegger, 1985).

La TLS si presenta come una struttura chimicamente inerte e incredibilmente resistente e conferisce all'alga notevoli proprietà come resistenza a stress fisici e alla maggior parte degli attacchi enzimatici (Staehelin & Pickett-Heaps, 1975) e funge da involucro esterno ad una seconda parete cellulare, alga-specifica.

Nello specifico la TLS è composta da due strati densi formati prevalentemente da carboidrati all'interno del quale si trova uno strato meno denso formato principalmente dall'algaenan (Gerken, et al., 2012); da analisi di assorbanza FT-IR dei campioni isolati risulta all'interno di questo strato intermedio anche una probabile presenza di proteine (minore del 10% in peso della parete) e di una regione contenente lipidi, con i quali le proteine instaurano una interazione idrofobica (Allard & Templier, 2000).

Nella tabella seguente Tabella 2.3 si riportano le specie algali del genere *Chlorophicae* di cui è stata osservata presenza di parete trilaminare e algaenan, compresi i casi in cui è stata dimostrata una eterogeneità intraspecifica dovuta a fattori ambientali e età cellulare:

Tabella 2.3: presenza di parete trilaminare e algaenan in diverse specie algali.

Specie algale	TLS	Algaenan	Riferimento
<i>Chlorella vulgaris</i>	No	No	(Gerken, Donohoe, & Knoshaug, 2013)
<i>Chlorella emersionii</i>	Si	Si	(Gerken, Donohoe, & Knoshaug, 2013)
<i>Chlorella fusca</i>	Si	ND	(Gerken, Donohoe, & Knoshaug, 2013)
<i>Chlorella saccharophila</i>	Si/No	ND	(Yamada & Sakaguchi, 1982)
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Si/No	ND	(Yamada & Sakaguchi, 1982)
<i>Chlorella marina</i>	ND	No	(Gelin, et al., 1999)
<i>Chlorella spaerckii</i>	ND	No	(Gelin, et al., 1999)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	No	No	(Arnold, et al., 2015)
<i>Botryococcus braunii</i>	Si	Si	(Kodner, Summons, & Knoll, 2009)
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	Si	Si	(Kodner, Summons, & Knoll, 2009)
<i>Scenedesmus acutiformis</i>	Si	Si	(Kodner, Summons, & Knoll, 2009)
<i>Scenedesmus deserticola</i>	Si	Si	(Kodner, Summons, & Knoll, 2009)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Si	Si	(Kodner, Summons, & Knoll, 2009)
<i>Scenedesmus pannonicus</i>	Si	Si	(Staehelin & Pickett-Heaps, 1975)
<i>Scenedesmus longus</i>	Si	Si	(Staehelin & Pickett-Heaps, 1975)
<i>Nannochloropsis granulata</i>	ND	Si	(Gelin, et al., 1999)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	ND	Si	(Gelin, et al., 1999)
<i>Nannochloropsis salina</i>	ND	Si	(Gelin, et al., 1999)
<i>Nannochloropsis sp.</i>	ND	Si/No	(Gelin, et al., 1999)

La morfologia e la struttura di tutti gli strati di parete sottostanti la TLS è stata studiata in modo approfondito solo per pochi generi algali, tra questi esistono numerosi studi su *Chlorella sp.* e alcuni su *Scenedesmus sp.* (Yamada & Sakaguchi, 1982), (Takeda, 1996), (Arnold, et al., 2015), (Loos &

Meindl, 1982) , (Thomas, et al., 2013)... . Di seguito si riporta una descrizione delle caratteristiche principali delle pareti di questi due generi, frequentemente impiegati nel biorisanamento.

#### *Struttura della parete cellulare di alghe appartenenti al genere Scenedesmus:*

Studi condotti su due specie di *Scenedesmus* (Staehein & Pickett-Heaps, 1975) hanno mostrato che questo genere di alghe presenta un involucro esterno, morfologicamente variabile a seconda della specie, che ha la funzione di rivestire l'intera colonia di alghe. Il rivestimento esterno della colonia nella specie *S. pannonicus* appare come una struttura reticolata, interrotta da vescicole, in cui si rileva uno strato pectinaceo filamentoso che forma una griglia con luci tra i 3-13 nm. Al di sotto di questo rivestimento esterno ogni singola cellula ha la propria parete trilaminare, della cui struttura e composizione si è già parlato in precedenza.

Sottostante la parete trilaminare, *S. Pannonicus* presenta uno spesso strato di parete formata da cellulosa dopo la quale si trova infine la membrana plasmatica della cellula.

L'altra specie studiata dagli autori, *S. longus*, differisce per la struttura dell'involucro esterno che ricopre le pareti trilaminari delle singole cellule, al di sotto di questo involucro è presente la TLS e la parete di cellulosa analogamente a quanto è stato osservato per *S. Pannonicus*. La presenza della seconda parete composta da cellulosa tra le alghe del genere *Scenedesmus* può essere ipotizzata a partire dallo studio sopracitato e dalla prevalenza netta di glucosio tra gli zuccheri presenti nella parete rigida di tutte le specie di *Scenedesmus* studiate da H. Takeda (Takeda, 1996).

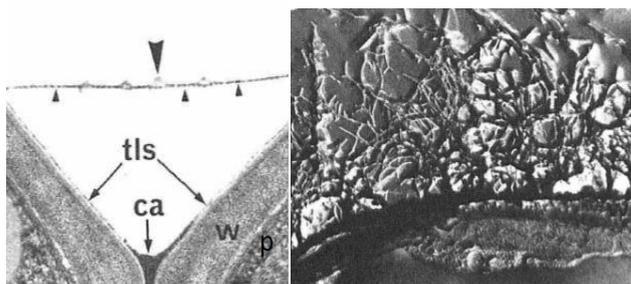


Figura 2.2: 2A:immagine TEM della parete di una colonia di due *S. pannonicus*. "tls" = parete trilaminare, "ca"=strato denso dell'involucro esterno, "w"=parete interna di cellulosa, "p"= membrana plasmatica. Le frecce indicano le vescicole che si formano sullo strato a bassa densità dell'involucro esterno che riveste la colonia. 2B: reticolo formato da pectina sull'involucro esterno di parete (strato elettronicamente poco denso). (Staehein & Pickett-Heaps, 1975)).

#### *Struttura della parete cellulare di alghe appartenenti al genere Chlorella*

La struttura della parete cellulare di *Chlorella sp.* è stata oggetto di studio di molte ricerche a partire dagli anni '60 (Olaitan & Northcote, 1961) fino ad arrivare ai nostri giorni (Baudelet, et al., 2017).

Il confronto tra tutti gli studi eseguiti, nonché l'esecuzione di ricerche mirate (Loos & Meindl, 1982), hanno dimostrato la forte discrepanza che intercorre nella composizione e nella struttura della parete all'interno del genere *Chlorella* e addirittura all'interno della stessa specie (Yamada & Sakaguchi, 1982) (Baudelet, Ricochon, Linder, & Muniglia, 2017); queste differenze si riflettono in una refrattarietà più o meno marcata all'attacco da parte di enzimi e quindi in un diverso grado di degradabilità dell'intera cellula (Yamada & Sakaguchi, 1982) (Gerken, Donohoe, & Knoshaug, 2013).

Come mostrato in Figura 2.3, la parete cellulare di un'alga appartenente al genere *Chlorella* può essere di tre tipi diversi (Yamada & Sakaguchi, 1982):

- ❖ Tipo 1: parete composta da due strati, il più esterno è trilaminare e contiene algaenan e lo strato interno è composto da microfibrille prevalentemente composte da cellulosa
- ❖ Tipo 2: parete composta da due strati, lo strato più esterno non è trilaminare mentre quello interno è composto da microfibrille prevalentemente composte da cellulosa
- ❖ Tipo 3: assenza di strato esterno, la parete è composta da un unico strato di microfibrille povere di cellulosa e con prevalenza di pectine



Figura 2.3: b=parete di tipo 1. D=parete di tipo 2. H=parete di tipo 3. (Yamada & Sakaguchi, 1982)

Evidenti eterogeneità intraspecifiche sono state rilevate per la specie *C. vulgaris* e *C. ellipsoidea*, nella prima è stata osservata parete di tutti e tre i tipi, nella seconda parete di tipo 1 e 2.

La classificazione appena esposta è in accordo con la più generica suddivisione della parete cellulare di *Chlorella sp.* che distingue la parete in una matrice polimerica plastica e in una frazione rigida, in analogia con la composizione della parete primaria delle piante descritta ad inizio paragrafo. La matrice plastica risulta essere idrolizzabile con NaOH o acido trifluoroacetico (TFA), è composta da acidi uronici, glucosio, mannosio arabinosio et al in proporzioni variabili (Gerken, et al., 2012) e può essere indicata con il nome emicellulosa (Abo-Shady, et al., 1993). La frazione rigida invece risulta essere resistente ad attacco alcalino e al TFA ed è composta prevalentemente da glucosamine, polimeri di glucosio e mannosio ed eventualmente da algaenan se la parete risulta trilaminare (Gerken, et al., 2013), (Baudelet, et al., 2017). Abo-Shady et al (Abo-Shady, et al., 1993) riporta che la parete di *C. vulgaris* è composta per il 25% da emicellulosa e per il restante da frazione rigida.

Gli studi condotti da Yamada (Yamada & Sakaguchi, 1982) mostrano presenza di  $\beta$ -polisaccaridi nelle microfibrille delle pareti di tipo 1 e 2, associabile alla presenza di cellulosa. Abbondante presenza di pectina è invece rilevata nella parete rigida di tipo 1 e in quella di tipo 3. L'azione degli enzimi si è rivelata efficace per la parete di tipo 2, variabile per la parete di tipo 3 e inefficace per la parete di tipo 1 (Yamada & Sakaguchi, 1982).

La presenza di cellulosa è ad oggi ancora molto discussa: Northcote et Coulding (Northcote & Goulding, 1958) hanno osservato una quantità pari al 15.4 % in peso della parete di  $\alpha$ -cellulosa in *C. pyreneidosa*, mentre altri autori ne escludono la presenza. Gerken et al (Gerken, et al., 2012) la esclude nella parete rigida di *C. vulgaris* e Baudelet et al (Baudelet, et al., 2017) ne esclude la presenza in tutte le *Chlorella sp.*

La grande discrepanza esistente è un'evidenza di come le condizioni di crescita e l'età della cellula siano fondamentali nella composizione della parete.

Di notevole interesse pratico risulta la parete di alcuni cianobatteri quali quelli appartenenti al genere *Spirulina* o alcune alghe verdi come *Chamydomonas reinhardtii* ed *Euglena gracilis*. Queste

alghe sono formate da una parete flessibile formata da glicoproteine e proteoglicani. Questo genere di pareti a base proteica offre generalmente meno protezione rispetto a quelle appena descritte, rendendo questo genere di alghe particolarmente interessanti per la fase di valorizzazione della biomassa (Nakano, et al., 1987).

### 2.1.2 COMPOSIZIONE BIOCHIMICA DELLA CELLULA

Conoscere la composizione biochimica di una specie o di un consorzio algale può risultare utile per stabilire il corretto apporto di nutrienti in fase di crescita, stimare le efficienze di rimozione nell'ambito del biorisanamento o valutare le potenzialità del substrato in fase di valorizzazione della biomassa.

Le formule brute che descrivono la composizione di una singola cellula forniscono informazioni sui rapporti stechiometrici sussistenti tra gli elementi che compongono la cellula e vengono utilizzate soprattutto nell'ambito del biorisanamento e della coltivazione. Esistono diverse formule stechiometriche per descrivere la composizione elementare della biomassa algale, conseguenza della variabilità interspecifica che sussiste tra le microalghe. Larsdotter (Larsdotter, 2006) propone la seguente formula con particolare riferimento alle alghe coltivate nelle acque reflue:  $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$ .

Un'altra informazione utile sfruttata soprattutto nell'ambito della valorizzazione della biomassa è data dalla conoscenza della composizione percentuale delle cellule algali in termini di macromolecole biologiche quali proteine, lipidi e carboidrati. In questo caso la variabilità interspecifica è talmente elevata che assai raramente viene fornita la composizione di una generica cellula microalgale, si preferisce piuttosto considerare la composizione percentuale di generi o di specie algali che si dimostra anche in questo caso fortemente dipendente da fattori ambientali, condizioni di crescita e età cellulare. La Tabella 2.4 riporta la composizione percentuale media misurata in alcune specie algali:

Tabella 2.4: Composizione percentuale di alcune specie algali in termini di macronutrienti. Tabella riadattata da (Roberts, Heaven, & Banks, 2016) e (Sialve, Bernet, & Bernard, 2009) (Hsueh, Li, Chen, & Chu, 2009).

specie algale	Proteine	Lipidi	Carboidrati
	%	%	%
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-20	14-18
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	21	17
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	2	36
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	14-22	12-17
<i>Dunaliella salina</i>	57	6	32
<i>Nannochloropsis oculata</i>	29-36	21-25	24-34
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	6-7	13-16
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	4-9	4-8
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	12-14	10-17

### 2.1.3 METABOLISMO

Il metabolismo (dal greco μεταβολή «mutazione») è l'insieme delle reazioni di natura biochimica svolte per la produzione di energia e di nuovo materiale organico necessari per la sintesi cellulare e per lo svolgimento delle funzioni vitali della cellula (Gerardi, 2003).

Si è soliti suddividere l'intero processo in due parti, il catabolismo (dal greco καταβάλλω «demolire») che serve all'organismo per ottenere energia e l'anabolismo (dal greco ἀναβάλλειν = "costruire") che prevede invece l'uso di energia e di un substrato carbonioso per la sintesi cellulare (Gerardi, 2003).

A seconda della fonte da cui si ricava l'energia, gli organismi si suddividono in fotosintetici se ricavano energia dalla radiazione luminosa, e chemiosintetici, se ottengono l'energia da reazioni redox. Esiste un'ulteriore suddivisione in base alla provenienza del carbonio utilizzato per la costruzione di nuovo materiale cellulare: gli organismi eterotrofi utilizzano carbonio in forma già organicata, mentre gli organismi autotrofi utilizzano carbonio presente in forma inorganica (Bonomo, 2008).

Secondo la definizione fornita nel Cap. 2.1 tutte le microalghe sono in grado di adottare un metabolismo autotrofo e di ricavare l'energia necessaria per il proprio sostentamento dalla luce tramite fotosintesi (Lee R. , 2008).

In realtà la gran parte di questi microrganismi è in grado di seguire diverse vie metaboliche, molti di essi infatti non sono fotoautotrofi obbligati e possono quindi adattarsi ad utilizzare diversi substrati per la loro crescita a seconda delle condizioni ambientali in cui vivono. Questa altissima adattabilità è possibile grazie alla compresenza all'interno della cellula sia dei cloroplasti, all'interno dei quali avviene il processo fotosintetico, sia dei mitocondri, dove avviene l'ossidazione del carbonio organico che fornisce l'energia e il substrato carbonioso per le fasi successive del metabolismo (Falkowski, 2013).

È stata osservata infatti attività microalgale sia in condizioni autotrofe, sia in condizioni eterotrofe che in condizioni mixotrofe.

Di seguito si riporta uno schema sintetico delle vie metaboliche osservate nelle microalghe e delle relative fonti di energia e carbonio utilizzate (Tabella 2.5). Le diverse vie metaboliche si differenziano in base ai prodotti finali ottenuti che possono essere ossigeno molecolare o anidride carbonica e negli effetti che queste hanno sul pH della soluzione in cui gli organismi vivono, come mostrato in Tabella 2.5.

Tabella 2.5 : Fonti di energia e di Carbonio utilizzate da alcuni microrganismi. Tabella adattata da (Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004), (Zaslavskaja, et al., 2001).

Metabolismo	Fonte di energia	Fonte di Carbonio	Specie esempio
Fotoautotrofo	Luce	Inorganica	Phaeodactylum tricornutum
Chemioeterotrofo	Reazioni redox	Organica	E. Coli
Fotoeterotrofo	Luce	Organica	Rhodospirillum
Mixotrofo	Luce e reazioni redox	Inorganica e Organica	Chlorella Vulgaris

Tabella 2.6: Prodotti finali e variazioni del pH. Tabella adattata da (Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004).

Metabolismo	Prodotti finali del metabolismo	
Fotoautotrofo	C (biomassa), O <sub>2</sub> , OH <sup>-</sup>	aumento del pH
Eterotrofo	C (biomassa), CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O	diminuzione del pH
Mixotrofico	C (biomassa), CO <sub>2</sub> , OH <sup>-</sup>	pH circa invariato

Il metabolismo fotoautotrofo prevede la presenza di una fonte di carbonio inorganico, generalmente rappresentata dalla CO<sub>2</sub> disciolta in acqua, e di una sorgente luminosa che, attraverso la fotosintesi, fornisce l'energia tale per ridurre il carbonio inorganico, in un processo che dunque prevede la trasformazione dell'energia luminosa in energia chimica di legame. L'energia luminosa viene spesso considerata al pari degli altri substrati fisici e, insieme alla CO<sub>2</sub>, risulta essere quasi sempre il fattore limitante nella cinetica di crescita delle microalghe in condizioni autotrofe (Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004).

Il metabolismo eterotrofo prevede unicamente l'utilizzo di una fonte di carbonio organico per la crescita, a seconda poi della fonte di energia utilizzata il metabolismo può essere chemioeterotrofo, quando l'energia necessaria per la crescita cellulare proviene da reazioni chimiche, o fotoeterotrofo quando invece proviene dalla radiazione luminosa (Perez-Garcia, Escalante, de-Bashan, & Bashan, 2011). È stata osservata e dimostrata sperimentalmente la crescita in condizioni eterotrofe per diverse specie di microalghe tra cui: *C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *C. regularis*, *Scenedesmus Spp*, *Chlamydomonas reinhardtii* (Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004). Questa via metabolica è considerata particolarmente interessante nella coltivazione su larga scala di microalghe poiché la crescita di biomassa all'interno di bioreattori bui risulta svincolata dalla presenza di luce solare e dalla sua diffusione all'interno del volume di acqua, in questo modo si riescono ad ottenere spesso produzioni di biomassa elevate, che possono arrivare a 150 g/L/d, contro le massime ottenibili da coltivazioni autotrofe ad alta densità che si attestano al massimo sui 30 g/L/d (Ogbonna, Masui, & Tanaka, 1997). Le maggiori limitazioni risiedono nei costi derivanti dall'utilizzo di una fonte di carbonio organico (in termini di acquisto del substrato ed energetici per il suo trasporto e alimentazione), nella maggior probabilità di contaminazione da parte di altri organismi eterotrofi e nella possibile inibizione da eccesso di substrato (Perez-Garcia, et al., 2011).

Per quanto riguarda il metabolismo mixotrofo, in letteratura ne sono riportate diverse definizioni: secondo J. Hata et al (Hata, et al., 2000) nel metabolismo mixotrofo viene utilizzato carbonio organico per l'anabolismo e la radiazione luminosa come unica fonte di energia; secondo Chojnacka (Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004) la mixotrofia prevede l'utilizzo della radiazione solare come fonte di energia tramite fotosintesi e la necessità di utilizzare sia un substrato organico che uno inorganico per la sintesi cellulare, mentre la capacità di utilizzare sia la via autotrofa che quella eterotrofa a seconda delle condizioni ambientali viene definita anfitrofia. Un'altra definizione viene fornita da Kim et al (Kim, et al., 2013) che definisce la mixotrofia come un meccanismo combinato che presenta caratteristiche autotrofe ed eterotrofe, in cui il Carbonio ottenuto dal catabolismo eterotrofo viene usata per la sintesi di nuove cellule, mentre il processo fotosintetico fornisce l'energia necessaria per la produzione di composti organici di accumulo.

Molti studi hanno dimostrato come questa via metabolica sia associata ad un rateo di crescita maggiore rispetto agli altri due (Bhatnagar, et al., 2010), (Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004). Studi riguardanti la crescita di microalghe in condizioni mixotrofe hanno rilevato l'assenza di meccanismi CO<sub>2</sub>-accumulanti all'interno dei cloroplasti di specie notoriamente mixotrofe come *E. gracilis* (Yokota, et al., 1989); l'assenza di tali meccanismi spiegherebbe per quale motivo la crescita tramite anabolismo eterotrofo per queste specie sia più veloce e preferita rispetto al metabolismo autotrofo in presenza di entrambi i substrati. Tuttavia le condizioni mixotrofe in numerosi studi sono risultate più favorevoli non solo rispetto a quelle autotrofe, ma anche rispetto a quelle eterotrofe (Liang, Sarkany, & Cui, 2009), (Yamane, et al., 2001). L'accumulo di clorofilla misurato nelle alghe in condizioni mixotrofe fa supporre che avvengano reazioni fotosintetiche e che dunque

l'ATP venga prodotto preferenzialmente tramite reazioni fotochimiche, rendendo dunque più vantaggiosa la mixotrofia rispetto all'eterotrofia per via della presenza di una fonte luminosa che aumenta la produzione di ATP e accelera l'anabolismo che invece è di tipo eterotrofo (Yamane, et al., 2001). Organismi come *E. gracilis* hanno una capacità ridotta di crescere in condizioni strettamente autotrofe (Yamane, et al., 2001) probabilmente per via dell'assenza di meccanismi di accumulo della CO<sub>2</sub> assimilata.

È stata osservata e dimostrata sperimentalmente per diverse specie la possibilità di utilizzare facoltativamente tutte e tre le vie metaboliche, tra queste ci sono: *E. gracilis*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*, *Spirulina platensis* (Bhatnagar, et al., 2010) (Sunjin, Park, Cho, & Hwang, 2013).

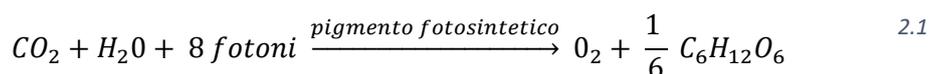
Un approfondimento in questa sede merita l'attività fotosintetica. Difatti, ogni forma di vita sulla Terra dipende direttamente o indirettamente dall'attività fotosintetica dei produttori primari per il proprio sostentamento e crescita (Richmond, 2013).

La fotosintesi è un processo unico che prevede la conversione dell'energia luminosa proveniente dal sole in energia chimica di legame, accumulata sotto forma di composti del carbonio organico; è uno dei pochi meccanismi conosciuti in grado di ridurre il carbonio organico e per questo è un processo fondamentale per l'intera economia biologica della Terra (Falkowski, 2013).

È proprio la necessità di avere accesso alla luce solare che ha modificato le caratteristiche del phytoplankton in modo tale da permettere alle alghe di galleggiare negli strati superficiali degli ambienti acquatici, dotandole di un alto rapporto superficie/volume e di vescicole vuote affinché il loro peso specifico diminuisse (Reynolds, 2006).

La fotosintesi comprende una serie di reazioni che iniziano con l'assorbimento della radiazione luminosa. Grazie all'energia così immagazzinata è possibile la sintesi del NADPH e del ATP, che svolgono il ruolo di composti accumulatori di energia, e porta infine alla riduzione del carbonio inorganico presente nella CO<sub>2</sub> nel ciclo di Calvin (Williams, et al., 2008).

La seguente reazione descrive genericamente l'intero processo (Eq. 2.1) (Falkowski, 2013):



L'Eq. 2.1 è una sintesi esemplificativa di un processo in realtà molto complesso che consta di numerose reazioni che avvengono in successione in diversi siti specifici della cellula. Solitamente il processo viene diviso in due parti: la prima fase comprende le reazioni chiamate "light reactions" e prevede l'assorbimento dell'energia solare e la formazione dei complessi NADPH e ATP, mentre la seconda fase del processo descrive l'organizzazione del carbonio presente nell'anidride carbonica, a spese dell' NADPH e dell'ATP ridotti in precedenza, secondo lo schema esplicitato in Figura 2.4 (Richmond, 2013):

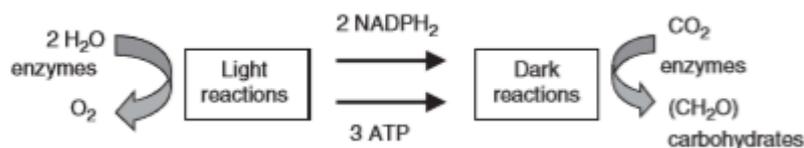
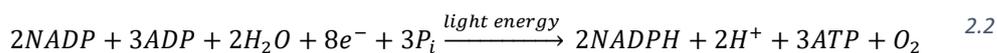


Figura 2.4: Rappresentazione schematica del metabolismo fotosintetico autotrofo. (Richmond, 2013)

Il ruolo principale delle *light reactions* è quello di fornire l'energia immagazzinata nelle biomolecole ridotte NADPH e ATP, necessaria all'organizzazione del carbonio. L'energia luminosa viene catturata attraverso due fotoreazioni, mediate da due complessi formati dall'unione di un pigmento fotosintetico e una proteina: PSI (fotosistema I) e PSII (fotosistema II) (Richmond, 2013). L'energia luminosa in natura è trasportata sotto forma di quanti tramite fotoni; l'energia di otto fotoni, pari al prodotto della loro frequenza per la costante di Planck, viene catturata da complessi antenna e trasferita nel PSII dove viene assorbita dai pigmenti fotosintetici e utilizzata per ossidare una molecola di H<sub>2</sub>O ed estrarne due elettroni. Dal PSII, tramite una catena di trasporto, gli elettroni vengono trasferiti nel PSI dove vengono usati per ridurre due molecole di NADP in 2 NADPH (Falkowski, 2013).

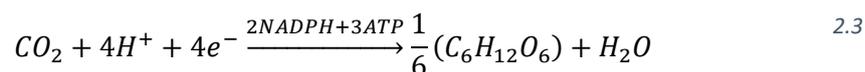
Contemporaneamente rispetto alla catena di trasporto di elettroni, i protoni H<sup>+</sup> sono trasportati dal PSII, che si trova all'interno dei tilacoidi, attraverso la membrana tilacoidale, fino allo stroma, cioè negli spazi intratilacoidali. La formazione di un gradiente di pH, secondo l'ipotesi chemiosmotica di Mitchell, porta alla sintesi dell'ATP, catalizzata dal complesso proteico enzimatico ATP sintase (Richmond, 2013).

Complessivamente questa prima fase che comprende l'insieme delle *light reactions* può essere scritta secondo la seguente equazione e prende il nome di fotofosforilazione (Eq. 2.2) (Reynolds, 2006):



La seconda fase del processo fotosintetico avviene nello stroma del cloroplasto e non necessita di radiazione luminosa, per questo l'insieme delle reazioni che la compongono vengono chiamate *dark reactions* (Reynolds, 2006).

La riduzione del Carbonio inorganico avviene a spese del NADPH e dell'ATP prodotti nella fase precedente. La reazione può essere schematizzata nel seguente modo (Eq. 2.3) (Richmond, 2013):



Come si vede dall'Eq. 2.3 per ridurre una molecola di CO<sub>2</sub> sono necessarie due molecole di NADPH e 3 di ATP.

Tutti gli organismi fotosintetici contengono pigmenti organici per catturare la radiazione luminosa. Ci sono tre classi principali di pigmenti: le clorofille, i carotenoidi e le ficobiline (Richmond, 2013).

Questi pigmenti nelle alghe si trovano all'interno di complessi formati dall'unione di un pigmento ed una proteina, i quali sono inseriti all'intero del fotosistema I e del fotosistema II.

Le clorofille hanno due bande di assorbimento principali: tra i 450-475 nm, fascia corrispondente al colore blu, e tra i 630-675 nm, lunghezze caratteristiche del rosso. I colori complementari vengono invece riflessi, motivo per cui gli organismi fotosintetici che hanno la clorofilla come pigmento principale risultano di colore verde.

Le alghe hanno quattro tipi di clorofilla, A, B, C e E. La clorofilla A è il pigmento fotosintetico primario, presente in tutti i fotosistemi I di ogni specie algale, mentre le altre clorofille hanno una distribuzione limitata, specie-specifica e vengono chiamati pigmenti accessori (Lee R. , 2008).

I carotenoidi costituiscono un grande gruppo di cromofori biologici con spettro di assorbimento compreso tra i 400 e i 550 nm, risultano dunque di un colore giallo arancio, caratteristico delle foglie nella stagione autunnale, quando la clorofilla decade e il colore predominante viene stabilito dai carotenoidi, che invece si dimostrano pigmenti più stabili rispetto alla clorofilla (Merzlyak & Gitelson, 1995). All'interno dell'apparato fotosintetico svolgono diversi ruoli tra cui: (i) pigmenti accessori nel sistema di cattura della radiazione luminosa per aumentare lo spettro di assorbimento della luce, (ii) elementi strutturali nel complesso di cattura della radiazione e nei centri di reazione, (iii) protezione contro l'eccesso di radiazione luminosa incidente (Richmond, 2013).

Le ficobiline sono pigmenti accessori che assorbono la radiazione luminosa compresa tra i 500-650 nm. I cianobatteri e le alghe dell'ordine Rhodophyta e Cryptophyta e i cianobatteri hanno sviluppato dei complessi antenna contenenti come pigmento le ficobiline, che hanno il compito di trasferire la luce ai fotosistemi; queste alghe sono dunque in grado di espandere il range di radiazione luminosa che può essere utilizzata per la fotosintesi, caratteristica fondamentale per alcune alghe che si sono adattate a vivere in profondità dove la luce tende ad assumere lunghezze d'onda maggiori, meglio assorbite dalle ficobiline piuttosto che dalle clorofille (Lee R. , 2008). Le ficobiline rappresentano la componente non proteica dei complessi pigmento-proteina, l'intero complesso prende il nome di ficobiliproteina.

Le ficobiline si distinguono a seconda del caratteristico spettro di assorbimento in ficoeritrine, ficocianine e alloficocianine, queste ultime di particolare importanza poiché la loro densità di autofluorescenza è usata nelle analisi con il citofluorimetro per tracciare la presenza di clorofilla nel campione. (Lee R. E., 2008). Oltre che nei complessi antenna dei suddetti ordini, le ficobiline sono presenti negli altri organismi fotosintetici come pigmenti accessori nei fotosistemi.

Lo spettro di assorbimento di un'alga verde risulta dunque essere il seguente Figura 2.5 :

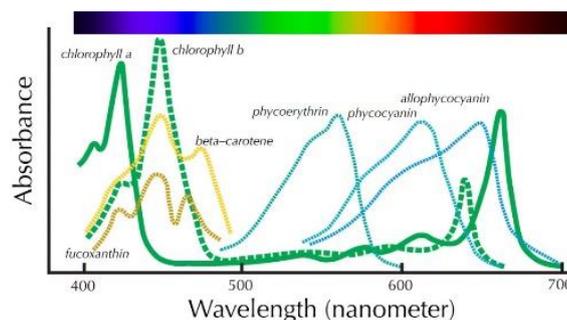


Figura 2.5: : Spettro di assorbimento di un'alga verde, immagine presa da (Hellwig, 2014).

#### 2.1.4 CURVE DI CRESCITA E FATTORI AMBIENTALI LIMITANTI

La crescita microalgale all'interno di un reattore batch in cui i nutrienti sono presenti in quantità sufficienti e le condizioni climatiche sono adeguate presenta un andamento caratteristico; esso è rappresentato nella Figura 2.6.

La curva di crescita caratteristica evidenzia quattro fasi:

1. Fase di latenza (lag phase): fase di adattamento delle microalghe al mezzo di coltura (sintesi di proteine, ATP, enzimi); la velocità di crescita è zero.
2. Fase esponenziale: fase in cui i microrganismi crescono alla velocità massima. La cinetica di crescita segue una legge esponenziale del genere:  $\frac{dN}{dt} = k * t$
3. Fase stazionaria: fase in cui la scarsità di nutrienti e l'accumulo di metaboliti tossici rallentano la crescita fino ad azzerarla; il numero di organismi rimane dunque costante poiché la velocità di crescita è uguale a quella di decadimento.
4. Fase di declino: fase in cui il numero di cellule vitali decresce, prevale dunque il decadimento cellulare, essendo sospesa sia la fase di divisione sia quella metabolica. Essa, in genere, avviene in seguito ad un'eccessiva concentrazione algale, all'esaurimento di nutrienti nel mezzo di coltura e all'instaurarsi di condizioni avverse alla crescita (carenza di nutrienti, temperature non idonee, presenza di sostanze tossiche, illuminazione inadeguata).

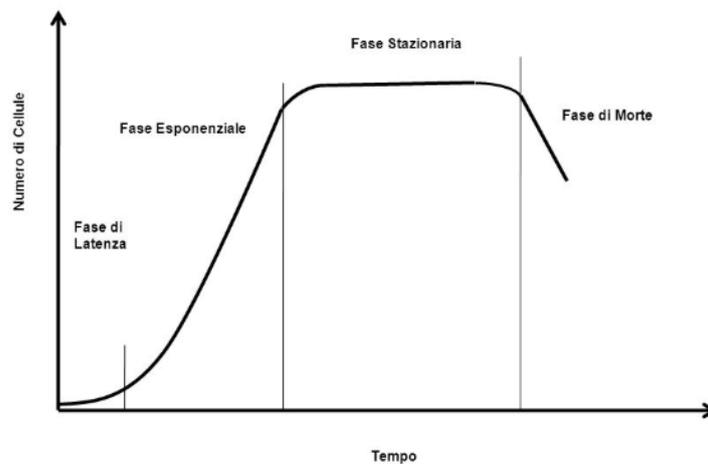


Figura 2.6: Modello di crescita in batch in condizioni ottimali

In natura, così come all'interno di reattori controllati, intervengono numerosi fattori che modificano il modello ideale sopra esposto e in generale rendono i modelli di previsione della crescita algale estremamente complessi (Richmond, 2013):

- ❖ Fattori fisici: adeguatezza di Intensità luminosa, Temperatura, turbolenza
- ❖ Fattori chimici: carenza o eccesso di una fonte di Carbonio, micro e macronutrienti, oligoelementi in traccia, presenza di OD, pH, salinità, presenza di composti tossici
- ❖ Fattori biotici: concentrazione della biomassa, presenza di predatori, patogeni e di specie competitive

In tutti gli organismi fotosintetici la crescita, l'assimilazione di nutrienti e tutte le attività metaboliche in generale dipendono direttamente dalla qualità della luce che gli organismi ricevono, dalla sua intensità e dai cicli giorno-notte. La curva attività fotosintetica-irradiazione (P-I) mostrata in Figura 2.7 descrive la dipendenza degli organismi fotosintetici dall'irraggiamento (Iluz, et al., 2014):

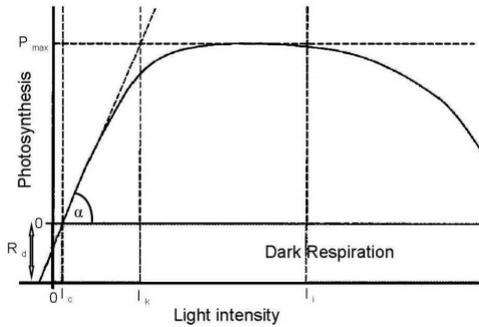


Figura 2.7: Relazione attività fotosintetica- irradiazione.

La derivata in 0 della curva  $P=P(I)$  rappresenta la massima crescita ottenibile del rateo di attività fotosintetica ( $\alpha$ ), l'intersezione di  $\alpha$  con il rateo massimo di attività fotosintetica  $P_{max}$  determina l'intensità ottimale, oltre la quale avviene il danneggiamento dei cloroplasti con conseguente fotoinibizione e riduzione del rateo di crescita. Anche i periodi giorno-notte hanno grande importanza nell'attività metabolica delle alghe, generalmente un aumento del periodo luminoso produce un aumento nella crescita algale fino ad una soglia massima di saturazione, che per alcune alghe è pari all'intero arco della giornata (Richmond, 2013).

La tolleranza delle microalghe rispetto alla temperatura è una caratteristica specie specifica, in genere le alghe possono tollerare temperature inferiori di diversi gradi rispetto all'ottimo, ma la loro attività decresce sensibilmente per temperature di pochi gradi superiori, come mostrato nella Figura 2.8 che riporta il rateo di crescita misurato nell'alga *Chloococcum littorale* in funzione della Temperatura (Ota, et al., 2015).

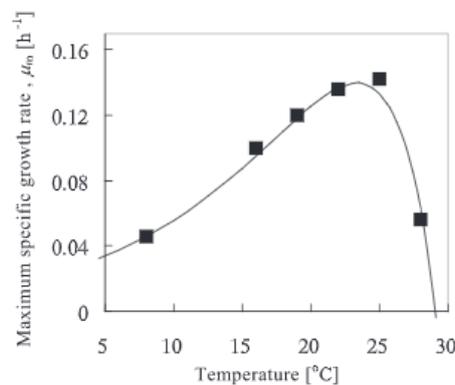


Figura 2.8: Tasso di crescita-Temperatura del medium. (Ota, Takenaka, Sato, Lee Smith, & Inomata, 2015)

In genere le alghe si suddividono in euriterme se sopportano grandi variazioni di temperatura e in stenoterme se mal tollerano variazioni di questo parametro (Richmond, 2013). A variazioni nella temperatura sono imputabili variazioni nei ratei di crescita, nelle rese e nella struttura delle singole cellule che possono subire degradazione dei pigmenti fotosintetici per temperature eccessive o accumulo di lipidi insaturi nella parete per resistere a temperature basse. Per quasi tutte le alghe l'optimum della Temperatura è compreso tra i 25 e i 30 ° (Singh & Singh, 2015).

Il pH è un fattore fondamentale nella crescita della biomassa algale. Determina infatti l'attività enzimatica della cellula, regola l'assorbimento dei nutrienti e determina inoltre l'equilibrio anidride carbonica-carbonati-bicarbonati, la precipitazione dei fosfati, la solubilità e la biodisponibilità di

nutrienti ed oligoelementi (Richmond, 2013). Le microalghe stesse sono in parte responsabili delle variazioni del pH, come descritto in Tab. 3. Il range ottimale del pH è altamente specifico, esistono alghe prevalentemente acidofile come le *E. gracilis* (Yamane, et al., 2001), ed alghe che invece crescono in ambienti basici, come la *Spirulina platensis* che predilige pH superiori a 8.5 (Ogbonda, et al., 2007).

La tolleranza nei confronti della salinità è un altro fattore che varia in modo sostanziale a seconda della specie considerate, le microalghe di acqua dolce sono solitamente ipotoniche, possono cioè sopportare basse concentrazioni di Sali, mentre le alghe di acqua marina sono ipertoniche. Sono documentati tuttavia casi in cui specie di acqua dolce riescono a crescere in ambienti con salinità pari a 40 g/l (Church, et al., 2017).

La capacità di scambio che il medium di crescita ha con l'atmosfera regola sia la concentrazione della CO<sub>2</sub> che quella dell'ossigeno disciolto. Negli ambienti naturali questo scambio avviene naturalmente, mentre nelle coltivazioni antropiche può essere favorito tramite turbolenza del mezzo o insufflazione di aria o di CO<sub>2</sub>. La CO<sub>2</sub> svolge il fondamentale ruolo di fonte di carbonio nella crescita autotrofa, inoltre contribuisce a tamponare l'innalzamento del pH.

La presenza di OD tende ad aumentare per via dell'attività fotosintetica; alte concentrazioni di ossigeno provocano sia un danno reversibile (chiamato effetto Warburg), che consiste nell'assorbimento preferenziale dell'OD rispetto alla CO<sub>2</sub> con conseguente rallentamento nella crescita, sia danni irreversibili di foto-ossidazione dei pigmenti fotosintetici (Asami & Akazawa, 1978).

La turbolenza assicura omogeneità nel medium di crescita in termini di temperatura, presenza di sostanze chimiche e esposizione alla radiazione luminosa; inoltre evita la sedimentazione per decantazione della biomassa (Richmond, 2013).

Tra i fattori biotici esistono fattori che influenzano negativamente la crescita, come la presenza di patogeni, predatori e organismi competitivi, e fattori che invece concorrono positivamente alla crescita algale, come l'instaurarsi di consorzi formati da alghe e batteri eterotrofi. All'interno di questi consorzi le alghe forniscono l'ossigeno necessario ai batteri per la respirazione, mentre i batteri producono la CO<sub>2</sub> necessaria alle alghe per l'attività fotosintetica. Grazie a questa simbiosi anche la capacità di assimilazione di nutrienti cresce, con evidenti vantaggi nell'ambito della depurazione delle acque reflue. I consorzi misti di alghe e batteri risultano inoltre più resilienti rispetto alle variazioni dei fattori ambientali appena descritti (Pires, et al., 2013).

#### 2.1.5 CAMBIAMENTI NELLA COMPOSIZIONE DELLE CELLULE INDOTTI DA FATTORI AMBIENTALI

Le condizioni ambientali hanno un'influenza sulla composizione biochimica delle microalghe.

Le perturbazioni dei fattori di crescita infatti hanno un effetto diretto sulla distribuzione dei flussi di carbonio che vengono sintetizzati dalle microalghe e determinano dunque la produzione di una macromolecola piuttosto che di un'altra (González-Fernández, et al., 2012).

Ad esempio se sottoposte a stress ambientali tali da inibire la divisione cellulare, le microalghe accumulano il carbonio sintetizzato dalla CO<sub>2</sub> sotto forma di lipidi, che costituiscono dunque una fonte di accumulo di energia. Una delle pressioni ambientali più comunemente indotte per stimolare l'accumulo di lipidi è costituita dalla carenza di azoto; poiché l'azoto rappresenta un macronutriente fondamentale per la crescita, in sua assenza la fase di anabolismo non può avvenire, e le alghe accumulano quindi l'energia in eccesso sotto forma di grassi (Xin, et al., 2010).

Nell'ambito della valorizzazione della biomassa algale, l'accumulo di specifiche macromolecole indotto da stress ambientali viene sfruttato per massimizzare la produzione di molecole target attraverso la variazione controllata delle condizioni operative nei reattori di crescita (González-Fernández, et al., 2012).

L'accumulo di lipidi viene indotto nelle microalghe utilizzate per la produzione di biodiesel. Le alghe generalmente utilizzate per produrre biodiesel come quelle appartenenti al genere *Chlorella*, *Spirulina* e *Dunaliella* sono composte per la maggior parte da carboidrati e proteine se si trovano in condizioni ambientali ottimali (Illman, et al., 2000), mentre in condizioni di carenza di nutrienti, alte concentrazioni di sali o bassa intensità luminosa la percentuale di lipidi può crescere notevolmente, fino a diventare prevalente (Cheng, et al., 2011).

Nel campo dell'acquacoltura è fondamentale la presenza di proteine, necessarie per la crescita degli organismi acquatici di cui le microalghe fungono da substrato. È stato dimostrato che la presenza di proteine nelle alghe marine usate per l'acquacoltura in condizioni controllate di temperatura può aumentare dal 15% al 64% a seconda della specie considerata, con notevoli vantaggi per lo sviluppo degli organismi acquatici che si nutrono di queste microalghe (Renaud, et al., 2002).

Nonostante gli incrementi della percentuale di molecole target ottenuti all'interno delle singole cellule, bisogna considerare che tutte le strategie citate inducono una forte pressione ambientale sugli organismi che induce un decremento nel rateo di crescita e nella produttività; è dunque opportuno considerare non solamente l'incremento percentuale nella singola cellula, ma anche la produzione totale del composto desiderato (González-Fernández, et al., 2012).

Nell'ambito della digestione anaerobica la presenza di lipidi all'interno delle cellule algali aumenta le rese teoriche di produzione di metano, tuttavia i lipidi hanno un rateo di idrolisi inferiore rispetto a carboidrati e proteine e la loro presenza generalmente è associata ad una degradabilità dell'alga inferiore per via dei prodotti di accumulo scarsamente idrolizzabili dai batteri. Inoltre la presenza abbondante di lipidi può indurre un accumulo di acidi grassi volatili in fase di acidogenesi, con conseguente inibizione del processo. Allo stesso modo un accumulo di proteine può provocare in fase di idrolisi e acidogenesi un accumulo inibente di ammonio. Per questi motivi, nonostante la più bassa resa teorica, è preferibile avere un incremento nella presenza di carboidrati all'interno delle cellule, che vengono accumulati sotto forma di amido prontamente biodisponibile per i batteri e facilmente idrolizzabile (González-Fernández, et al., 2012).

Un altro fattore da considerare per valutare l'applicabilità di strategie di crescita controllata nell'ambito della digestione anaerobica è dato dagli effetti collaterali che queste strategie possono avere sulla biodegradabilità della parete. Van Dook et al. (Van Donk, et al., 1997) hanno osservato la crescita di microalghe in carenza di nutrienti e hanno concluso che a seguito dello stress indotto, le cellule mostrano un ispessimento della parete cellulare dovuto alla formazione di composti di natura glicoproteica nella parete cellulare che contribuisce a renderle meno biodegradabili. È stata inoltre osservata la formazione di una mucosa extracellulare che conferisce ulteriore resistenza rispetto agli attacchi enzimatici da parte dei predatori (Van Donk, et al., 1997).

## 2.2 LA COLTIVAZIONE INTEGRATA DI MICROLAGHE IN IMPIANTI DI DEPURAZIONE DI ACQUE REFLUE

### 2.2.1 SISTEMI DI COLTIVAZIONE TRADIZIONALI

Un sistema di coltivazione delle microalghe prevede le seguenti fasi (Jankowska, et al., 2017):

- ❖ coltivazione
- ❖ separazione
- ❖ trattamento, accumulo e trasporto (facoltativi)
- ❖ valorizzazione della biomassa

Lo schema seguente riassume le modalità di coltivazione, trattamento e valorizzazione della biomassa (Figura 2.9)

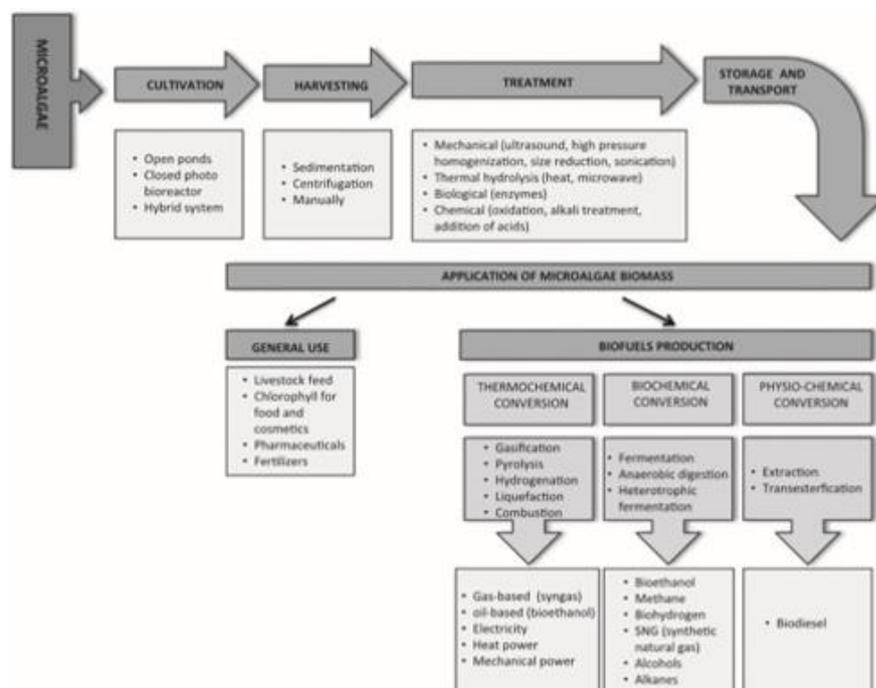


Figura 2.9: schema dell'intera filiera tradizionale di coltivazione, separazione, sottocaggio e valorizzazione della biomassa algale (Jankowska, et al., 2017)..

Di seguito verrà fornita una breve descrizione dei sistemi di coltivazione e valorizzazione della biomassa applicati tradizionalmente, si tralascia dunque la descrizione dei processi integrati di coltivazione e trattamento di acque reflue e valorizzazione della biomassa, oggetto del presente elaborato, che verrà approfondita nei capitoli successivi.

#### *Fase di coltivazione:*

I sistemi di coltivazione usati più di frequente a scala industriale e di laboratorio sono i seguenti:

- ❖ reattori aperti: raceway ponds (vasche a circuito chiuso), HRAP (vasche ad alto carico).
- ❖ reattori chiusi: PBR (fotobioreattori)
- ❖ sistemi ibridi

I reattori aperti vengono in genere utilizzati per il trattamento delle acque reflue. Sono caratterizzati da un basso costo di costruzione, installazione e manutenzione ma non possono essere utilizzati se si vogliono ottenere coltivazioni pure. Oltre ai rischi di contaminazione, tra le controindicazioni nell'uso di reattori aperti c'è l'impossibilità di gestire i parametri operativi e i fattori limitanti la crescita (di cui si è parlato nel capitolo 2.4), di prevenire il rischio di predazione delle microalghe e l'evaporazione del medium. La produzione massima ottenibile è di circa 10-25 g DM/d/m<sup>2</sup> (Kröger & Müller-Langer, 2012).

I sistemi di coltivazione chiusi, comunemente chiamati fotobioreattori (PBR) si classificano ulteriormente a seconda della loro forma, che rispecchia differenti modalità operative e offre dunque vantaggi differenti. I sistemi esistenti possono essere tubolari, essere costituiti da pannelli o da una colonna con gorgogliamento. Il principale vantaggio offerto dai PBR è costituito dalla possibilità di controllare efficacemente i parametri operativi e di crescita, potendo raggiungere in questo modo produzioni di biomassa comprese tra i 20 e i 100 gDM/d/m<sup>2</sup>, nonché di limitare notevolmente il rischio di contaminazioni (Jankowska, et al., 2017). Tra le maggiori controindicazioni nell'uso di reattori chiusi ci sono i costi operativi e di manutenzione, che rendono questi sistemi applicabili solo nel caso di coltivazione a scopi alimentari o per l'estrazione di molecole di alto valore.

Infine esistono sistemi di coltivazione ibridi, in cui il ruolo del reattore chiuso è quello di far sviluppare in modo controllato la specie algale desiderata che viene poi inoculata nel reattore aperto, questa scelta tecnologica offre la possibilità di poter selezionare nella colonna la comunità algale desiderata e di poter in parte regolare i parametri operativi ma è meno onerosa rispetto ai PBR per quanto concerne l'area totale occupata e i costi operativi (Jankowska, et al., 2017).

Nella produzione su larga scala la condizione impiantistica preferenziale è costituita dalla produzione in continuo in quanto non è necessario ripristinare le condizioni iniziali di partenza del bioreattore al termine di ogni ciclo. La coltivazione in continuo inoltre introduce la possibilità di automazione dei sistemi operativi e assicura una produzione giornaliera di biomassa più o meno costante. L'ostacolo più grande in questo caso è costituito dalla mancanza di conoscenza approfondita per la gestione dei parametri operativi, condizione questa che impedisce l'efficientamento dei processi con conseguente aumento dei costi operativi (Koller, et al., 2012).

I sistemi di coltivazione e le condizioni di crescita vengono scelte in base al tipo di prodotto finale che si vuole ottenere; una condizione che accomuna tutte le coltivazioni per la produzione di prodotti commerciali è la necessità di ottenere un'alta densità cellulare. Per questo motivo spesso la crescita eterotrofa risulta la più vantaggiosa, poiché la densità cellulare non rappresenta un ostacolo alla penetrazione della luce, tuttavia il metabolismo eterotrofo comporta costi maggiori e riduce drasticamente la presenza di pigmenti all'interno delle cellule algali, rendendo questa strategia di crescita inapplicabile per la produzione di diversi prodotti commerciali. Una strategia interessante è rappresentata dalla crescita mixotrofa in cui è previsto l'utilizzo come substrato organico di scarti di lavorazione, tuttavia in questo caso non è possibile l'uso delle microalghe nel campo nutraceutico e farmaceutico. È quindi di fondamentale importanza valutare la strategia che meglio si confà allo scopo finale della coltivazione (Koller, et al., 2012).

## *Fase di separazione della biomassa coltivata*

Una volta coltivata, la biomassa deve essere separata dal medium di crescita.

A seconda della specie, dei fattori ambientali e dei sistemi di coltivazione la concentrazione della biomassa all'interno dei bioreattori varia tra 0.2-20 gDM/l (Lee Y.-K. , 2001). A valle del processo di separazione la biomassa concentrata raggiunge indicativamente concentrazioni che variano tra i 20 ai 700 gDM/L per le applicazioni in scala laboratorio (Saharan, et al., 2013). I costi di separazione della biomassa solitamente costituiscono il 20-30% dei costi di produzione e la scelta delle modalità e della tecnologia appropriata dipende dalla specie algale, dalla densità della coltura, dall'uso successivo della biomassa e dalle condizioni di coltivazione (Jankowska, et al., 2017). Per prodotti dal basso valore commerciale la decantazione per gravità è la scelta più comunemente utilizzata per via dei bassi costi, nonostante le basse concentrazioni raggiungibili; l'efficienza di separazione può essere aumentata attraverso flocculazione tramite dosaggio di addensanti organici e inorganici. Per la produzione di prodotti ad alto valore commerciale, come prodotti alimentari o per l'acquacoltura, vengono utilizzate di solito centrifughe operanti in continuo (Pahl, et al., 2012).

Oltre ai costi operativi e alle efficienze di separazione conseguibili, bisogna tenere in considerazione le caratteristiche della specie da separare, come ad esempio le sue dimensioni, che incidono notevolmente sulle efficienze di separazione se si utilizzano metodi quali la filtrazione e la sedimentazione per gravità, e non ultima bisogna tenere in conto lo stato di integrità dell'alga a seguito del processo di separazione, che a seconda degli usi può essere considerato prioritario e portare all'esclusione di metodi particolarmente aggressivi come la centrifugazione (Jankowska, et al., 2017).

## *Fase di valorizzazione della biomassa*

Le microalghe trovano applicazioni di particolare interesse nell'ambito industriale e commerciale (Priyadarshani & Rath, 2012); nel campo della nutraceutica esse rappresentano una ricca fonte di carboidrati, proteine, vitamine e altri nutrienti essenziali, l'entità della biomassa coltivata per la nutraceutica si attesta intorno alle 8000 t/y (Spolaore, et al., 2006).

I pigmenti contenuti nelle microalghe vengono inoltre estratti e utilizzati in ambito cosmetico per la produzione di agenti addensanti, leganti, antiossidanti e schermanti e nel campo dei coloranti ad uso alimentare, mentre altri metaboliti e molecole dall'alto valore commerciale vengono estratti ed utilizzati per altri usi specifici quali acquacoltura, nutraceutica, pigmentazione (Spolaore, et al., 2006).

In ambito industriale le microalghe vengono coltivate per essere utilizzate come mangimi, fertilizzanti e in alcune applicazioni dell'industria farmaceutica.

Risulta inoltre di particolare interesse l'utilizzo di microalghe per la produzione di biocombustibili quanto le microalghe, rispetto alle fonti tradizionali di biocombustibili di prima e seconda generazione godono dei seguenti vantaggi:

- ❖ la loro attività fotosintetica permette la fissazione biologica della CO<sub>2</sub>, che può contribuire a mitigarne l'aumento in atmosfera (Mutanda, et al., 2011)

- ❖ rispetto alle piante terrestri, l'attività fotosintetica delle microalghe è tra le 10-50 volte più efficiente, questi organismi sono infatti in grado di fissare fino a 1.83 kg di CO<sub>2</sub> per kg di biomassa prodotta (Chisti, 2007).
- ❖ le microalghe possono essere coltivate su terreni non arabili come laghi, deserti, oceani e dunque non competono in termini di uso del suolo con la produzione agricola a scopo alimentare (Mussgnug, Klassen, Schluter, & Kruse, 2010).
- ❖ le microalghe capaci di crescere in acque marine possono essere coltivate in zone deserte, utilizzando l'acqua degli oceani, fornendo dunque energia laddove l'acqua dolce scarseggia (Torres, et al., 2013).

## 2.2.2 LA COLTIVAZIONE INTEGRATA IN IMPIANTI DI DEPURAZIONE DELLE ACQUE REFLUE

L'integrazione delle coltivazioni microalgali all'interno di impianti di depurazione acque è un promettente modello di economia circolare (Nizami, et al., 2017): viene sfruttata la capacità di biorisanamento delle microalghe per effettuare una parte del processo depurativo delle acque reflue e si ottiene biomassa che può essere valorizzata per la produzione di biocombustibili, VFA e fertilizzanti, rendendo la produzione di questi prodotti economicamente competitiva rispetto ai prodotti derivati dal petrolio (Montigelli, Tedesco, & Olabi, 2015).

Per via della loro composizione biochimica e del loro alto rateo di crescita, le microalghe sono in grado di rimuovere i composti dell'azoto e del fosforo con grandi efficienze di rimozione, questi nutrienti infatti vengono assimilati per la crescita algale riducendo al contempo il rischio di eutrofizzazione dei corpi idrici recettori e di inquinamento delle falde acquifere. Hena et al (Hena, et al., 2015) hanno misurato percentuali di rimozione di NH<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> su refluo chiarificato di origine zootecnica pari rispettivamente al 100%, 99.4% e 98.8%. In acque municipali le efficienze di rimozione di N<sub>tot</sub> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> sono sempre molto alte, sempre superiori al 70 (Delgadillo-Mirquez, et al., 2016), (Kim, et al., 2014).

In condizioni di crescita autotrofe la CO<sub>2</sub> può essere fornita attraverso lo scambio con l'atmosfera oppure in presenza di attività industriali tramite insufflazione di un gas di scarico, mentre in condizioni di crescita mixotrofa o eterotrofa la fonte di carbonio organico può essere costituita direttamente dal COD presente nel refluo (Saratale, et al., 2018). Anche per quanto riguarda le efficienze di rimozione del COD, in presenza di alghe eterotrofe o consorzi alghe-batteri, queste si attestano sempre al di sopra del 90% (Hena, et al., 2015), (Kim, et al., 2014). Un'altra importante capacità osservata nelle microalghe è quella di poter rimuovere i metalli pesanti di cui possono essere ricchi alcuni reflui di origine industriale e che, una volta entrati all'interno della catena alimentare dell'ecosistema abitante il corpo idrico recettore, sono interessati dal fenomeno del bioaccumulo, con gravi ripercussioni su tutta la catena trofica; le percentuali di rimozione ottenibili dipendono dal tipo di metallo e dalle condizioni operative del consorzio, ma possono superare il 90% per metalli quali il cromo e il cobalto e colture immobilizzate (de-Bashan & Bashan, 2010).

All'interno degli impianti di depurazione le microalghe vengono coltivate in reattori aperti di tipo HRAP (High Rate Algal Pond) o reattori raceway convenzionali. I primi sono dimensionati per ottimizzare la crescita delle alghe, sono profondi dai 30 ai 100 cm, hanno un HRT compreso tra i 4-10 giorni e la velocità dell'acqua al loro interno va dai 10-30 cm/s. I reattori raceway tradizionali sono analoghi ma più profondi e hanno un grado di turbolenza minore per ridurre i costi di esercizio e la superficie totale a parità di volume del reattore, nonostante le concentrazioni della biomassa

si attestano solitamente tra 0.5-1 g/l rappresentano la soluzione ad oggi più comunemente utilizzata (Rawat, et al., 2011).

I fattori che determinano la crescita algale e di conseguenza che determinano l'efficienza di rimozione degli inquinanti dalle acque sono l'intensità luminosa, la temperatura, la biodisponibilità dei nutrienti la quale dipende sia dalla concentrazione a cui si trovano che dalla loro forma (ad esempio l'assimilazione dell'azoto ha un'efficienza maggiore se questo si trova in forma ammoniacale piuttosto che nitrica) (Gonçalves, et al., 2017) il pH, che ha effetto non solo sull'attività metabolica delle alghe ma anche sulla biodisponibilità di alcuni elementi.

In realtà le condizioni di crescita sopra descritte non permettono mai lo sviluppo delle sole alghe all'interno dei raceway, si parla infatti più correttamente di biorisanamento ad opera di popolazioni miste costituite da alghe e batteri. Tra questi microrganismi si instaura una relazione simbiotica in cui le microalghe producono tramite la fotosintesi l'ossigeno necessario ai batteri per la degradazione della materia organica, riducendo i costi di insufflazione dell'O<sub>2</sub> all'interno del reattore, mentre la CO<sub>2</sub> prodotta dalla degradazione aerobica della materia organica da parte dei batteri costituisce il substrato per il metabolismo delle alghe, come schematizzato in Figura 2.10 (Gonçalves, et al., 2017) . Le popolazioni formate da consorzi alghe-batteri si sono dimostrate essere più efficienti rispetto a popolazioni singole nella rimozione di nutrienti, nella resilienza rispetto alle perturbazioni delle condizioni ambientali o a periodi di carenza di nutrienti, risultano inoltre meno vulnerabili rispetto all'invasione di altre specie e di predatori e la loro tendenza a flocculare rende la loro separazione dal medium di crescita più economico ed efficace (Pires, et al., 2013).

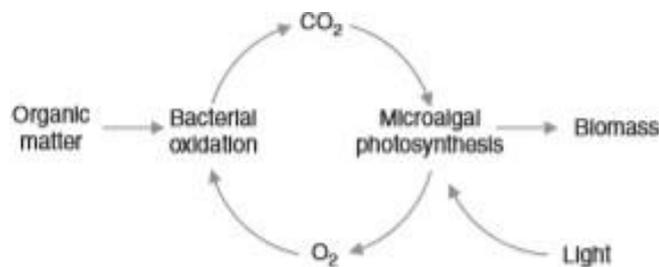


Figura 2.10: schema esemplificativo della relazione simbiotica di un consorzio alghe-batteri. (Muñoz & Guieysse, 2006).

Per la loro grande capacità di adattamento, il biorisanamento tramite consorzi algali è un processo che può essere applicato a diversi tipi di reflui e in diversi momenti della filiera di trattamento delle acque reflue (Razzak, et al., 2013).

A seconda delle caratteristiche del refluo e dell'impianto di trattamento possono essere applicate diverse configurazioni impiantistiche, il biorisanamento può infatti essere applicato dopo i trattamenti primari, integrando le microalghe nelle vasche dove avviene il processo a fanghi attivi, oppure come trattamento terziario per il recupero dei nutrienti; un'altra configurazione possibile e applicata soprattutto nel trattamento delle acque di origine zootecnica prevede l'inserimento del raceway a valle del processo di digestione anaerobica, per rimuovere dal separato liquido in uscita dal digestore anaerobico la presenza di nutrienti (Pizzera, et al., 2019) e altri contaminanti (Cai, Park, & Li, 2013); così facendo è possibile ottenere la rimozione da reflui tipicamente caratterizzati da alte concentrazioni di nutrienti, i cui carichi hanno contribuito pesantemente all'eutrofizzazione dei corpi idrici e all'inquinamento delle falde in quelle zone ad alta vocazione agricola e zootecnica.

Tali zone in Italia, secondo la direttiva Nitrati (91/676/CEE) recepita nel 1999, sono classificate come "Zone Vulnerabili da Nitrati di origine agricola" (ZVN) e sono soggette a vincoli estremamente stringenti (il carico massimo di azoto proveniente da effluente zootecnico per queste zone è pari a 170 kgN/ha/y contro i 340 kgN/ha/y per le zone non vulnerabili); il rispetto di tali vincoli implica oneri economici non indifferenti e ad oggi in gran parte di queste zone tali limiti non risultano rispettati, come mostra la sottostante Figura 2.11 relativa alla regione Lombardia relativa al 2018:

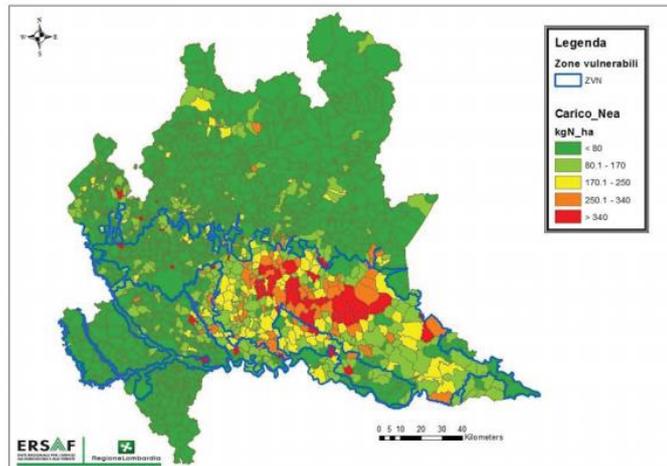


Figura 2.11: Carico di azoto da effluenti di allevamento al campo (kg/ha) su base comunale (Regione Lombardia, 2018).

Appare chiaro come in questi contesti l'integrazione delle coltivazioni algali all'interno degli impianti di trattamento può risultare estremamente vantaggiosa.

In Figura 2.12 si riporta un esempio possibile di layout impiantistico di un processo integrato di trattamento acque reflue, coltivazione alghe e valorizzazione della biomassa.

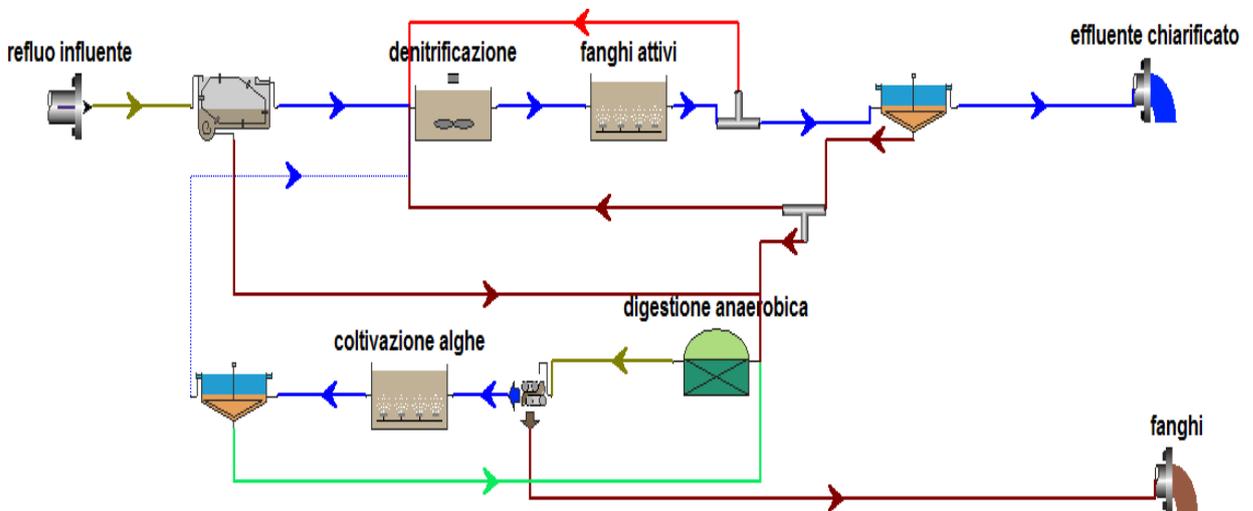


Figura 2.12: possibile layout impiantistico di un processo integrato di depurazione acque reflue e coltivazione algale su separato liquido del digestato.

Lo schema rappresentato in Figura 2.12 rappresenta una delle tante configurazioni possibili di un processo integrato depurazione-coltivazione, in particolare nello schema in figura l'alimento per la crescita è costituito da separato liquido in uscita dal digestore anaerobico.

Lo schema in Figura 2.12 riprende la configurazione esistente dell'impianto di depurazione di Bresso-Niguarda (MI) all'interno del quale è stato installato un impianto pilota per la rimozione di nutrienti e la contestuale produzione di biomassa algale da utilizzare in campo agricolo (Marazzi, et al., 2019).

Nello schema in Figura 2.12 invece la coltivazione della biomassa algale separata per decantazione viene poi co-digerita all'interno dello stesso reattore di digestione anaerobica già presente per il trattamento della linea fanghi e l'acqua in uscita dal raceway, ormai povera di nutrienti, viene ricircolata in testa al reattore.

### 2.2.3 VALORIZZAZIONE DELLA BIOMASSA COLTIVATA SU REFLUI

La valorizzazione della biomassa algale cresciuta sulle acque reflue è una fase di fondamentale importanza per rendere il processo di coltivazione integrato conveniente. Ovviamente la rosa dei prodotti ottenibili in questo caso è ridotta rispetto a quella elencata ad inizio Cap 2.2.1, per motivazioni igienico-sanitari. I prodotti di maggior interesse in questo caso risultano essere i biocombustibili, gli acidi grassi volatili (VFA) e i biofertilizzanti (Brennan & Owende, 2010).

Un aspetto molto interessante nell'ambito della valorizzazione di biomasse residue è dato dalla possibilità di integrare processi per la produzione di carburanti, energia e materiali all'interno della stessa filiera di produzione, al fine di aumentare le rese complessive della trasformazione ed abbattere costi e impatti sull'ambiente. Una filiera così descritta prende il nome di bioraffineria, definita dalla International Energy Agency come: "la lavorazione sostenibile di biomasse in una serie di prodotti con valore di mercato ed in energia".

Un simile concetto trova realizzazione nell'ambito della valorizzazione della biomassa algale ad esempio nelle proposte di diversi autori (Torres, et al., 2013), (Sialve, et al., 2009) di integrare il processo di digestione anaerobica a valle dell'estrazione di lipidi per la produzione di biodiesel, in modo da valorizzare gli scarti di lavorazione di questa attività producendo altra energia.

### *Biocombustibili*

La biomassa microalgale particolarmente ricca in carboidrati o lipidi, può essere utilizzata come fonte per la produzione di biocombustibili. I diversi prodotti e i processi che vengono eseguiti per ottenerli sono schematizzati nella figura sottostante (Figura 2.13):

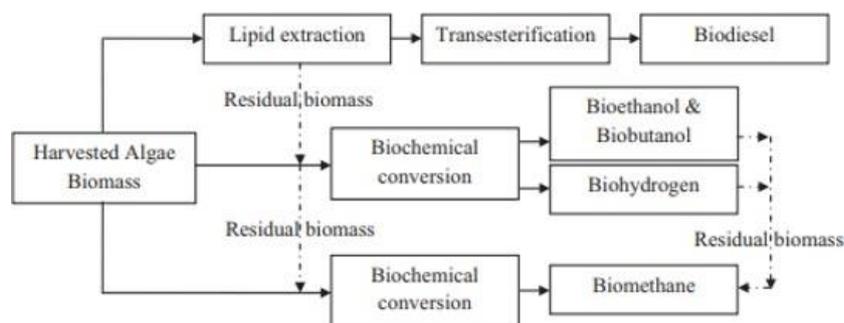


Figura 2.13: Produzione e tecnologie di processo di biocombustibili a partire da biomassa microalgale. Immagine da (Cheah, et al., 2016).

Per rendere l'intera filiera economicamente sostenibile i processi di coltivazione, separazione e conversione in energia devono essere resi vantaggiosi; con la coltivazione integrata negli impianti di trattamento acque i costi relativi al processo di coltivazione e separazione della biomassa

vengono ammortizzati (Park, et al., 2011) al contempo viene ridotto l'impatto ambientale del processo in termini di uso dell'acqua, di energia e di fertilizzanti necessari altrimenti per la crescita (Pittman, et al., 2011).

Studi di Analisi del Ciclo di Vita (LCA) comparativi tra il processo di produzione integrato e quello tradizionale (Yang, et al., 2011), hanno dimostrato che il primo metodo comporta una riduzione del 90% nell'uso di acqua pulita, del 94% nell'uso di oligoelementi e micronutrienti e del 100% per i macronutrienti.

Di seguito si riporta una breve descrizione dei principali biocombustibili prodotti ad oggi dalle microalghe, con esclusione del biometano, a cui è dedicato il capitolo successivo.

### *Biodiesel*

Il biodiesel è un carburante derivato da biomassa di matrice oleaginosa che può essere utilizzato direttamente all'interno dei motori, sostituendo completamente il diesel prodotto da fonti fossili (Mata, et al., 2010).

Il processo di produzione del biodiesel comprende una prima fase di estrazione di lipidi, che può avvenire mediante un processo fisico, tramite uso di solventi o di fluidi supercritici, seguita da un processo di transesterificazione in cui i trigliceridi estratti vengono convertiti in molecole dal più basso peso molecolare, i metil-esteri (anche chiamati FAME, fatty acid methyl esters), tramite reazione con metanolo o etanolo, in presenza di un catalizzatore esterno (Cheah, et al., 2016).

Il prodotto così ottenuto è composto per il 90-98% da metil-esteri, da acidi grassi a più alto peso molecolare (1-5%) e da una piccola percentuale residua di fosfolipidi, composti sulfurei e acqua, in concentrazioni tali da soddisfare gli standard imposti dalla International Diesel Standard for Vehicle (IDSV) e sostituire completamente il diesel tradizionale in tutte le sue applicazioni fossili (Mata, et al., 2010).

Rispetto alle biomasse di prima e seconda generazione, le microalghe si dimostrano un'opzione più vantaggiosa per via dell'alto contenuto di lipidi che possono presentare, per la possibilità di essere coltivate su reflui e per quanto esposto nel Par. 2.2.1.

La Tabella 2.5 mette in evidenza i vantaggi che si possono trarre dall'uso delle microalghe rispetto ad altre biomasse e l'area che sarebbe necessario dedicare alla coltivazione di queste se si volesse coprire l'intera domanda di diesel mondiale attraverso fonti rinnovabili. Nonostante gli incoraggianti risultati ad oggi il processo non è ancora competitivo, per via dei costi di separazione della biomassa, della necessità di operare con biomassa essiccata, le perdite di biomassa e la denaturazione del residuo in fase di estrazione dei lipidi che rende difficoltosa la valorizzazione degli scarti di produzione (Cheah, et al., 2016); inoltre è doveroso sottolineare che le percentuali di lipidi ipotizzate in Tabella 2.5, seppur ottenibili tramite opportune modifiche delle condizioni operative, causano una diminuzione del rateo di crescita della biomassa tale da rendere queste tecniche sconvenienti nel bilancio complessivo (González-Fernández, et al., 2012).

*Tabella 2.5: Rese in termini di gasolio e ettari necessari per soddisfare la domanda mondiale di gasolio. (Shuba & Kifle, 2018), (FAO, 2017).*

Biomassa	Rese di gasolio (l/ha)	Area necessaria per coprire l'intera domanda mondiale di gasolio (ha*10 <sup>6</sup> )
----------	------------------------	--

<i>Granturco</i>	172	1540
<i>Cotone</i>	325	15002
<i>Soia</i>	446	10932
<i>Semi di mostarda</i>	572	8524
<i>Semi di girasole</i>	952	5121
<i>Colza</i>	1190	223
<i>Olio di palma</i>	1892	2577
<i>Olio di jatropha</i>	5950	819
<i>Microalghe (10 g/m<sup>2</sup>, 30% lipidi)</i>	12000	406
<i>Microalghe (50 g/m<sup>2</sup>, 50% lipidi)</i>	98500	49
<i>Superficie totale messa a coltivazione (FAO, 2017)</i>	-	1600

La coltivazione integrata nella linea di trattamento acque infatti ad oggi rappresenta l'unica scelta che può rendere il biodiesel da biomassa algale competitivo sul mercato (Montingelli, Tedesco, & Olabi, 2015). Attraverso metodi di coltivazione tradizionali infatti è stato stimato che il costo del biodiesel da microalghe è pari a 2.5 volte quello del diesel derivante da fonti fossili, per via dei costi legati all'uso dei fertilizzanti, di acqua pulita ed energetici (Shirvani, et al., 2011).

#### *Bioetanolo*

Tra i biocombustibili liquidi, il bioetanolo è attualmente il più prodotto ed utilizzato. La sua produzione al 2015 si è attestata infatti a 100 bilioni di tonnellate (Hernández, et al., 2015).

Viene prodotto a partire dalla saccarificazione seguita dalla fermentazione di biomasse che contengono zuccheri, amido o cellulosa. La fermentazione è un processo biologico mediato da batteri anaerobici che converte gli zuccheri in etanolo: carboidrati, amido e cellulosa vengono idrolizzati, convertiti in piruvato, successivamente in acetaldeide e infine in etanolo. Il prodotto subisce in seguito un processo di distillazione per portare la concentrazione di etanolo dal 10-15% fino a circa il 95% (Cheah, et al., 2016).

L'etanolo così concentrato viene utilizzato come sostituto delle benzine nei motori dei veicoli mentre il residuo solido che deriva dal processo di produzione può essere utilizzato come mangime o valorizzato tramite gassificazione (Cheah, et al., 2016).

La percentuale di carboidrati presente nella biomassa algale è estremamente variabile e compresa tra il 14-34% (Tab. 2.4), tuttavia in carenza di nutrienti o alte intensità luminose viene rallentato l'anabolismo delle cellule e indotto l'accumulo di energia che in alcune specie algali quali quelle appartenenti al genere *Chlorella* e *Chlamydomonas* si traduce in un incremento di amido e carboidrati di parete, con percentuali di carboidrati che arrivano fino al 65% in peso (Ho, et al., 2013), (Choi, et al., 2010).

Un'altra strategia messa in atto con successo per aumentare le rese del processo di fermentazione è dato dall'uso di pretrattamenti chimici e biologici al fine di aumentare la biodisponibilità dei carboidrati presenti nella cellula (Choi, et al., 2010), (Harun, et al., 2011).

#### *Bioidrogeno*

Il gas idrogeno è considerato un promettente vettore energetico per le applicazioni future, poiché la sua combustione non produce CO<sub>2</sub>, è inoltre caratterizzato da un alto potere calorifico (242 kJ/mol), può essere prodotto da fonti rinnovabili e può facilmente essere convertito in energia tramite impieghi di fuel cells (Shuba & Kifle, 2018).

Attualmente viene prodotto tramite processi altamente energivori che utilizzano come fonte i combustibili fossili, con conseguenti ingenti emissioni di CO<sub>2</sub>. Tuttavia ad oggi sono conosciuti due processi attraverso i quali produrre H<sub>2</sub> a partire da fonti rinnovabili e a basso impatto ambientale:

- ❖ fotofermentazione biologica in condizioni anaerobiche (*photofermentation*)
- ❖ fermentazione convenzionale (*dark fermentation*)

La prima opzione prevede un'alterazione del normale processo fotosintetico (Par 2.1.3). Normalmente la fotosintesi prevede l'elettrolisi biologica dell'H<sub>2</sub>O, successivamente l'idrogeno si ricombina con la CO<sub>2</sub> per produrre materiale organico.

In condizioni anaerobiche alcune specie come *D. tertiolecta* e *C. reinhardtii* si sono dimostrate in grado di interrompere il processo fotosintetico allo step di elettrolisi dell'acqua grazie all'azione dell'enzima idrogenase, producendo dunque H<sub>2</sub> e non materia organica, con rese di trasformazione superiori al 50% (Cheah, et al., 2016). Tuttavia l'azione dell'enzima idrogenase compete con molti altri processi metabolici per l'elettrolisi delle molecole di H<sub>2</sub>O e le ricerche ad oggi sono ancora alla fase conoscitiva di questo interessante processo; la produzione di idrogeno attraverso fotofermentazione, seppur interessante, è un processo ancora lontano dall'applicazione su scala reale (Jones & Mayfield, 2012).

La seconda opzione invece prevede l'uso della biomassa algale come substrato per il metabolismo di batteri anaerobici, analogamente ai processi di produzione di metano ed etanolo. In questo caso il processo viene arrestato in fase di acidogenesi e vengono selezionati batteri che producono principalmente etanolo in fase liquida e idrogeno e anidride carbonica in fase gassosa. Rispetto alla produzione di metano, la produzione di idrogeno è caratterizzata da un rateo e una resa inferiori ed è considerato meno stabile, caratteristiche che rendono questo processo meno sfruttato su scala reale (Cheah, et al., 2016).

### *Acidi grassi volatili*

Con il termine VFA si intende l'insieme degli acidi grassi a catena corta, costituiti cioè da un numero di atomi di carbonio che va da 2-5 (Jankowska, et al., 2017). Essi rappresentano degli importanti intermedi di reazione per la produzione di un gran numero di prodotti dell'industria farmaceutica, nutraceutica e chimica, sono inoltre un'importante materia prima nel mercato della bioeconomia, in quanto vengono usati come substrato per la produzione di biocombustibili e bioplastiche (Atasoy, et al., 2018).

Ad oggi la produzione di acido acetico, butirrico e propionico si attesta rispettivamente a circa 1400, 100, 400 \*10<sup>3</sup> ton annue, per un valore di mercato di questi prodotti che si attesta intorno ai 600, 1600, 2200 €/ton; le proiezioni Eurostat per il 2020 prevedono inoltre che i VFA recuperabili dalle sole acque reflue in Europa siano di circa 2, 1.3, 1.5 \*10<sup>6</sup> ton (Atasoy, et al., 2018). Si intuisce dunque la grande opportunità proveniente dal recupero di VFA a partire da sottoprodotti residui e acque reflue.

Ad oggi più del 90% dei VFA viene prodotto a partire da fonti fossili, il recupero di questi a partire da biomasse non è ancora competitivo a livello economico per via delle basse efficienze che caratterizzano il processo di recupero, che lo rendono sconveniente se paragonato ai costi bassi delle fonti fossili; tuttavia gli alti impatti ambientali derivanti dalla sintesi di VFA da fonti fossili (dovute principalmente al tipo di substrato, all'alta richiesta energetica, la grande quantità di rifiuti tossici generati e di acque reflue da smaltire) conferiscono al recupero di VFA da prodotti residui una nuova prospettiva, dimostrata dai numerosi recenti studi per individuare le condizioni di processo ottimali per migliorare le efficienze di recupero (Jankowska, et al., 2017).

I VFA vengono prodotti tramite digestione anaerobica arrestata alla fase di acidogenesi: il processo dunque prevede l'idrolisi delle molecole complesse quali proteine, carboidrati e lipidi e la successiva trasformazione di questi composti in acidi grassi a corta catena (Jankowska, et al., 2017).

La produzione di VFA a partire da biomassa microalgale è un argomento ancora poco approfondito, tuttavia esistono diversi studi in cui, sotto determinate condizioni di pH e Temperature, si hanno avuto rese, espresse in  $g_{VFA}/g_{COD_{tot}}$  superiori a 0.8, superando quelle ottenute da biomasse ben più conosciute ed utilizzate come il siero di latte e l'insilato di mais (Jankowska, et al., 2017).

### *Biofertilizzanti*

Le acque reflue rappresentano una ricca fonte di azoto, fosforo e altri nutrienti secondari. Quando le microalghe vengono coltivate sui reflui sono in grado di assimilarne il contenuto di nutrienti, nelle quantità necessarie per la sintesi di nuova biomassa, ricavabile a partire dalla formula bruta che descrive la composizione della biomassa algale cresciuta su reflui (Larsdotter, 2006). L'alta percentuale di azoto e fosforo presente nelle alghe cresciute sui reflui le rende idonee ad essere utilizzate come fertilizzanti. Al 2015 la produzione mondiale di fertilizzanti minerali si è attestata sui  $120 \cdot 10^6$  ton di composti dell'azoto e sulle  $40 \cdot 10^6$  ton di composti di potassio e fosforo (Castellini & Palmieri, 2015), provocando grandi danni all'ambiente nonché l'assottigliarsi delle riserve di fosforo inorganico presente nel pianeta. La richiesta di fertilizzanti è inoltre destinata ad aumentare poiché azoto, fosforo e potassio costituiscono nutrienti essenziali per la crescita delle colture, e l'aumento della crescita demografica e la contestuale riduzione di terreni disponibili per uso agricolo rendono prioritario l'incremento delle rese delle produzioni agricole per superficie di terreno.

La biomassa microalgale, in base alla sua formula biochimica, contiene un'alta percentuale di azoto e fosforo, inoltre i cianobatteri, se utilizzati come biofertilizzanti, sono in grado di fissare l'azoto presente in atmosfera. Il ruolo dei biofertilizzanti infatti è quello di fornire micro e macronutrienti a lento rilascio, aumentare la capacità ammendante del suolo, restituire materiale organico ai terreni proprio come un fertilizzante-ammendante minerale, i biofertilizzanti inoltre hanno al loro interno una comunità batterica vitale che è in grado di interagire con i microrganismi presenti nel suolo e con le radici delle piante, contribuendo a contrastare la presenza di organismi patogeni e impattando positivamente sullo sviluppo della pianta (Renuka, et al., 2016).

Rispetto allo spargimento del digestato, l'utilizzo della biomassa algale cresciuta sul concentrato dello stesso refluo presenta il vantaggio di essere caratterizzata da un ben più lento rilascio di nutrienti, da minori evaporazioni di azoto sotto forma di ammoniaca e da una minore presenza di batteri patogeni (Mulbry, et al., 2006).

Le maggiori potenzialità nell'utilizzo delle microalghe come fertilizzante risiedono nel fatto che la produzione di fertilizzanti può avvenire a valle di altri processi, per la valorizzazione finale della biomassa residua. Nessuno dei processi sopra descritti nei paragrafi precedenti intacca il contenuto di micro e macronutrienti della biomassa, che invece rappresenta la proprietà principale di un fertilizzante. In questo modo è possibile integrare questo processo alla fine della filiera per la valorizzazione della biomassa algale, applicando il concetto di bioraffineria. Un simile approccio è particolarmente vantaggioso sia nella digestione anaerobica di biomassa algale, in cui il digestato rappresenta un fertilizzante dalle ottime qualità, sia in processi come la pirolisi e la gassificazione, in cui viene prodotto un residuo solido, il biochar, che nel caso di biomassa algale risulta ricco di nutrienti (Brennan & Owende, 2010).

## 2.3 PRODUZIONE DI METANO: DIGESTIONE ANAEROBICA DI MICROALGHE

### 2.3.1 LA DIGESTIONE ANAEROBICA: DESCRIZIONE E INDUSTRIALIZZAZIONE DEL PROCESSO

La digestione anaerobica consiste nella degradazione della sostanza organica in condizioni anaerobiche, in assenza cioè sia di ossigeno libero che di ossigeno legato ad altri elementi, sotto forma di nitriti, nitrati, solfati ecc. (Bonomo, 2008).

Il processo realizza la stabilizzazione della sostanza organica in ingresso attraverso la sua biodegradazione. Essa è convertita, tramite successive ossidazioni e riduzioni, nel suo stato più ossidato ( $\text{CO}_2$ ) e in quello più ridotto ( $\text{CH}_4$ ). Questi due composti gassosi sono i principali metaboliti dell'intero processo (Bonomo, 2008).

Il complesso delle reazioni che portano alla produzione finale di metano sono mediate da batteri appartenenti a diversi consorzi batterici sintrofici che operano in quattro fasi distinte del processo: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi (Metcalf & Eddy, 2014).

La digestione anaerobica è dunque un processo complesso che prevede lo svolgimento in serie di un grande numero di reazioni. Generalmente, quando un processo è composto da una sequenza di reazioni esiste sempre una fase che procede più lentamente delle altre; questa fase è quella che determina la cinetica del processo ed è chiamata fase limitante (Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991). Da un punto di vista operativo lo step limitante è quello che determina l'esito fallimentare di un processo qualora sovengano condizioni di stress cinetico (Lawrence & McCarty, 1970); tali condizioni di stress possono essere determinate dall'aumento del carico organico giornaliero (OLR), dalla diminuzione del tempo di residenza idraulico (HRT) e del tempo di residenza cellulare (SRT) (questi ultimi due possono essere svincolati o meno a seconda delle soluzioni impiantistiche). Un decremento progressivo del SRT adduce delle condizioni di stress tali da causare il dilavamento del ceppo batterico con la crescita più lenta, portando quindi all'interruzione del processo (Pavlostathis & Giraldo-Gomez, 1991).

Nella digestione anaerobica la fase limitante dipende dalla natura del substrato, dalla configurazione del processo, dalla temperatura di processo e dal carico organico applicato. Quando il substrato da digerire si trova in forma particolata e presenta componenti particolarmente resistenti rispetto all'attacco enzimatico la fase limitante risulta essere sempre quella di idrolisi (Vavilin, Fernandez, Palatsi, & Flotats, 2008) (Angelidaki & Sanders, 2004). Nell'applicazione dei processi anaerobici alla depurazione di reflui concentrati invece la fase limitante l'intera sequenza

degradativa è quella metanigena, causata dalla lenta crescita dei batteri operanti la metanogenesi (Bonomo, 2008).

Il buon esito del processo dipende dalla capacità di mantenere condizioni ambientali idonee per tutti i ceppi batterici operanti nelle varie fasi del processo. In particolare i fattori ambientali da gestire ed i parametri del processo sono:

- ❖ Temperatura
- ❖ pH e alcalinità
- ❖ Presenza di nutrienti e metalli in traccia
- ❖ Controllo su composti tossici e inibenti

La difficoltà principale risiede nel fatto che i batteri fermentativi hanno caratteristiche di crescita e condizioni ambientali ottimali molto diverse rispetto a quelle dei batteri metanigeni, è dunque necessario gestire il processo in maniera tale da garantire a tutti i batteri operanti le condizioni minime per la loro sopravvivenza e allo stesso tempo evitare l'accumulo di prodotti che possono rivelarsi inibenti.

La Figura 2.14 schematizza l'intero processo degradativo.

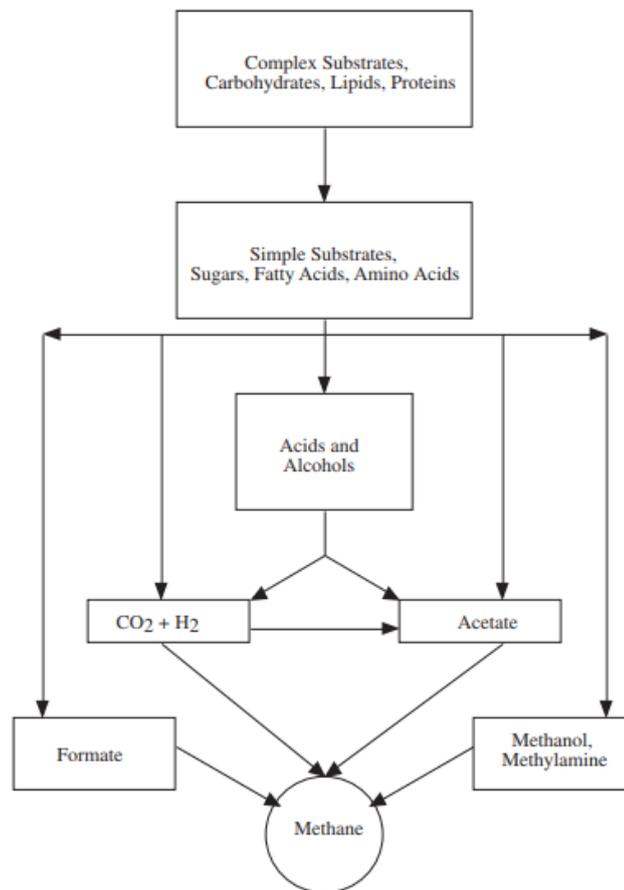


Figura 2.14: Schema del processo di digestione anaerobica. (Gerardi, 2003).

### 2.3.2 LA PRODUZIONE DI BIOGAS IN EUROPA ED IN ITALIA

L'industrializzazione biotecnologica del processo di digestione anaerobica ha consentito di passare dall'iniziale concetto di stabilizzazione estensiva della sostanza organica in ambienti naturali a veri e propri processi industriali per la produzione di biogas (Metcalf & Eddy, 2014).

Ad oggi il biogas è considerato una risorsa rinnovabile versatile, che può sostituire l'uso dei combustibili fossili nella produzione di energia e di calore, e che può essere utilizzato come carburante gassoso nei veicoli. Il biometano può inoltre sostituire il gas naturale come materia prima da cui ricavare materiali e componenti chimici (Wojciech, et al., 2017). La maggior parte degli impianti in attività trasformano direttamente in loco il biogas prodotto in energia termica o elettrica, che può essere utilizzata per necessità interne o immessa nel mercato. Il biogas può anche subire il processo di upgrading e immesso direttamente nei gasdotti che trasportano gas naturale (Scarlat, et al., 2018).

Secondo i dati riportati dalla European Biogas Association relativi all'anno 2014, in Europa esistono oltre 17000 impianti di biogas, per una potenza installata superiore a 8000 MW<sub>el</sub>. Il 62% di questi impianti si trova in Germania che conta sul suo territorio oltre 10700 impianti, segue l'Italia con circa 1500 impianti e la Francia con circa 800 impianti (European Biogas Association, 2014).

La costruzione di impianti di biogas in Europa ha visto un notevole incremento sotto la spinta delle politiche messe in atto dall'Unione Europea in materia di energia e clima. Per promuovere ed incoraggiare l'uso di fonti rinnovabili infatti in molti paesi europei sono stati proposti degli incentivi decisamente favorevoli che hanno portato alla nascita sul territorio di numerosi impianti di produzione di biogas, con benefici per i mercati, l'ambiente ed il clima (Scarlat, et al., 2018). In Italia fino al 2013 chi produceva energia elettrica a partire da biogas aveva diritto ad incentivi fino a 23 centesimi di euro per kWh prodotto, questa politica ha fatto sì che nell'anno 2011 il numero di impianti di produzione di biogas in Italia crescesse dell'81% (Torrijos , 2016).

Tuttavia le nuove tariffe entrate in vigore nel 2012, mirate ad incentivare esclusivamente impianti di piccole dimensioni che utilizzano scarti di produzione agricola e zootecnica e ostacolare di contro il controverso fenomeno delle "colture energetiche", ha avuto come conseguenza un incremento nel numero di impianti annuale del solo 5.5% (Torrijos , 2016) (European Biogas Association, 2014). Nonostante il rallentamento nella crescita della produzione di biogas verificatosi in tutto il continente europeo, nel 2013 l'energia elettrica prodotta dal biogas è stata di 47.5 TWh e quella termica di 48.7 TWh. L'energia totale prodotta è pari a quella consumata mediamente in un anno da 5.4 milioni di abitazioni in Europa, che corrisponde al numero di abitazioni presenti in Belgio e Slovenia messi insieme (Torrijos , 2016).

L'impatto della bioenergia in Europa è destinato ad essere sempre più importante in vista dei target fissati per il 2020, che prevedono che almeno il 20% del consumo finale di energia in Europa provenga da fonti rinnovabili così come il 10% del carburante usato per il trasporto (2009/28/EC Directive).

L'uso di energia rinnovabile in Europa, che nel 2008 rappresentava l'8.5% del consumo totale, nel 2015 ha raggiunto il 17% ed è destinato ad aumentare (Scarlat, Dallemand, & Fernando, 2018). In accordo con quanto riferiscono i National Renewable Energy Action Plan –NREAP- stilati da ogni paese membro dell'UE, entro il 2020 oltre il 34% dell'energia elettrica e il 15% dell'energia termica proverrà da risorse rinnovabili (European Renewable Energy Council, 2011). In questo scenario è

previsto che il 6.5% della produzione di energia elettrica e il 17.5% della produzione di energia termica proverrà da biomasse (European Renewable Energy Council, 2011), per un apporto totale sulla produzione di energia in Europa pari al 12% (Scarlat, Dallemand, & Fernando, 2018).

La produzione di bioenergia, come parte di un sistema economico chiamato “bio-based economy” che produce cibo, mangimi, prodotti, servizi ed energia a partire da risorse biologiche rinnovabili, può contribuire in modo significativo allo sviluppo di un’economia a basse emissioni di carbonio (Scarlat, et al., 2018).

In special modo la produzione di biogas può avere un grande impatto nello sviluppo delle economie rurali, incoraggiando la formazione di un nuovo sistema economico rurale, basato sulla valorizzazione di rifiuti e residui provenienti dall’agricoltura e dalle aziende zootecniche. L’utilizzo di rifiuti e residui di varia natura per la produzione di biogas si dimostra particolarmente interessante per l’assenza di effetti collaterali che caratterizzano altre fonti di energia rinnovabile e la stessa produzione di biogas proveniente da altri tipi di biomassa (Scarlat, et al., 2018). La valorizzazione di sottoprodotti e rifiuti provenienti dalle aziende agricole e zootecniche infatti contrasta l’emissione di inquinanti per lisciviazione ed evaporazione che si verificano nelle altrimenti necessarie fasi di stoccaggio, riduce le emissioni di gas serra perché l’energia prodotta sostituisce quella proveniente da combustibili fossili e rispetto ad altre modalità di produzione di energia non ha effetti negativi su uso del suolo e sicurezza alimentare (Hijazi, et al., 2016).

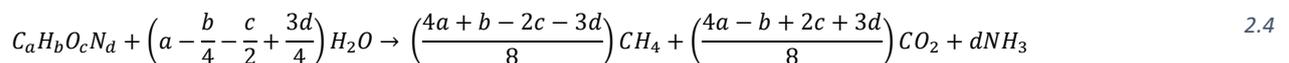
I dati aggiornati al 2014 indicano che la biomassa utilizzata in Europa è composta per il 74% da scarti agricoli, deiezioni animali e colture energetiche. Il 17% proviene dal recupero di biogas nelle discariche e il 9% da fanghi di depurazione (Scarlat, et al., 2018).

### 2.3.3 CARATTERISTICHE DEL SUBSTRATO E RESA DI METANO

L’esito e la stabilità del processo sono fortemente influenzati dalle caratteristiche fisico-chimiche della biomassa utilizzata, come il contenuto di umidità, di solidi volatili, di nutrienti, la distribuzione dimensionale dei solidi e non ultima la biodegradabilità del materiale (Divya, et al., 2015).

Conoscere la natura di un substrato organico è dunque un aspetto essenziale per capire se quella biomassa ha proprietà tali da garantire la buona riuscita del processo di digestione.

Sebbene i parametri di gestione del processo possano modificare sensibilmente l’esito del processo, la produzione massima teorica di biogas ( $G_{teor}$ ) e la sua composizione può essere prevista in base alla composizione elementare della matrice organica sottoposta al processo, sotto le ipotesi semplificative di assenza di crescita batterica e composizione del biogas binaria limitata a  $CH_4$  e  $CO_2$ . I prodotti di degradazione vengono quantificati nel seguente modo (Buswell & Boruff, 1932), Eq (2.4, 2.5, 2.6).



In condizioni normali, tenendo conto dei pesi atomici degli elementi, il volume di biogas prodotto per unità di solidi volatili degradati risulta:

$$G_{teor} \left[ \frac{m_n^3}{kg_{SSV}} \right] = \frac{a * 22.4 \left[ \frac{m_n^3}{kmol} \right]}{12a + b + 16c + 14d} \quad 2.5$$

La frazione di metano si esprime tramite l’Eq 2.6.

$$f_{CH_4} \left[ \frac{m_n^3 CH_4}{m_n^3 biogas} \right] = \frac{4a + b - 2c - 3d}{8a} \quad 2.6$$

Quando la composizione elementare non è nota, al fine di impostare i bilanci di massa, può essere utile riferire la produzione di metano all'unità di COD di substrato degradato; il COD contenuto nella sostanza organica degradata infatti viene trasferito interamente al metano, dal momento che l'anidride carbonica presenta un COD nullo.

### *Principali utilizzi del biogas*

Per poter essere utilizzato il biogas prodotto deve subire dei trattamenti primari che prevedono il raffreddamento e quasi sempre la rimozione di H<sub>2</sub>S presente. Applicazioni più avanzate prevedono la rimozione della CO<sub>2</sub> per ottenere un prodotto puro, il processo prende il nome di *upgrading* del biogas e può essere effettuato in diversi modi: assorbimento tramite zeoliti, fissazione chimica o biologica, separazione criogenica etc.

Le possibili applicazioni del biogas includono: i) combustione diretta per la produzione di calore. ii) produzione di energia elettrica tramite combustione in cicli combinati. iii) produzione di energia elettrica tramite fuel cells. iv) sostituzione del gas naturale negli usi domestici. v) iniezione diretta nei metanodotti (solo a seguito di *upgrading*). v) produzione di nuove molecole per l'industria chimica (Krich, et al., 2005).

### *Principali utilizzi del digestato*

Il digestato può essere definito come il residuo liquido proveniente dalla decomposizione anaerobica di biomassa di origine animale o vegetale. Considerate le sue caratteristiche fisico-chimiche l'utilizzo principale che viene fatto del digestato è nell'ambito agricolo come bio-fertilizzante e ammendante naturale (Eickenscheidt, et al., 2014).

Solitamente il digestato viene separato nella sua frazione liquida e in quella solida. La frazione liquida, il surnatante, è il prodotto più difficile da gestire per via del suo alto carico di nutrienti e materiale organico, che lo rendono altamente inquinante nel caso di lisciviazione o evaporazione incontrollata. Il surnatante nella maggior parte dei casi viene ricircolato in testa al reattore, mentre la frazione solida viene usata come fertilizzante ed ammendante previa eventuale ulteriore stabilizzazione (Koszel & Lorencowicz, 2015).

Il digestato usato come fertilizzante incrementa la fertilità del suolo, la qualità e la capacità delle piante di combattere agenti biotici e abiotici (Koszel & Lorencowicz, 2015). Diversi studi hanno dimostrato come l'uso del digestato abbia un impatto positivo sulla quantità e la qualità dei prodotti agricoli (Kouřimská, et al., 2012) e sull'accumulo di micro e macronutrienti nelle piante e nel suolo arricchiti con digestato rispetto a colture arricchite con fertilizzanti minerali (Koszel & Lorencowicz, 2015) (Chiew, Spångberg, & Baky, 2015). Uno studio condotto da Tambone et al (Tambone, et al., 2010) ha dimostrato come il processo di digestione anaerobico riduca sensibilmente la presenza di materiale organico rapidamente biodegradabile del prodotto in uscita, lasciando però pressoché inalterato il contenuto di materiali lignocellulosici e lipidi complessi, precursori degli acidi umici, che consentono il ricambio di carbonio organico nel suolo.

Il considerevole contenuto di minerali e la loro rapida biodisponibilità, rendono il digestato un perfetto sostituto dei fertilizzanti minerali (Koszel & Lorencowicz, 2015), la materia organica

presente inoltre conferisce al digestato capacità ammendanti paragonabili a quelle del compost (Tambone, et al., 2010). L'aumento della capacità drenante del suolo arricchito con digestato riduce il rischio di perdite di azoto per via del rilascio di ammonio (Weiland, 2010), sono inoltre notevolmente ridotti i fenomeni di lisciviazione dei composti azotati, associati principalmente alla presenza di azoto in forma proteica, che nel digestato è estremamente ridotta (Tambone, et al., 2010).

In generale si può concludere che il processo di digestione anaerobica ha come output un prodotto finale liquido, il digestato, con ottime capacità fertilizzanti per via dell'alto contenuto di nutrienti rapidamente biodisponibili e buone capacità ammendanti, contribuendo a reimmettere carbonio organico nel terreno e modificando positivamente la struttura fisica del terreno (Tambone, et al., 2010).

#### 2.3.4 DIGESTIONE ANAEROBICA DI MICROALGHE: CRITICITA' E POSSIBILI SOLUZIONI

Nell'ambito della produzione di biocombustibili di terza generazione, la digestione anaerobica è considerata la via più diretta di trasformazione della biomassa (Montingelli, et al., 2015). L'interesse per la produzione di biogas da digestione anaerobica di microalghe risale agli anni '50 del secolo scorso quando Golueke et Oswald studiarono la resa del processo di conversione dell'energia solare a metano attraverso il processo di fotosintesi e di crescita algale, valutando la resa metanigena finale pari a 0.5 m<sup>3</sup>/kg VSS (Golueke & Oswald, 1959).

Nel corso degli anni sono state eseguite diverse ricerche in quest'ambito e sono stati ottenuti risultati anche molto diversi tra loro; ad oggi le ricerche procedono con rinnovato interesse poiché sono stati resi tecnologicamente possibili nuovi processi quali ad esempio la digestione di biomassa algale già processata per la produzione di biodiesel (Torres, et al., 2013), la co-digestione di microalghe e scarti di altri processi e l'applicazione di pretrattamenti.

La digestione anaerobica di microalghe è un processo che ben si adatta alla valorizzazione della biomassa algale cresciuta sui reflui (Roberts, et al., 2016). Rispetto alla produzione di altri biocombustibili la produzione di biogas presenta una più alta resa di conversione, richiede meno trattamenti preliminari della biomassa, può essere utilizzata per la crescita algale la CO<sub>2</sub> proveniente dal trattamento di upgrading del biogas e possono essere utilizzate come substrato anche alghe povere di lipidi (Torres, et al., 2013).

La resa metanigena della biomassa algale può essere stimata a partire dalla composizione elementare della cellula, se è nota la specie algale utilizzata, attraverso l'Eq. 2.4, oppure a partire dalla caratterizzazione della cellula in termini di proteine, carboidrati e lipidi che presentano una diversa resa metanigena (Heaven, et al., 2011).

Nella pratica tuttavia il calcolo della resa teorica di metano (TMP, Theoretical Methane Potential) non è mai indicativa della produzione effettivamente conseguibile nelle prove in batch (BMP, Biochemical Methane Potential), e al più viene utilizzato come valore massimo di riferimento con cui comparare i risultati ottenuti. Torres et al (Torres, et al., 2013) hanno dimostrato come il contenuto di lipidi, che sono caratterizzati dalla più alta resa di metano, non siano in realtà strettamente correlati alla produzione effettiva di metano ottenuta. Infatti il fattore limitante il processo e che dunque determina la resa finale di metano è costituito dalla resistenza della parete cellulare dell'alga rispetto all'azione enzimatica. La recalcitranza della parete cellulare, di cui si è parlato nel par. 2.1.1, rende il contenuto interno della cellula inaccessibile ai batteri e ha come

conseguenza una produzione finale di biogas che nei casi di più alta refrattarietà non supera i 70 mL/gVS (Lakaniemi, et al., 2011).

Per questo motivo le caratteristiche che rendono una specie microalgale idonea per la digestione anaerobica sono l'assenza di una parete cellulare o una parete cellulare poco spessa e composta esclusivamente o da carboidrati semplici o da proteine, la cui lisi da parte dei batteri idrolitici risulta efficace (Torres, et al., 2013).

La Tabella 2.6 mette in relazione i risultati sperimentali della produzione di metano da biomassa algale non trattata con le rese attese dal calcolo stechiometrico della composizione della biomassa. La discrepanza tra i due valori è netta e indice di una bassa biodegradabilità del substrato tal quale.

Tabella 2.6: BMP e TMP a confronto per diverse specie algali.

specie algale	TMP L CH <sub>4</sub> /gVS	BMP L CH <sub>4</sub> /gVS	Riferimento BMP
Carboidrati	0.415		(Sialve, et al., 2009)
Proteine	0.851		(Sialve, et al., 2009)
Lipidi	1.014		(Sialve, et al., 2009)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0.69	0.245	(Wieczorek, et al., 2014)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	0.8	0.173	(Ometto, et al., 2014)
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.63-0.79	0.307	(Roberts, et al., 2016)
<i>Dunaliella salina</i>	0.68	0.276	(Roberts, et al., 2016)
<i>Isochrysis galbana</i>	0.568	0.349	(Roberts, et al., 2016)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	0.516	0.23-0.321	(Roberts, et al., 2016) (González-Fernández, et al., 2012a)
<i>Spirulina maxima</i>	0.63-0.74	0.32-0.24	(Sialve, et al., 2009)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.59-0.59	0.200	(Roberts, et al., 2016)
<i>Scenedesmus sp.</i>	0.492	0.116	(González-Fernández, et al., 2012a)
Mix da raceway	0.492	0.220	(Roberts, et al., 2016)
Mix da fotobioreattore	0.537	0.161	(Roberts, et al., 2016)

Le microalghe ad oggi sono considerate un'interessante materia prima da utilizzare come substrato per la produzione di biometano tramite digestione anaerobica, in alternativa all'utilizzo dei combustibili fossili, come dimostrano alcune valutazioni LCA (Roberts, et al., 2016). I benefici ambientali aumentano se si considera l'utilizzo di colture che assolvono anche al compito di trattamento di acque reflue o di cattura della CO<sub>2</sub> (McGinn, et al., 2011).

Tuttavia ad oggi ci sono ancora diverse problematiche che rendono la digestione anaerobica di microalghe un processo economicamente non vantaggioso e difficile da implementare a livello impiantistico (Ward, et al., 2014).

Tra le difficoltà più complesse da gestire su grande scala c'è la grandissima variabilità nella resa di metano evidenziata dai risultati sperimentali, la quale può oscillare per un substrato non pretrattato tra i 56 mL CH<sub>4</sub>/g VS (González-Fernández, et al., 2012a) e i 336 mL CH<sub>4</sub>/g VS (Cho, et al., 2013). Questa grande variabilità dipende in primo luogo dalla specie algale o dalla composizione del consorzio, che determina una differenza nella resa teorica e soprattutto nella biodegradabilità della parete cellulare, come esposto sopra e nel par.2.1.1. Inoltre concorrono fattori dovuti alle condizioni di crescita, determinate dalla temperatura, dall'irraggiamento, dalle

caratteristiche del medium e dalla loro variabilità (Par 2.1.5). Sia la composizione del consorzio algale sia i parametri della crescita e la loro variabilità temporale sono fattori il cui controllo risulta difficile e costoso, e diventa poi impossibile quando la crescita avviene in raceway aperti e l'alimento è costituito dalle acque di rifiuto.

Nonostante i carboidrati abbiano una resa di conversione in metano più bassa rispetto a proteine e lipidi, sono state eseguite prove di digestione anaerobica su alghe in cui è stato indotto un accumulo di carboidrati tramite crescita in condizioni di fosforo limitanti che hanno portato ad un aumento di resa di metano pari 67% (Markou & Georgakakis, 2011). I carboidrati infatti vengono accumulati sotto forma di amido e sono facilmente biodegradabili da parte dei batteri, a differenza di quanto accade con proteine e lipidi, che vengono accumulati in componenti strutturali della parete, come le glicoproteine (Passos, et al., 2014). Questi risultati dimostrano ancora una volta come il fattore determinante l'esito del processo di digestione anaerobica sia la biodisponibilità della sostanza organica presente e come questa dipenda da numerosi fattori.

Oltre ai problemi tecnici sopra esposti è necessario studiare nuove soluzioni per rendere il processo economicamente sostenibile (Ward, et al., 2014). I costi di produzione vengono abbattuti utilizzando come substrato di crescita reflui di diversa origine, è tuttavia necessario implementare nuove tecnologie non solo per la crescita, ma anche per la raccolta e la separazione della biomassa, processi che ad oggi costituiscono il collo di bottiglia verso lo scale-up per la progettazione di un processo integrato di trattamento reflui e produzione di bioenergia tramite microalghe (Saratale, et al., 2018). La bassa concentrazione conseguita a seguito dei trattamenti di separazione diminuisce la resa finale di metanogenesi, aumenta i costi di costruzione e di gestione degli impianti e la quantità di acqua in uscita da smaltire, per questo motivo i processi di separazione, concentrazione ed eventuale disidratazione sono stati identificati da tempo come limitanti (Golueke & Oswald, 1959) e rappresentano ancora oggi una sfida cruciale per rendere il processo sostenibile dal punto di vista economico (Ward, et al., 2014). Un'altra sfida fondamentale riguarda la valorizzazione del digestato, che nel caso di substrato algale risulta ricco di nutrienti, nonché l'ulteriore digestione del digestato residuo per esempio co-digerendolo insieme ad alghe marine nei periodi di bloom algali (Saratale, et al., 2018).

Tra le cause che limitano l'applicabilità del processo esistono poi tutti quei fattori che inibiscono il processo, tra quelli che si verificano con maggior frequenza ci sono: l'accumulo di VFA causato dal lento rateo di metanogenesi e l'alta presenza di lipidi, il basso rapporto C/N che caratterizza il substrato algale, l'inibizione data dalla presenza di sodio per le alghe marine, dalla formazione dell'ammoniaca e dell'acido solforico (Montingelli, et al., 2015). Quest'ultimo fattore tuttavia non ha mai comportato un'effettiva riduzione nella produzione di metano, nonostante siano state misurate concentrazioni di H<sub>2</sub>S superiori ai 200 mg/l (ben al di sopra dei 50 mg/l ritenuti essere la soglia minima di inibizione) durante prove di co-digestione con *Saccorhiza polyschides*, *Ulva sp.*, *Laminaria digitata*, *Fucus serratus* e *Saccharinalatissima* (Vanegas & Bartlett, 2013). Un altro fattore inibente è costituito dalla possibile presenza di composti tossici nelle alghe cresciute su reflui (Montingelli, et al., 2015). Nonostante tutti questi fattori sopra citati, la lenta e molto parziale idrolisi della biomassa è certamente considerata dalla maggior parte degli autori come lo step limitante dell'intero processo (Saratale, et al., 2018), (Ward, et al., 2014), (Montingelli, et al., 2015).

Per risolvere parte di questi problemi solitamente vengono adottate due differenti strategie: la co-digestione o il pretrattamento della biomassa (di questa seconda soluzione si parlerà profusamente nel capitolo successivo).

La co-digestione è definita come la digestione simultanea di una miscela omogenea di differenti substrati miscelati e utilizzati insieme per aumentare la resa del processo (Khalid, et al., 2011). Attraverso la co-digestione è possibile aggiustare il rapporto C/N verso valori maggiori, diluire eventuali composti inibenti, aumentare il carico organico e l'effetto tampone della soluzione (Saratale, et al., 2018). Tutti questi fattori possono portare ad un aumento della resa finale di biogas (Wang, et al., 2013), (Thorin, et al., 2017), tuttavia non sempre si verificano effetti sinergici dovuti alla co-presenza di matrici differenti (Carminati, et al., 2018).

Tutti gli autori citati concordano sulla necessità di eseguire ulteriori studi per valutare quale sia la percentuale ottimale dei substrati e le condizioni operative più favorevoli.

### 2.3.5 PRETRATTAMENTI DELLA BIOMASSA ALGALE

La digestione anaerobica di substrati complessi ha come fase limitante quella di idrolisi, il pretrattamento del substrato ha lo scopo di solubilizzare quei composti recalcitranti che gli enzimi liberati dai batteri non riescono ad idrolizzare, e di rendere dunque biodisponibile il contenuto organico interno alla cellula (Angelidaki & Sanders, 2004).

Il pretrattamento della biomassa algale è stato individuato come uno step fondamentale del processo di digestione anaerobica per aumentare la biodegradabilità del substrato (Chen & Oswald, 1998). Su questo tema sono state dunque svolte numerose ricerche, dagli esiti estremamente variabili.

L'efficacia di un pretrattamento infatti dipende dal grado di recalcitranza e dalla struttura della parete (Passos, et al., 2014), nonché dall'effettiva biodisponibilità del materiale rilasciato. Sono infatti numerosi i casi in cui si assiste ad un ingente rilascio di materiale organico in soluzione che però non si traduce in un aumento della biodegradabilità finale (e di conseguenza della resa di metano), evidenza del fatto che il rilascio di materiale solubilizzato da solo non è un parametro che garantisce il buon esito di un pretrattamento (Cho, et al., 2013).

In generale le finalità di un pretrattamento sono: i) la rottura totale o parziale della parete. ii) la riduzione delle dimensioni del particolato con il conseguente aumento dell'area superficiale specifica. iii) la degradazione della struttura di matrici fibrose. iv) la solubilizzazione di composti recalcitranti e difficilmente biodegradabili. v) la parziale idrolisi dei polimeri presenti nelle cellule ed eventualmente vi) la disattivazione di composti tossici. Allo stesso tempo è fondamentale che un pretrattamento rispetti i seguenti vincoli (Córdova, et al., 2018):

- ❖ Preservare il contenuto organico inizialmente presente
- ❖ Conservare il contenuto organico presente in una forma che sia bio-accessibile ai batteri
- ❖ Evitare la formazione di composti inibenti o tossici

È inoltre fondamentale che la tecnologia utilizzata sia riproducibile a livello impiantistico e che l'aumento della resa metanigena conseguito copra i costi dell'applicazione del pretrattamento stesso, rendendolo economicamente vantaggioso.

Nel corso degli anni sono state proposte numerose tecnologie di pretrattamento, che vengono solitamente suddivise in biologiche, fisiche, chimiche e fisico-chimiche (Montigelli, Tedesco, & Olabi, 2015).

#### 2.3.5.1 PRETRATTAMENTI FISICI

I pretrattamenti fisici hanno lo scopo di ridurre la dimensione delle macromolecole che compongono la parete cellulare per mezzo dell'applicazione di una forza fisica o di alte temperature e/o pressioni, per questo motivo vengono a loro volta ulteriormente suddivisi in pretrattamenti meccanici e pretrattamenti termici o idrotermici. I primi prevedono l'applicazione di una forza meccanica che riduca le dimensioni dei solidi, i secondi invece mirano a solubilizzare il contenuto cellulare tramite calore combinato o meno ad alte pressioni (Córdova, et al., 2018).

La maggior parte dei pretrattamenti fisici, pur portando ad un incremento nella produzione di biogas, è caratterizzata da un bilancio energetico negativo, poiché la grande richiesta energetica per l'applicazione di questo tipo di pretrattamenti non produce un aumento nella produzione di metano tale da giustificare l'uso (Ometto, et al., 2014).

Ogni pretrattamento fisico agisce in modo differente sull'idrolisi cellulare, tra i pretrattamenti meccanici più studiati ci sono sicuramente il pretrattamento a ultrasuoni, anche chiamato sonicazione, il pretrattamento tramite microonde e il pretrattamento termico. Di seguito viene fornita una descrizione dei seguenti pretrattamenti, i restanti pretrattamenti fisici non sono stati descritti in quanto poco diffusi a scala di laboratorio e decisamente difficili da poter applicare su scala reale (Córdova, et al., 2018).

La *sonicazione* consiste in rapidi cicli di compressione e decompressione delle cellule generati dall'applicazione di onde sonore a bassa (<50 kHz) ed alta (>50 kHz) frequenza. Questo tipo di pretrattamento sfrutta l'effetto della cavitazione sonora, che consiste nella produzione di microbolle di vapore all'interno del mezzo, generate dall'applicazione ciclica di onde sonore, che esplodono per via dell'effetto di compressione e decompressione che subiscono, producendo calore, radicali liberi, alte pressioni e onde d'urto che provocano il danneggiamento della cellula (Passos, et al., 2014).

Una volta impostata la frequenza delle onde, i parametri che possono essere controllati sono la potenza della sonicazione e il tempo di esposizione, che combinati determinano l'energia applicata al campione. Il parametro che determina l'esito del pretrattamento è l'energia specifica applicata, calcolata come il prodotto tra potenza applicata per la durata diviso la massa pretrattata, espressa dunque in kJ/kgTS, come dimostrano gli studi eseguiti da González-Fernández et al (González-Fernández, et al., 2012a) e da Cho et al (Cho, et al., 2013) in cui vengono misurati incrementi di resa di metano progressivi con l'aumentare della potenza specifica applicata, che vanno da incrementi nulli fino a incrementi dell'88% rispetto al campione non trattato. Ci sono tuttavia studi in cui non viene rilevata una correlazione tra incremento di resa metanigena e energia specifica applicata, come riportato da Alzate et al (Alzate, et al., 2012) in cui in tre specie algali differenti non si verificano aumenti di resa all'aumentare dell'energia applicata durante la sonicazione, è possibile in questo caso che l'energia specifica più bassa applicata sia già sufficiente a creare il massimo effetto ottenibile da questo tipo di pretrattamento.

La solubilizzazione della sostanza organica non risulta un parametro indicativo del buon esito del pretrattamento; tali incrementi infatti, misurati in termini di aumento di COD<sub>sol</sub> o di percentuale di

solidi volatili solubilizzati, sono piuttosto piccoli se paragonati a quelli di altri trattamenti fisici, ma aumentano progressivamente con l'energia specifica applicata, anche laddove non si verificano aumenti di resa nella produzione di metano (Alzate, et al., 2012), (Passos, et al., 2014). Nel loro studio Samson et Leduy riportano un incremento del COD solubile del 73% ma non misurano nessun incremento nella resa di produzione di metano (Samson & Leduy, 1983).

Il pretrattamento mediante *microonde* consiste nell'applicare onde elettromagnetiche con frequenza compresa tra i 300 MHz e i 300 GHz. La presenza di un campo elettromagnetico rapidamente oscillante provoca nei mezzi polari che ne sono attraversati il movimento delle molecole che produce calore per frizione (Passos, et al., 2014). L'energia applicata nel processo non è sufficiente a rompere i legami chimici, tuttavia è sufficiente per rompere i legami idrogeno, con particolare effetto sull'alterazione delle proteine presenti (Kaatze, 1995). Per via della sua incapacità di solubilizzare polimeri complessi questo pretrattamento non è accompagnato da ingenti rilasci di materiale solubile, ma, se applicato a cellule caratterizzate da pareti prevalentemente proteiche, comporta un notevole incremento nella resa di produzione di metano, tuttavia l'alta richiesta energetica e la difficoltà di scale-up rende questa tecnologia difficilmente applicabile su larga scala (Córdova, et al., 2018).

### Pretrattamenti termici

I pretrattamenti termici sono forse i più studiati e vengono utilizzati da tempo su altri substrati per solubilizzare biomasse recalcitranti mediante l'applicazione di temperature che variano tra i 50° e i 250°. Si è soliti suddividere ulteriormente questa categoria a seconda della temperatura applicata, sotto i 100° si parla di pretrattamenti a basse temperature, al contrario per temperature sopra i 100° si parla di pretrattamenti ad alte temperature (Passos, et al., 2014).

I pretrattamenti termici a basse temperature risultano particolarmente interessanti per la loro più bassa richiesta energetica e per la loro più facile integrazione all'interno di impianti che realizzano digestione anaerobica. In Tabella 2.7 sono riassunti i principali risultati in termini di solubilizzazione di materia organica e resa di metano presenti in letteratura:

Tabella 2.7: Dati di letteratura relativi ai pretrattamenti termici a basse temperature. (\*) =  $sCOD_p/sCOD_0*100$ . (\*\*)=  $[(VS_s/VS)_p-(VS_s/VS)_0]/(VS_s/VS)_0$ . (\*\*\*)=  $[sCOD_p-sCOD_0]/sCOD_0*100$ . (\*\*\*\*)=  $sCOD_p-sCOD_0/(COD_0-sCOD_0)*100$ . (\*\*\*\*\*)=  $COD_{lost}=(COD_p-COD_0)/COD_0*100$ .

Temperatura	Durata	Specie algale	Solubilizzazione	Produzione di CH <sub>4</sub>	Incremento % CH <sub>4</sub>	Riferimento bibliografico
°C	[min]			mICH <sub>4</sub> /gVS		
NT, 70°, 90°	180	<i>S. obliquus</i>	4, 4.4 (*)	116, 128, 257	+11%, +123%	(González-Fernández, et al., 2012)
NT, 70°, 80°	25	<i>S. species</i>	1.9, 2.3 (*)	122, 134, 193	+9.2%, +57.3%	(González-Fernández, et al., 2012a)
NT, 55°	300, 600, 900	<i>Chlamyd., Nitzschia, Chlor. et al</i>	330, 402, 400 (**)	107, 123, 124, 129	+15.9%, +16.5%, +19.2%	
NT, 75°	300, 600, 900	<i>Chlamyd., Nitzschia, Chlor. et al</i>	704, 1058, 1048 (**)	107, 126, 155, 160	+17.6%, +44.6%, +50.1%	(Passos, García, & Ferrer, 2013)
NT, 95°	300, 600, 900	<i>Chlamyd., Nitzschia, Chlor. et al</i>	983, 1184, 1188 (**)	107, 147, 170, 169	+37.5%, +58.9%, +57.9%	
NT, 30°, 60°, 90°	240	<i>N. oculata</i>	11.5, 3.7, 26.2 (***)	279, 283, 269, 391	+1.4%, -3.6%, +40.1%	(Marsolek, et al., 2014)
NT, 90°	60, 210, 720	<i>N. oculata</i>	20.6, 26.2, 39.2 (***)	321, 407, 434, 436	+26.8%, +35.2%, +35.8%	

NT, 50, 30	70% <i>Chl sp</i> , 30% <i>S. sp</i>	23.0, 266.4, 336, 351, + 4.5%, +14.3%, (Cho, et al., 2013)
80, 120		455.1 (***) 384, 405 +20.5%
NT, 80	<i>S. nativa</i> + <i>Coelastrum</i> diff media	13, 12, 11, 10, 11 280, 259, +11%, +17%, +24%, (Kinnunen & Rintala, 2016)
		(***) 292, 173, +12%, +17%
		213
NT, 55°, 72°	<i>Chlorella sp</i> + <i>Sc. sp</i>	6%, 5% (****) 260, 257, -1.2%, -11.5% (Solé-Bundó, et al., 2017)
		230
NT, 55°	<i>Clamyd sp</i> , <i>Sc. Sp et al</i>	0, 11, 9 (***) 272, 262, -4%, .8% (Alzate, et al., 2012)
		252
NT, 55°	<i>Acutodesmus sp et al</i>	0, 21, 19 (***) 198, 193, -3%, -13% (Alzate, et al., 2012)
		171
NT, 55°	<i>Microspora sp.</i>	0, 29, 29 255, 266, +4%, +5% (Alzate, et al., 2012)
		266

Le prove sperimentali condotte pretrattando la biomassa a Temperature inferiori a 100° mostrano una grande variabilità che dipende dai parametri del pretrattamento, dal successivo processo di digestione anaerobica e dal tipo di microalga utilizzata (Alzate, et al., 2012).

Sono stati infatti rilevati incrementi nella produzione di metano da praticamente trascurabili (Cho, et al., 2013), (Marsolek, et al., 2014) fino ad incrementi superiori al +120% (González-Fernández, et al., 2012). A causa delle perdite di COD, attribuite all'azione di batteri eterotrofi, sono stati misurati anche incrementi negativi (Solé-Bundó, et al., 2017), (Alzate, et al., 2012).

Come già evidenziato dai primi studi sui pretrattamenti termici (Chen & Oswald, 1998), per temperature inferiori a 100° la durata del pretrattamento è un parametro influente, anche se oltre le 4h gli effetti positivi diminuiscono progressivamente (Passos, et al., 2013), (Marsolek, et al., 2014).

Indubbiamente i pretrattamenti termici sono caratterizzati da un ingente rilascio di COD solubile (Passos, et al., 2015) e la maggior parte degli autori è concorde nell'affermare che la temperatura di pretrattamento è correlata alla solubilizzazione del campione, per quanto riguarda la correlazione tra la solubilizzazione e la resa di metano, questa appare meno evidente e talvolta non apprezzabile. Infatti gli effetti della temperatura sulla biodegradabilità dell'alga dipendono ancora una volta dalle caratteristiche specie-specifiche della parete cellulare, nonché dalle condizioni di crescita (Córdova, et al., 2018).

González-Fernández et al (González-Fernández, et al., 2012), (González-Fernández, et al., 2012a) pretrattando a diverse temperature alghe appartenenti al genere *Scenedesmus* hanno ottenuto un incremento nella resa di metano rispetto al campione non trattato che passa dal +11% al +123% a fronte di un incremento nella solubilizzazione del campione che cresce solamente di 0.4 volte; paragonando inoltre questi risultati con quelli ottenuti dallo stesso autore con alghe appartenenti allo stesso genere (Tabella 2.7) si può notare che, alla stessa temperatura di pretrattamento e a fronte di un incremento nella produzione di metano molto simile, la solubilizzazione dei due campioni risulta invece estremamente diversa (aumento del 190% contro un aumento del 440. Gli stessi autori propongono un'ipotesi interessante per spiegare il fenomeno, ossia che il parametro indicatore del buon esito del processo non sia tanto la solubilizzazione in sé quanto la provenienza del materiale solubilizzato.

I pretrattamenti termici ad alte temperature, chiamati anche pretrattamenti idrotermici, prevedono oltre all'azione delle temperatura, quella delle alte pressioni che si formano a causa dell'evaporazione dell'acqua, l'effetto combinato di questi due fattori comporta spesso un alto tasso di solubilizzazione della biomassa (Passos, et al., 2014). Rispetto ai pretrattamenti termici a

basse temperature hanno una richiesta energetica più elevata e una maggiore complessità impiantistica che li rendono difficili da integrare all'interno del processo di coltivazione e digestione anaerobica di microalghe. Le alte temperature inoltre possono innescare reazioni di tipo Maillard con conseguente formazione di prodotti organici non biodegradabili (Passos & Ferrer, 2015). La Tabella 2.8 seguente riassume i risultati di letteratura più significativi di digestione anaerobica di biomassa algale pretrattata idrotermicamente.

Tabella 2.8: Dati di letteratura relativi ai pretrattamenti termici ad alte temperature. (\*)= $sCOD_p - sCOD_0 / (COD_0 - sCOD_0) * 100$ . (\*\*)= $Carboidrati\_sol / Carboidrati\_tot$ . (\*\*\*)= $sCOD / COD_{tot}$ . (\*\*\*\*)= $(cell/ml)_p / (cell/ml)_0 * 100$ . (\*\*\*\*\*)= $[(VS_s / VS)_p - (VS_s / VS)_0] / (VS_s / VS)_0$ .

Temperatura °C	Durata minuti	Specie algale	Solubilizzazione	Produzione di CH <sub>4</sub> mlCH <sub>4</sub> /gVS alghe	Incremento % CH <sub>4</sub>	Riferimento bibliografico
NT, 110°, 140°, 170°	15	Clamyd sp. Sc. Sp et al	9, 16, 32 (*)	272, 323, 362, 398	+18.8%, +33.1%, +46.3%	(Alzate, Munoz, Rogalla, Fdz-Polanco, & Pèrez-Elvira, 2012)
NT, 110°, 140°, 170°	15	Acutodesmus sp et al	22, 37, 63 (*)	198, 219, 260, 307	+10.6%, +31.3%, +55.1%	
NT, 110°, 140°, 170°	15	Microspora sp.	38, 39, 40 (*)	255, 413, 382, 359	+62.0%, +49.8%, +40.8%	
NT, 140°, 160°, 180°	10	Chlorella sp.	N.D.	236, 331, 387, 342	+40.5%, +63.9%, +44.8%	(Mendez L. , Mahdy, Demuez, Ballesteros, & González-Fernández, 2013)
NT, 140°, 160°, 180°	20	Chlorella sp.	N.D.	236, 340, 391, 350	+44.4%, +65.5%, +48.2%	
NT, 120°	40	Chlorella vulgaris	39% (**)	226, 340	+50.1%	(Mendez, Mahdy, Demuez, Ballesteros, & González-Fernández, 2014)
NT, 120°	40	Scenedesmus	37% (**)	232, 281	+21.2%	
NT, 170°	30	Sc sp et al	0.1, 0.55 (***)	180, 330	+83.3%	(Keymer, Ruffel, Pratt, & Lant, 2013)
NT, 100°	120, 480	N. salina	-22%, -39% (****)	197, 500, 550	+153.8%, +179.2%	(Schwede, Rehman, Gerber, Theiss, & Span, 2013)
NT, 120°	120, 480	N. salina	-33%, -59%	197, 560, 570	+184.3%, +189.3%	
NT, 110°	15, 30	Oocystis sp.	8, 8.8 (****)	120, 150, 140	+25.0%, +16.7%	(Passos & Ferrer, 2015)
NT, 130°	15, 30	Oocystis sp.	15, 13.3 (****)	120, 170, 160	+41.7%, +33.3%	

I pretrattamenti con temperature superiori ai 100° hanno generalmente un incremento positivo nella resa di metano (Tabella 2.8); risulta tuttavia difficile ricercare una correlazione tra temperatura, durata, solubilizzazione e resa di metano poiché possono subentrare fenomeni di volatilizzazione e ossidazione della sostanza organica, che spiegano perché all'aumentare della durata del pretrattamento o della temperatura alcuni autori hanno rilevato un minore incremento nella resa di metano.

Alcuni autori hanno rilevato la formazione di composti organici non biodegradabili a causa dell'instaurarsi di processi di tipo Maillard, il che spiega come un aumento del COD solubile sia accompagnato in taluni casi da un decremento nella resa di metano (Alzate, et al., 2012); altri autori hanno invece rilevato la completa ossidazione di materia organica a causa del pretrattamento, il

che spiega per quale motivo a pretrattamenti troppo aggressivi siano associati decrementi sia nel COD solubile misurato a valle del pretrattamento sia decrementi nella resa di metano (Passos & Ferrer, 2015); la soglia massima di temperatura e durata applicabile è altamente specie-specifica come mostrano i risultati in tabella.

Tra tutti i pretrattamenti fisici citati, i pretrattamenti termici a basse temperature risultano i più promettenti per la loro applicabilità e il loro bilancio energetico che talvolta è risultato positivo (Passos & Ferrer, 2014). I pretrattamenti a basse temperature hanno il vantaggio di non formare sottoprodotti ed avere maggiori potenzialità su larga scala, poiché sono caratterizzati da una minore complessità impiantistica e per la possibilità di utilizzo come fonte di calore cascami già presenti all'interno dell'impianto (Passos, et al., 2014).

#### 2.3.5.2 CHIMICI

I pretrattamenti chimici si suddividono in acidi, alcalini e ossidativi. Nonostante producano una buona idrolisi della biomassa trattata, sono spesso accompagnati da una serie di fenomeni negativi, come l'instaurarsi di processi inibitori dovuti alla produzione di sostanze tossiche e il possibile rilascio di composti inquinanti nell'ambiente. Per questi motivi i pretrattamenti chimici sono spesso considerati processi altamente instabili e poco affidabili (Córdova, et al., 2018).

Il ruolo principale svolto dai reagenti acidi e basici è quello di solubilizzare la cellulosa e le emicellulose che costituiscono in percentuali variabili le biomasse vegetali e che le rendono difficilmente attaccabili dagli enzimi escreti dai batteri (Rodriguez, et al., 2015).

L'emicellulosa è formata da una catena di polimeri ramificata i cui rami sono costituiti da diversi zuccheri. Il suo grado di solubilità dipende dagli zuccheri che la costituiscono, ad esempio lo xylano presente nell'emicellulosa può essere estratto sia con reagenti acidi che basici, mentre zuccheri meno solubili come l'arabinosio e il galattosio possono essere estratti solo in ambiente fortemente alcalino tramite reazione di saponificazione (Hendriks & Zeeman, 2009). La cellulosa è caratterizzata da un più alto peso molecolare rispetto all'emicellulosa ed è costituita da una lunga catena non ramificata di molecole di glucosio; risulta estremamente resistente agli attacchi alcalini mentre risulta solubile in ambienti molto acidi (Lenihan, et al., 2010).

In letteratura non esistono molti esempi di pretrattamenti chimici applicati alla biomassa algale a monte di un processo di digestione anaerobica mentre sono più frequenti i pretrattamenti termochimici, in cui cioè viene combinata insieme l'azione della temperatura a quella dell'agente chimico.

Per quanto riguarda i pretrattamenti puramente chimici S. Cho et al (Cho, et al., 2013) non hanno rilevato un incremento nella resa di metano pretrattando un campione composto per il 30% da *Scenedesmus sp.* e per il 70% da *Chlorella sp.* a pH 9 e pH 11, mentre a seguito di pretrattamento a pH 13 viene misurato un decremento del 41% che gli autori attribuiscono alla formazione di composti inibenti; è interessante notare come quest'ultima condizione sia interessata dalla più alta solubilizzazione del campione, pari al 20% della biomassa totale. A. Mhady et al (Mhady, et al., 2014) hanno rilevato un incremento del 20% nella produzione di metano a seguito di pretrattamento alcalino con NaOH al 5% (w/w) su alghe del genere *Scenedesmus* ma non hanno rilevato nessun effetto positivo su alghe della specie *Chlorella vulgaris*, evidenza questa del fatto che le differenze nella costituzione della parete cellulare delle alghe determina l'efficacia dell'azione dell'agente chimico.

In generale, rispetto ai pretrattamenti termici o biologici, i pretrattamenti chimici sono interessati da un minor rilascio di COD in soluzione e spesso non comportano nessun incremento (Mhady, et al., 2014) o addirittura comportano un decremento nella resa finale di metano (Bohutskyi, et al., 2014). Tali decrementi sono quasi sempre attribuiti dagli autori alla formazione di composti inibenti probabilmente formati a seguito degli importanti rilasci di materiale solubile in soluzione, specialmente di carboidrati (Bohutskyi, et al., 2014), (Cho, et al., 2013), (Mendez, et al., 2013).

Sfortunatamente si sa ancora molto poco riguardo le modalità e le caratteristiche dei composti inibenti che si formano a seguito di questi importanti rilasci di carboidrati, che invece indicano la solubilizzazione della cellulosa e dell'emicellulosa che costituiscono la parete cellulare e di per sé è dunque un fenomeno che dovrebbe agire positivamente sulla biodegradabilità finale. A dimostrazione che i reagenti chimici hanno una buona capacità di solubilizzare la parete cellulare e di rendere disponibile il contenuto interno della cellula, è il fatto che questo genere di pretrattamento viene usato con successo nel processo di produzione di bioetanolo che prevede l'estrazione degli zuccheri presenti nella cellula (Zhou, et al., 2011), (Shokrkar, et al., 2017), (Harun, et al., 2011).

#### 2.3.5.3 *BIOLOGICI*

I pretrattamenti biologici prevedono l'aggiunta di enzimi alla biomassa al fine di favorirne la solubilizzazione. Il pretrattamento enzimatico è considerato un processo a basso impatto ambientale, per via della bassa richiesta energetica e l'alto tasso di idrolisi conseguito in condizioni operative che non prevedono temperature né pressioni elevate e non permettono lo sviluppo di agenti corrosivi né la formazione di sottoprodotti inibenti o tossici. Sotto questo punto di vista i pretrattamenti biologici presentano dunque i vantaggi sia dei pretrattamenti fisici che di quelli chimici, mancando al contempo delle controindicazioni di questi due (Córdova, et al., 2018).

Nella scelta dell'enzima o del mix enzimatico da utilizzare bisogna considerare i seguenti aspetti: i) le caratteristiche e i composti che costituiscono la parete cellulare dell'alga, ii) le condizioni ottimali sotto le quali l'enzima ha un'attività maggiore tra le quali pH, temperatura, rapporto enzima/substrato, iii) i costi associati al processo. Se le condizioni i) e ii) non sono gestite al meglio si rischia la denaturalizzazione dell'enzima con conseguente inibizione della sua attività, inoltre concentrazioni di biomassa troppo elevate possono aumentare la viscosità della soluzione a seguito dei grandi rilasci di materiale organico che caratterizza questo genere di pretrattamento, condizione questa che può inibire l'attività enzimatica dei batteri (Córdova, et al., 2018). Un altro parametro che determina il buon esito del trattamento è il tempo di contatto tra enzima e substrato (Passos, et al., 2014).

Il pretrattamento enzimatico della biomassa algale è stato poco studiato per via degli alti costi operativi dati dai lunghi tempi di contatto, dal costo degli enzimi, dall'altissima specificità degli enzimi e dalle marcate differenze che invece sussistono nella composizione della parete di specie algali diverse, fattore quest'ultimo che richiede una profonda conoscenza della composizione della biomassa trattata e delle caratteristiche della parete cellulare (Passos, et al., 2014). Tuttavia le ricerche in questo campo negli ultimi anni sono riprese con rinnovato interesse, per via di una maggiore conoscenza delle pareti cellulari delle alghe che permette una scelta oculata del mix enzimatico da utilizzare e per via di una più alta attenzione nei confronti di processi a basso impatto ambientale.

La Tabella 2.9 riassume i risultati sperimentali presenti in letteratura che riguardano processi di digestione anaerobica di microalghe pretrattata tramite processi biologici.

Tabella 2.9: principali risultati in termini di incremento di produzione di metano a seguito di pretrattamento enzimatico. (\*):mgVSs/L. (\*\*): sCOD/CODtot\*100. (\*\*\*): (sCODp-sCOD0)/(CODtot-sCOD0).# risultati in termini di biogas.

Enzima utilizzato	durata ore	specie algale	Solubilizzazioni	produzione CH4 mLCH4/gVS	incremento % CH4 %	riferimento bibliografico
NT, cellulase, cellulase+glucohydrolase	6	Diatoms & Oocystis Sp.	+110%, +120%(*)	188, 203, 217	+8%, +15%	(Passos, et al., 2015)
NT, Cellulase +Pectinase	12	C. reinhardtii	ND, ND	245, 414	+69%	(Wieczorek, et al., 2014)
NT, cellulase, cellulase (estratti da batteri marini differenti)	48	N. gaditana	ND, ND, ND	109, 283, 263	+159.6%, +141.1%	(Muñoz, et al., 2014)
NT, carboidrase, protease	3	C. vulgaris	2, 28.4, 54.7 (**)	39, 98, 207	+149%, +424%	(Mahdy & Ballesteros, 2016)
NT, protease	3	C. vulgaris	2.5, 45 (**)	74, 193	+161%	(Mahdy, et al., 2015a)
NT, controllo Temperatura, protease	3	C. vulgaris	2.5, 24.8, 51.4 (**)	241, 296, 337	+22%, +40%	(Mahdy, et al., 2015a)
NT, cellulase, protease, cellulase+protease	24	S. obliquus	1020, 1340, >1340 (***)	159 <sup>#</sup> , 897 <sup>#</sup> , 617 <sup>#</sup> , 1051 <sup>#</sup>	+273%, +403%, +485%	
NT, cellulase, protease, cellulase+protease	24	C. sorokiniana	173, 309, >309 (***)	170 <sup>#</sup> , 533 <sup>#</sup> , 486 <sup>#</sup> , 775 <sup>#</sup>	+214%, +187%, +358%	Ometto F. et al 2014
NT, cellulase, protease, cellulase+protease	24	Arthospira Maxima	6, 44, >44 (***)	185 <sup>#</sup> , 1461 <sup>#</sup> , 1545 <sup>#</sup> , 1996 <sup>#</sup>	+630, +672, +898	

I risultati riportati in Tabella 2.9 evidenziano l'importanza della scelta dell'enzima in relazione al tipo di alga che deve essere pretrattata; utilizzando ad esempio un enzima specifico per le proteine nel pretrattamento di alghe appartenenti al genere *Scenedesmus* si hanno incrementi nella produzione di metano finale significativamente più alti rispetto alle *Scenedesmus* pretrattate con enzimi specifici per l'idrolisi di carboidrati (Ometto, et al., 2014). In generale si può affermare che i pretrattamenti eseguiti con un mix di enzimi risultano più efficaci, in quanto la parete cellulare è sempre formata da una serie di polimeri di natura differente (Abo-Shady, et al., 1993).

In generale i pretrattamenti enzimatici producono un forte rilascio di materiale organico in soluzione che spesso risulta correlato ad un incremento nella resa finale di metano, per la maggior parte degli esempi riportati in Tabella 2.9 sussiste una correlazione tra idrolisi e incremento nella resa metanigena all'interno dello stesso caso di studio, ma anche in questo caso non è possibile stimare l'incremento nella resa di metano a partire dal rilascio di materiale organico; a titolo esemplificativo possono essere citati i lavori di Mahdy et al (Mahdy, et al., 2015a), (Mahdy, et al., 2014) in cui *C. vulgaris*, trattata con lo stesso tipo di enzima e con rilasci di COD confrontabili ha prodotto incrementi estremamente diversi (+40% e +161%). È doveroso notare che le differenze negli incrementi sono legate anche alla sostanziale differenza nella produzione di metano (241 mL CH<sub>4</sub>/gVS in un caso contro i 39 mL/gVS nell'altro); questi risultati evidenziano ancora una volta quanto non solo la specie algale, ma anche le condizioni di crescita e le condizioni di misura del BMP siano fattori estremamente significativi.

È interessante notare come l'enzima protease produca un'idrolisi della biomassa generalmente maggiore rispetto ad enzimi specifici per i carboidrati, anche quando vengono pretrattate specie algali caratterizzate da un'alta percentuale di carboidrati nella parete come le alghe del genere *Chlorella* (Tab. 1.1); Mahdy et al (Mahdy & Ballesteros, 2016) nel loro studio condotto su *Chlorella vulgaris* hanno attribuito la causa di questo maggiore rilascio ad un'idrolisi non solo dei componenti della parete ma anche del contenuto cellulare presente all'interno, ricco di proteine e povero invece di carboidrati, si noti tuttavia che non sempre il maggior rilascio dato dall'enzima protease si accompagna ad una maggiore resa, soprattutto nel caso di alghe con parete prevalentemente composta da polisaccaridi come le *Chlorella*; è probabile quindi che i batteri anaerobi, una volta che hanno accesso al materiale intracellulare, siano in grado di provocare l'idrolisi del contenuto interno della cellula anche se questo non viene solubilizzato mediante un trattamento specifico.

A differenza dei pretrattamenti fisici e chimici, il rilascio di materiale solubile a seguito di pretrattamento biologico non è mai un composto tossico, inquinante o che è diventato più recalcitrante del composto di partenza; tuttavia bisogna sottolineare il rischio che si accumulino prodotti che risultano inibenti per il processo di digestione, come l'ammoniaca, il sodio (Ometto, et al., 2014) o un'alta concentrazione di VFA (Mahdy & Ballesteros, 2016).

#### 2.3.6 MISURE PER LA VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DEI PRETRATTAMENTI

Un pretrattamento viene considerato efficace nell'ambito dei processi di digestione anaerobica qualora incrementi la resa di produzione di metano. Lo stesso viene poi considerato economicamente conveniente se ha un bilancio energetico positivo, ossia se l'energia spesa per eseguire il pretrattamento risulta minore di quella guadagnata dall'incremento nella resa di metano, in tal caso si ha dunque un guadagno netto di energia (Passos & Ferrer, 2014). Se questo avviene devono poi essere considerati ulteriori fattori affinché un pretrattamento possa essere considerato applicabile su scala reale, gli impatti ambientali che ne derivano e i costi di installazione e gestione della tecnologia (Montingelli, et al., 2015).

La prima sfida per poter applicare con successo un pretrattamento della biomassa algale è dunque individuarne uno che porti ad incrementi positivi nella resa metanigena; nel capitolo precedente è stata evidenziata la grande variabilità nei risultati finali delle prove di BMP, attribuibile alle condizioni di pretrattamento e di prova di digestione in batch, alla specificità delle specie algali trattate, alle condizioni di crescita della biomassa e alla fase di sviluppo in cui l'alga si trova. Nello scenario appena descritto non si può quindi prescindere dalla necessità di trovare una misura che sia effettivamente indicativa del buon esito del pretrattamento, qualunque sia la biomassa utilizzata e le condizioni di prova della successiva digestione; per fare ciò deve essere individuato il fattore che determina, a prescindere dal tipo di stress indotto dal pretrattamento applicato, l'aumento di biodegradabilità dell'alga.

Di seguito si riportano le misure che più comunemente vengono utilizzate per descrivere e valutare l'efficacia di un pretrattamento sia per quanto riguarda i pretrattamenti eseguiti a monte di processi di digestione anaerobica sia per quelli eseguiti a monte di altri processi, come estrazione di lipidi o di pigmenti in campo nutraceutico e farmaceutico (Spiden, et al., 2013). L'intento è quello di descrivere gli indicatori ad oggi in uso che consentano di valutare l'efficacia dei pretrattamenti.

### 2.3.6.1 MISURE DI LISI DELLA PARETE

Indubbiamente la misura più utilizzata per valutare l'esito di un pretrattamento a monte della digestione anaerobica è il rilascio di materiale organico in fase solubile. Essendo l'idrolisi lo step limitante l'intero processo è infatti plausibile aspettarsi che il materiale organico, una volta solubilizzato, sia reso biodisponibile per i batteri anaerobici (Angelidaki & Sanders, 2004). Tuttavia, come dimostrano i risultati sperimentali esposti nel capitolo precedente, la solubilizzazione da sola non implica la biodisponibilità della materia organica, inoltre i pretrattamenti agiscono in modo diverso sulle cellule e le stesse cellule hanno risposte differenti, a seconda della composizione della loro parete cellulare. A tal proposito risulta di particolare interesse il lavoro di Passos et al (Passos, et al., 2014) che hanno prodotto il seguente grafico, a partire dai risultati sperimentali disponibili in bibliografia relativi a biomasse algali miste digerite anaerobicamente (Figura 2.15):

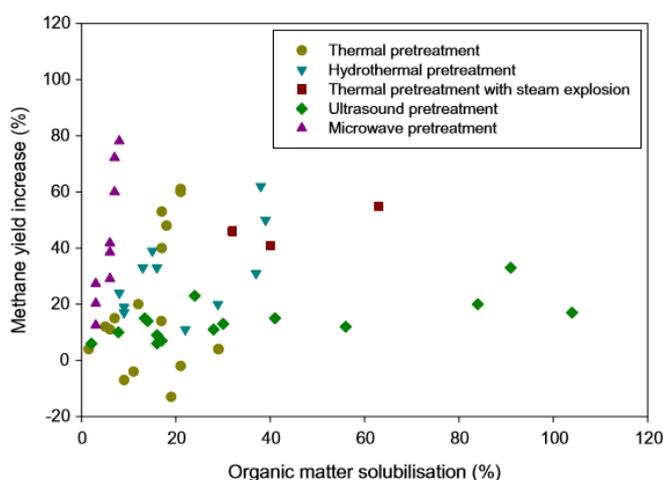


Figura 2.15: relazione tra solubilizzazione percentuale e incremento nella produzione di metano di biomassa algale pretrattata con diversi pretrattamenti (Passos, Uggetti, Carrère, & Ivet, 2014).

La Figura 2.15 mostra gli incrementi di metano ottenuti in funzione della solubilizzazione di materia organica misurata a seguito di diversi pretrattamenti.

Sono evidenti le diverse modalità in cui ogni pretrattamento agisce nei confronti della biomassa: le microonde producono un'idrolisi pressoché trascurabile ma sono causa di importanti incrementi di metano, al contrario gli ultrasuoni producono un forte rilascio di materiale solubile che però non è accompagnato da incrementi notevoli nella resa metanigena, infine i pretrattamenti termici sono quelli che mostrano la più grande variabilità sia in termini di rilascio conseguito che in termini di produzione metanigena che in diversi casi risulta addirittura inferiore al campione non trattato (Alzate, et al., 2012). Gli stessi autori sostengono di aver voluto considerare esclusivamente le sperimentazioni eseguite su biomassa algale mista in quanto lo stesso grafico potrebbe cambiare radicalmente al variare della specie algale considerata. Il rilascio di materiale organico può essere quantificato in diversi modi, ad esempio mediante la misura del COD in fase solubile oppure per differenza tramite la misura dei solidi volatili prima e dopo il pretrattamento.

Alla quantificazione dell'idrolisi di materiale organico si accompagna spesso la misura dell'azoto presente in soluzione, sia come azoto totale sia come azoto presente in forma ammoniacale. La presenza di azoto in soluzione infatti indica la avvenuta solubilizzazione delle proteine, e la

formazione di ammonio indica che il processo di depolimerizzazione dei composti organici contenenti azoto (tipicamente proteine e acidi nucleici) è giunto al termine (Rajagopal, et al., 2013).

Tra le ipotesi che vengono fatte per spiegare quei casi in cui è evidente la mancanza di correlazione tra rilascio di materiale organico e incremento della biodegradabilità del campione ci sono:

- ❖ Denaturazione e recalcitranza dei composti solubili misurati (Alzate, et al., 2012), (Cho, et al., 2013), (Passos & Ferrer, 2014).
- ❖ Provenienza e origine del materiale rilasciato (González-Fernández, et al., 2012), (Ometto, et al., 2014)

La prima ipotesi viene avanzata solitamente quando i pretrattamenti applicati inducono condizioni tali da instaurare delle reazioni tali da denaturare i composti iniziali, come nel caso di elevate temperature e/o pressioni (Pinnekamp, 1983) e pH estremi (Cho, et al., 2013).

Le considerazioni che riguardano l'origine del materiale rilasciato invece sono valide per qualsiasi tipo di pretrattamento. González-Fernández et al (González-Fernández, et al., 2012) per spiegare un incremento nella produzione di metano che sale da +11% a +123% a fronte di un tasso di idrolisi confrontabile pretrattando la biomassa rispettivamente a 70° e 90°, osservano i due campioni con microscopio a fluorescenza dopo aver iniettato del SYTOX Green Dye<sup>®</sup>, tracciante che si lega con gli acidi nucleici delle cellule e con luce fluorescente fa apparire il materiale organico di colore verde. Da questa osservazione notano che i campioni caratterizzati da un maggior incremento della biodegradabilità presentano degli aggregati di materiale intracellulare fuoriuscito e successivamente riflocculato, chiaro indice del fatto che l'aumento della solubilizzazione in questo caso sia attribuibile a rilascio di materiale intracellulare, al contrario di quanto osservato nei campioni con resa inferiore in cui le cellule appaiono integre e non vengono individuati agglomerati di materiale nucleico in soluzione.

D'altro canto alcuni autori che ritengono ugualmente che la provenienza del materiale rilasciato sia un parametro fondamentale per spiegare l'esito del processo di pretrattamento, ipotizzano al contrario che alti incrementi nella biodegradabilità siano associati al grado di solubilizzazione della parete cellulare, e quindi all'idrolisi di molecole eso-cellulari piuttosto che alla fuoriuscita di materiale intracellulare (Ometto, et al., 2014), (Passos, et al., 2015). Secondo questa teoria è possibile che parte del materiale intracellulare fuoriesca anche da pareti parzialmente danneggiate e che questo contenuto intracellulare venga sì digerito dai batteri ma che questo verrebbe digerito ugualmente in caso di idrolisi della parete; risulterebbe quindi più importante danneggiare anche solo parzialmente la parete cellulare delle alghe in modo che gli enzimi secreti dai batteri siano successivamente in grado di idrolizzare la parete esterna e digerire tutto il contenuto interno, piuttosto che provocare tramite pretrattamento la fuoriuscita di parte del materiale intracellulare. Ometto et al (Ometto, et al., 2014) nel loro studio osservando le alghe con microscopio TEM, notano che il pretrattamento enzimatico, risultato più efficace è quello che ha prodotto meno modifiche apprezzabili nella struttura della cellula. Passos et al (Passos, et al., 2015) invece ottengono ottime correlazioni tra carboidrati di parete solubilizzati e biodegradabilità dei campioni.

La medesima tecnica di osservazione al microscopio a fluorescenza viene utilizzata da diversi autori nell'ambito della valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti biologici, in questo caso non viene valutata la presenza di materiale cellulare esterno alla cellula ma il grado di lisi della parete: se il tracciante riesce a penetrare all'interno della cellula la parete è considerata lisata ed il

pretrattamento riuscito (Prajapati, et al., 2015) (Gerken, et al., 2012). Le considerazioni fatte dagli autori appena citati mancano però di un riscontro in termini di BMP, per cui non è possibile dire se questa misura risulti un adeguato predittore di degradabilità anaerobica. Bisogna aggiungere che la mortalità delle cellule raggiunge spesso valori prossimi al 100%, come avviene nei pretrattamenti fisici, quindi la vitalità non può essere considerata una misura affidabile per la valutazione dell'aumento di degradabilità (González-Fernández, et al., 2012a).

La Tabella 2.10 riassume le principali misure eseguite nell'ambito della valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti anaerobici:

Tabella 2.10: Principali misure eseguite nell'ambito della valutazione dei pretrattamenti per la digestione anaerobica. Pedice 0: valore prima del pretrattamento. Pedice p: valore post pretrattamento.

Indicatore	Misura eseguita	Riferimento
Rilascio di materiale organico in fase solubile	$sCOD_p/sCOD_0*100$	(González-Fernández, et al., 2012)
	$[(VS_s/VS)_p-(VS_s/VS)_0]/(VS_s/VS)_0$	(Passos, et al., 2013)
	$[sCOD_p-sCOD_0]/sCOD_0*100$	(Cho, et al., 2013)
	$sCOD_p-sCOD_0/(COD_0-sCOD_0)*100$	(Kinnunen & Rintala, 2016)
Rilascio di proteine	TNsol	(Alzate, et al., 2012)
Stato di ossidazione delle proteine	$NH_4/TN$	(Alzate, et al., 2012)
Rilascio di materiale esacellulare	Microscopio a fluorescenza e Sytox Green Dye	(González-Fernández, et al., 2012)
Stato di integrità della parete	Microscopio TEM	(Ometto, et al., 2014)
	Misura dei carboidrati in soluzione	(Passos, et al. 2015)
Vitalità	Microscopio a fluorescenza e Sytox Green Dye	(Prajapati, et al., 2015)

### 2.3.6.2 MISURE DI DISTRUZIONE DELLA CELLULA PER L'ESTRAZIONE DI METABOLITI

Nell'ambito dei pretrattamenti per la valorizzazione della biomassa algale è di uso piuttosto comune la valutazione del grado di rottura della parete cellulare, soprattutto quando questi sono finalizzati all'estrazione di lipidi o di pigmenti per uso nutraceutico e farmaceutico (Spiden E., et al., 2014). Per questi scopi vengono eseguiti pretrattamenti molto efficaci, atti a distruggere completamente la parete cellulare per agevolare il successivo processo di estrazione.

Tra i pretrattamenti più utilizzati per questo scopo ci sono: l'omogeneizzazione ad alta pressione, l'ultrasonificazione ad alta potenza, la nanomacinazione tramite mulino a sfere, l'utilizzo di microonde e l'irradiazione tramite raggi laser (Safi, et al., 2015), (Jonathan R. McMillan, 2013), (Sam Q.K. Law, 2018).

L'efficacia del trattamento è determinata dal grado di rottura che si vuole conseguire, il quale dipende a sua volta dall'uso che si vuole fare della biomassa trattata.

Gli indicatori scelti per quantificare il danneggiamento parziale o la distruzione totale della cellula devono essere adeguati alla finalità del trattamento, in quanto questi possono essere indicatori del solo danneggiamento della parete, ed in questo caso vengono chiamati indicatori indiretti, oppure possono indicare la rottura totale della cellula ed in questo caso vengono chiamati indicatori diretti del grado di distruzione della cellula (Spiden, et al., 2013).

In Figura 2.16 **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** A è mostrato uno schema esemplificativo del grado di danneggiamento conseguibile tramite pretrattamenti e in Figura

2.16 Errore. L'origine riferimento non è stata trovata. B l'informazione restituita dagli indicatori diretti ed indiretti.

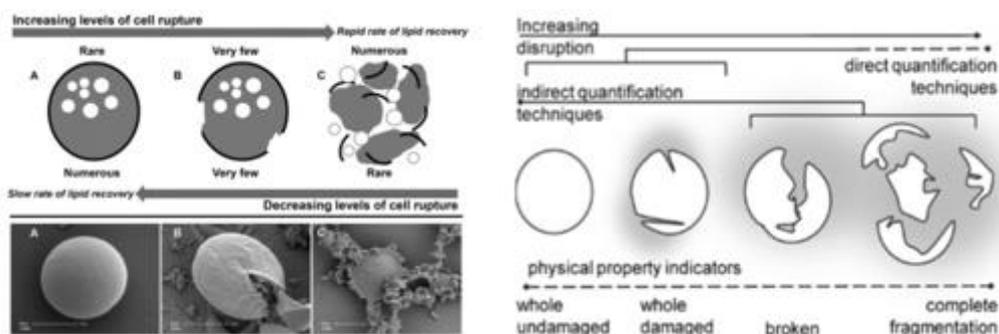


Figura 2.16: A : Gradi di rottura della parete cellulare. Immagine da (Yap, Crawford, Dumsday, Scales, & Martin, 2014). B: metodi diretti ed indiretti di quantificazione della distruzione cellulare. Immagine da (Spiden E. , Scales, Kentish, & Martin, 2013)

Nella Tabella 2.11 sono riportati i più comuni metodi per la valutazione della distruzione della cellula

Tabella 2.11: metodi di quantificazione della distruzione di una cellula algale.

<b>analisi eseguita</b>	<b>modalità di esecuzione</b>	<b>riferimento bibliografico</b>
conta cellulare	microscopio ottico o citofluorimetro	(Spiden, et al., 2013), (Spiden, et al., 2014)
torbidità	assorbanza 750 nm	(Spiden, et al., 2013)
rilascio di metaboliti	assorbanza surnatante 260 nm	(Spiden, et al., 2013)
rilascio di proteine	TKN sul surnatante	(Spiden, et al., 2013)
rilascio di pigmenti	assorbanze sul surnatante a 650, 665 e 480 nm	(Safi, et al., 2015)
diffusione di macromolecole	legge di diffusione di Fick applicata alle proteine rilasciate	(Safi, et al., 2015) (Gerde, et al., 2012)
dimensione solidi	strumento di diffrazione a laser	(Wang & Yuan, 2015)
autofluorescenza della clorofilla	assorbanza 680 nm	(Wang, et al., 2014)
fluorescenza dei lipidi	aggiunta di un tracciante e analisi con il citofluorimetro	(Wang & Yuan, 2015)
viscosità	viscosimetro capillare	(Wang, et al., 2014)
potenziale elettrico	conduttivimetro	(Seiichi Morita, 1999)
perdita di massa	misura dei VSS	(Spiden E. , et al., 2014)

La conta, eseguita tramite osservazione al microscopio ottico con appositi dispositivi quali la camera di Burker o di Neubauer risulta essere il metodo più spesso utilizzato e più robusto rispetto alle variazioni che possono avvenire all'interno del campione a seguito del pretrattamento e che possono influenzare le misure eseguite (Spiden E. , et al., 2014), (Yap, et al., 2014).

Con la conta cellulare eseguita attraverso il citofluorimetro non è invece valutabile a priori se l'efficacia di un pretrattamento porti ad un aumento o ad una diminuzione della concentrazione di quelle che sono state identificate come cellule nel campione non pretrattato; l'effetto prevalente del pretrattamento infatti può essere quello di separare agglomerati di alghe presenti nel campione

non trattato, portando così ad un aumento nel numero di alghe contate, oppure può prevalere l'effetto di rottura della cellula con produzione di frammenti di dimensioni inferiori al limite dimensionale fissato nella fase di calibrazione dello strumento, portando in tal caso ad una riduzione del numero di cellule contate (Wang, et al., 2014).

Anche la valutazione dell'efficacia di un pretrattamento attraverso la misura della dimensione dei solidi presenti nel campione soffre dello stesso problema di indeterminatezza, in quanto può essere prevalente l'effetto di riduzione delle dimensioni dei solidi dato dalla distruzione delle cellule oppure le dimensioni possono aumentare per effetto dei fenomeni di aggregazione che coinvolge le cellule rimaste integre con il materiale intracellulare rilasciato dalle alghe distrutte (Spiden, et al., 2013).

C'è inoltre la possibilità che la cellula, seppur rotta, mantenga la sua forma e dimensione originaria (Nalin Samarasinghe, 2012) (Spiden E. , et al., 2015) e che il cono d'ombra delle cellule rimaste integre oscuri i residui cellulari prodotti dal trattamento (Nalin Samarasinghe, 2012), in entrambi i casi il dato dimensionale non è in grado di rilevare l'effettiva distruzione della parete.

Tutte le altre misure riportate in Tabella 2.11 sono tentativi di quantificare indirettamente la distruzione della parete cellulare e sono correlate con la conta al microscopio più o meno strettamente a seconda dell'entità della distruzione della parete e della specie algale considerata (Spiden, et al., 2013).

Spiden ha sottoposto a un processo di omogeneizzazione ad alta pressione tre campioni di alghe, rispettivamente costituiti da *Nannochloropsis sp.*, *Chlorella sp.* e *Tetraselmis suecica* (Spiden, et al., 2013), dal suo studio è emersa una buona corrispondenza tra le misure di torbidità, rilascio di metaboliti, proteine in soluzione con le rispettive conte cellulari, eccezion fatta per la misura di torbidità che nel caso di riaggregazione di materiale intracellulare può sottostimare l'entità di distruzione della parete. Il rilascio di metaboliti, misurato tramite l'assorbanza UV a 260 nm, e il rilascio di proteine, misurato attraverso il TKN solubile, sono misure che possono essere influenzate da una successiva degradazione del materiale rilasciato e che, per trattamenti moderatamente efficaci, portano ad una sovrastima del grado di rottura delle cellule, in quanto il materiale intracellulare inizia a fuoriuscire anche in seguito ad un danneggiamento solo parziale della parete.

Tra le misure riportate in Tabella 2.11 vi sono anche le misure di assorbanza nel visibile e di autofluorescenza che sono atte a valutare la presenza di pigmenti rilasciati in fase solubile (Gerde, et al., 2012) o sul campione tal quale (Spiden, et al., 2013), (Wang, et al., 2014)

Queste misure si basano sulla presenza all'interno delle alghe dei pigmenti, necessari per l'attività fotosintetica dell'alga, quali clorofilla A, clorofilla B e carotenoidi.

Selezionando una particolare lunghezza d'onda attraverso un monocromatore è possibile invece svolgere analisi quantitative per risalire alla presenza di un singolo pigmento, partendo dal valore dell'assorbanza del campione ad una lunghezza d'onda tale a cui quel composto presenta un picco di assorbimento (Nelson & Cox, 2014).

Per quanto riguarda le misure di attività dei pigmenti eseguite per valutare l'efficacia di trattamenti sulle alghe, Wang riporta (Wang, et al., 2014) a seguito di sonicazione ad alta e bassa frequenza, un aumento della densità di fluorescenza della clorofilla A. L'incremento dell'autofluorescenza del campione è usato solitamente per monitorare la crescita e la vitalità della biomassa, Wang rileva invece un aumento nell'intensità di fluorescenza a seguito di un pretrattamento.

È interessante notare come questo aumento non sia per forza correlato alla variazione della concentrazione cellulare nel campione, a dimostrazione del fatto che avvengono modifiche all'interno della cellula anche prima che questa si rompa. Il danneggiamento della parete cellulare dunque, sebbene la cellula sia ancora integra, può provocare un aumento dell'assorbanza dei pigmenti attraverso la parete (Gieskes & Elbrächter, 1986) e, stando a quanto riportato dallo studio sopra citato, della loro capacità emissiva. Nello stesso studio, un aumento nell'autofluorescenza viene rilevato anche in concomitanza alla distruzione di parte delle cellule presenti.

Si può quindi desumere che la cellula algale emette una fluorescenza maggiore rispetto a quando è integra sia quando è distrutta in frammenti più piccoli contenenti clorofilla, sia quando la sua parete risulta solamente danneggiata.

Bisogna tuttavia sottolineare come l'interpretazione di questa misura non sia univoca, essendo un suo aumento associato talvolta ad un danneggiamento della parete (e quindi una riduzione delle sue capacità schermanti) (Gieskes & Elbrächter, 1986), talvolta al rilascio di detriti più piccoli contenenti pigmenti (Wang, et al., 2014) e talvolta ad una maggiore crescita algale e attività fotosintetica (Bai, Huang, Su, Tian, & Zheng, 2011).

Rilevare presenza di pigmenti sul campione filtrato invece è sempre indice di danneggiamento della parete perché implica la fuoriuscita di materiale intracellulare dalla cellula (Gerde, et al., 2012) (Safi, et al., 2015).

Così come la misura dell'assorbanza UV, che indica presenza di proteine e materiale genetico (Spiden, et al., 2013), anche la misura dei pigmenti è una quantificazione indiretta dell'avvenuta distruzione della cellula, che può portare ad una sovrastima dell'entità della rottura della parete quando questa è moderata, poiché già ad un parziale danneggiamento della parete può corrispondere una fuoriuscita di materiale intracellulare. Misurando l'assorbanza relativa alla clorofilla A, clorofilla B e carotenoidi presenti nel surnatante del campione pretrattato è possibile quantificare la massa totale di clorofilla e carotenoidi rilasciato durante il pretrattamento, espressa in µg pigmenti/mL sospensione (Gerde, et al., 2012), (Lichtenthaler, 1987)(Eq. 2.7-2.10):

$$Chl A = 13.36 * A_{664nm} - 5.19 * A_{649nm} \quad 2.7$$

$$Chl B = 27.43 * A_{649nm} - 8.12 * A_{664nm} \quad 2.8$$

$$Tot Chl = Chl A + Chl B \quad 2.9$$

$$Carotenoidi = \frac{1000 * A_{470nm} - 2.13 * Chl a - 97.64 * Chl b}{209} \quad 2.10$$

Un altro approccio per la quantificazione della distruzione della parete cellulare è basato sulla misura di proprietà fisiche della sospensione che vengono modificate dal rilascio di componenti intracellulari e di frammenti; è questo il caso di indicatori quali il potenziale elettrico della soluzione, che si modifica poiché i componenti rilasciati hanno una carica elettrica diversa da quella di una cellula integra (Seiichi Morita, 1999), la misura della viscosità, che aumenta con il rilascio di metaboliti ma che può ulteriormente subire modifiche quando la distruzione è già avvenuta a causa delle mutue interazioni tra i componenti rilasciati (Spiden, et al., 2013) e la sedimentabilità della sospensione, che è descritta dalla legge di Stokes modificata e che dipende dalla densità e dalla dimensione delle particelle presenti (Wong, 1997).

È necessario evidenziare il fatto che gli indicatori sopracitati sono tutti finalizzati a descrivere la totale distruzione della parete a seguito di trattamenti molto aggressivi e difficilmente applicabili

per processi di digestione anaerobica, per motivi di scale-up e per il più basso valore di mercato dei prodotti finali ottenibili.

In quest'ottica risulta interessante l'uso di misure indirette poiché risultano efficaci già nel rilevare un danneggiamento parziale della parete. D'altro canto le misure di quantificazione diretta di rottura della parete come la conta cellulare e la perdita di massa non risultano misure applicabili nell'ambito della digestione anaerobica, poiché con i pretrattamenti che si adottano in questo caso difficilmente si consegue una distruzione totale della cellula di entità apprezzabile affinché l'incertezza legata a questo genere di misure risulti minore delle variazioni ottenute a seguito dei pretrattamenti.

Un altro elemento di grande differenza rispetto ai pretrattamenti finalizzati all'aumento della produzione metanigena risiede nel fatto che negli esempi sopra riportati l'efficacia di un trattamento è valutata esclusivamente in funzione del grado di rottura della parete cellulare, mentre l'efficacia dei pretrattamenti per la digestione anaerobica deve essere valutata in funzione della successiva resa metanigena conseguita, la quale a sua volta introduce molti altri elementi di variabilità e che può anche non essere correlata al grado di distruzione della parete cellulare.

## 3 MATERIALI E METODI

### 3.1 ORIGINE DEI MATERIALI

La sperimentazione è stata svolta in parte presso il laboratorio “A. Rozzi” del Politecnico di Milano, Polo di Cremona (Cr) e in parte presso il laboratorio del Dipartimento di Scienze dell’Ambiente e della Terra, Università degli Studi di Milano-Bicocca (Mi).

#### 3.1.1 BIOMASSA ALGALE

Nel corso della sperimentazione è stata utilizzata biomassa algale di varia origine e natura, come indicato nella Tabella 3.1

Tabella 3.1: Provenienza e specie della biomassa algale utilizzata nel corso della sperimentazione.

<i>campione</i>	<i>origine della biomassa</i>	<i>specie algale</i>
PM	Impianto di depurazione Bresso-Niguarda (Mi)	Popolazione mista Prevalenza di alghe appartenenti ai generi <i>Chlorella</i> e <i>Scenedesmus</i>
CHL	Istituto Sperimentale italiano L. Spallanzani	<i>Chlorella sorokiniana</i>
SC	Istituto Sperimentale italiano L. Spallanzani	<i>Scenedesmus obliquus</i>
EU	Laboratorio A. Rozzi	<i>Euglena gracilis</i>
EU_Inoculo	Istituto Sperimentale italiano L. Spallanzani	<i>Euglena gracilis</i>

Il campione PM proviene da un reattore raceway aperto (Figura 3.1) ospitato presso il depuratore di Bresso-Niguarda e alimentato con separato liquido dei fanghi in uscita dal digestore anaerobico. Il raceway opera in continuo, ha una superficie complessiva di 6 m<sup>2</sup> e un battente idrico di 20 cm. La miscelazione è garantita da un mulino a pale che ruota ad una velocità di 4 rpm. Il reattore è idraulicamente connesso ad una colonna nella quale viene insufflata aria tramite compressore.



Figura 3.1: Raceway presente all’interno del depuratore di Bresso-Niguarda (MI)

La raccolta è stata effettuata nei giorni 30-31/10, 6-7/11 e 27/11. Durante il periodo di raccolta l’HRT del reattore è risultato pari a 20 d, inoltre, rispetto alla foto mostrata in Figura 3.1, è stata installata una serra per limitare il decremento delle temperature dovute al periodo invernale. In

Tabella 3.2 si riportano le caratteristiche del centrato in ingresso al raceway le caratteristiche della sospensione algale relative al periodo suddetto.

Tabella 3.2: caratteristiche medie del substrato di crescita in alimento al raceway e della sospensione algale presente al suo interno relative al mese di dicembre 2018

	$COD_{sol}$	$NH_4^+$	$NO_2^-$	$NO_3^-$	TN	$PO_4^{3-}$	VSS	pH	Conta cellulare
	mg/l	mgN/l	mgN/l	mgN/l	mgN/l	mgP/l	g/l		cell/mL
alimento	70.8±7.30	171±27	0	0	171±27	4.51±0.1	0.31±0.4	7.4	
sospensione algale	66±4	21±3	1±0.5	180±13	202±10	3±0.1	0.±0.0	6.3	2.90E+06±3.6E+0.5

Dalle caratteristiche del digestato in ingresso e in uscita dal raceway si evidenzia la presenza di un consorzio alghe-batteri. La rimozione dell'ammonio, a giudicare dai dati in Tabella 3.2, è imputabile quasi esclusivamente alla nitrificazione da parte dei batteri nitrificanti. L'attività delle alghe infatti risulta particolarmente ridotta per via delle basse Temperature e la poca intensità luminosa che caratterizzano la stagione in cui è avvenuta la raccolta.

Il campione PM è stata centrifugato in parte presso il laboratorio del Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Terra dell'Università di Milano-Bicocca ed in parte presso il laboratorio A. Rozzi del Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale del Politecnico di Milano, Polo di Cremona.

Il campione CHL ed il campione SC sono costituiti rispettivamente da *Chlorella sorokiniana* e *Scenedesmus obliquus* coltivate entrambe su medium Bold Basal Medium (BBM) (Bold, 1949) presso l'Istituto Sperimentale italiano Lazzaro Spallanzani.

Il campione EU è costituito da biomassa appartenente alla specie *Euglena gracilis* coltivata su medium sintetico Cramer & Myers (Cramer & Myers, 1952) presso il laboratorio A. Rozzi.

In Tabella 3.3 si riportano le caratteristiche dei campioni PM, CHL, SC e EU a seguito della centrifugazione.

Tabella 3.3: Caratteristiche dei campioni centrifugati.

Campione	$COD_{sol}$	$NH_4^+$	$TN_{sol}$	TSS	VSS	pH
	mg/l	mgN/l	gN/l	g/L	g/L	
PM	247	12.9	127	8.75	7.52	7.02
CHL	117	<3	<30	12.82	11.81	7.4
SC	241	<5	<50	12.60	11.47	7.35
EU	2808	64	336	16.70	15.32	7.38

I valori sensibilmente maggiori di COD solubile e azoto riportati del campione EU rispetto a quelli degli altri campioni sono imputabili in parte alle caratteristiche del medium di crescita ed in parte ad una parziale idrolisi del campione; nonostante il metodo di centrifugazione e il tempo intercorso tra la centrifugazione e la caratterizzazione del substrato non siano differenti rispetto alle prove precedenti è probabile che la specie *E. gracilis* sia meno resistente rispetto alle alghe verdi studiate nelle prove precedenti (appartenenti cioè al phylum clorophytae) e che quindi il campione sia stato parzialmente idrolizzato durante le operazioni preliminari eseguite; questo aspetto verrà discusso approfonditamente nel capitolo successivo.

### 3.1.2 INOCULO ANAEROBICO

L'inoculo utilizzato per le prove di BMP è stato prelevato dal digestore anaerobico del depuratore di Bresso-Niguarda (Mi). Come inoculo anaerobico è stato utilizzato sia digestato pre-ispessito (I.1) sia digestato proveniente dallo stesso impianto ma prelevato direttamente in uscita dal reattore (I.2). In Tabella 3.4 sono riportate le caratteristiche di entrambi gli inoculi.

Tabella 3.4: caratteristiche medie dell'inoculo utilizzato per la prova BMP\_1, BMP\_3, BMP\_4.

Inoculo	COD <sub>sol</sub>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	TN <sub>sol</sub>	TS	VS	pH
	mgO <sub>2</sub> /l	mgNH <sub>4</sub> -N/l	gN/l	g/L	g/L	
I.1	332	151	173	21	12	7.3
I.2	122	70	81	15	9	7.4

### 3.1.3 MEDIUM DI CRESCITA PER LA COLTIVAZIONE DI E. GRACILIS

Nel corso della sperimentazione sono state svolte prove di coltivazione di *Euglena gracilis*; la specie è stata coltivata prima su medium sintetico Cramer & Myers (Cramer & Myers, 1952) e successivamente è stata confrontata la crescita su medium sintetico con quella su refluo idrolizzato proveniente da macellazione, fornito dall'Istituto Italiano Sperimentale L. Spallanzani.

Le caratteristiche dei medium utilizzati per la crescita sono riportati in Tabella 3.5. Il medium M è stato preparato secondo la ricetta indicata da Cramer & Myers, il medium M\* è stato invece modificato in termini di concentrazione di ammonio e COD<sub>sol</sub> per rendere questi valori confrontabili con quelli del refluo utilizzato nella seconda fase di crescita.

Tabella 3.5: Caratteristiche del medium Cramers & Meyers (M) e del medium modificato (M\*).

Composto	U.M.	M	M*
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	g/l	1.2	4.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g/l	1	1
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	g/l	0.2	0.2
CaCl <sub>2</sub>	g/l	0.02	0.02
CH <sub>3</sub> COONa	g/l	1.64	7.08
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> *nH <sub>2</sub> O	mg/l	3	3
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	mg/l	1.8	1.8
CoSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	mg/l	1.5	1.5
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	mg/l	0.4	0.4
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	mg/l	0.2	0.2
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	mg/l	0.02	0.02
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	mg/l	2.48	2.48
Thiamine HCl (Vitamin B1)	mg/l	0.5	0.5
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	mg/l	0.02	0.02

Rispetto alla ricetta originale (Cramer & Myers, 1952) è stato sostituito 1 g/l di fosfato di ammonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> con 1.2 g/l di bicarbonato di ammonio NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, secondo la disponibilità di sali

presente in laboratorio. La concentrazione di bicarbonato è stata scelta affinché fossero mantenute le stesse concentrazioni molari di ammonio nelle due soluzioni.

Così facendo il rapporto N/P del medium preparato in laboratorio è risultato pari a 0.93 gN/gP, invece di 0.46 gN/gP previsto dalla ricetta. Si è scelto di non aumentare l'apporto di diidrogeno fosfato di potassio per mantenere lo stesso rapporto N/P poiché la concentrazione di fosforo della ricetta modificata è sicuramente sufficiente a garantire condizioni di non limitazione da fosforo, inoltre il composto contribuisce ad aumentare la torbidità della soluzione. La modifica del medium non è stata dunque considerata una variabile significativa nell'interpretazione dei risultati ottenuti.

Le caratteristiche del refluo che è stato utilizzato come substrato di crescita nella seconda fase della prova di crescita sono riassunte in Tabella 3.6:

Tabella 3.6: Caratteristiche del refluo R

	U.M.	R
$COD_{tot}$	mg/l	5815
$COD_{filt}$	mg/l	5520
$COD_{part}$	mg/l	295
$BOD_5$	mg/l	4972
$BOD_{20}$	mg/l	5592
$NH_4^+$	mgN /l	843
$NO_2^-$	mgN /l	<0.6
$NO_3^-$	mgN /l	1.63
$TKN_{tot}$	mgN/l	844
$PO_4^{3-}$	mgP-PO43/l	1.7
$P_{tot_{tot}}$	mgP/l	3.1
$P_{tot_{filt}}$	mgP/l	3.5
$pH$		6.4
$conducibilità$	mS/cm	5.3

## 3.2 PRETRATTAMENTI DELLA BIOMASSA ALGALE

Come già accennato in precedenza parte delle analisi svolte sono state eseguite presso il laboratorio del Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e della Terra dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca (Mi). Le modalità di esecuzione dei pretrattamenti sono state mantenute invariate mentre non è stato possibile mantenere invariate le concentrazioni rispetto a quelle utilizzate per le prove di BMP per via della disponibilità della biomassa. Al fine di mantenere il più possibile una coerenza nelle modalità di esecuzione delle analisi, la concentrazione della biomassa in questo caso è stata sempre mantenuta tra 0.35 e 0.45 gSSV/l.

### *Pretrattamenti termici*

I pretrattamenti termici sono stati svolti ponendo i campioni in contenitori sigillati all'interno di un bagno d'acqua mantenuto alla temperatura desiderata attraverso una piastra riscaldante dotata di termometro (modello C-MAG HS 7, prodotto da IKA). Durante lo svolgimento della prova è stato ammesso un  $\Delta T$  di  $\pm 2$  °C per la temperatura di 70 °C e  $\pm 5$  °C per la temperatura di 100°C.

I pretrattamenti hanno avuto durata compresa tra 1 e 6 ore.

Al termine del pretrattamento il campione è stato riportato a temperatura ambiente tramite un bagno d'acqua alla temperatura di circa 20°C prima dell'apertura del contenitore.

### *Pretrattamenti chimici*

L'acidificazione è avvenuta aggiungendo al campione una soluzione di HCl 1 M in quantità tale da portare il pH della soluzione fino a  $2 \pm 0.5$ . I campioni sono stati poi lasciati indisturbati a temperatura ambiente per un'ora, al termine del pretrattamento i campioni sono stati neutralizzati con una soluzione 0.5 M di NaOH.

La basificazione dei campioni è avvenuta aggiungendo al campione una soluzione di NaOH 0.5 M in quantità tale da portare il pH della soluzione fino a  $11 \pm 0.5$ . I campioni sono stati poi lasciati indisturbati a temperatura ambiente per un'ora, al termine del pretrattamento i campioni sono stati neutralizzati con una soluzione 1 M di HCl.

Il pH dei campioni neutralizzati in tutti i casi è risultato compreso tra 7.0 e 7.5.

### *Sonicazione*

La sonicazione è avvenuta all'interno di un bagnetto sonicante (modello bm60, prodotto da Exacta+Optech).

Lo strumento è stato impostato affinché fosse applicata all'interno del bagno d'acqua una potenza pari a 80 W e il pretrattamento ha avuto durata di un'ora. Durante il corso del pretrattamento la temperatura del bagno d'acqua è cresciuta fino a  $35^{\circ}\text{C}$ . Al termine della prova i campioni sono stati raffreddati secondo le modalità descritte per il pretrattamento termico.

### *Pretrattamento enzimatico*

Il pretrattamento enzimatico è stato eseguito applicando un cocktail di enzimi composto da "Viscozyme<sup>®</sup> L" e "Protease from *Aspergillus oryzae*", entrambi prodotti da SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>. La prima miscela è specifica per l'idrolisi di diversi carboidrati quali cellulose ed emicellulose ed è composta da una miscela di enzimi estratti da *Aspergillus sp.* mentre la seconda soluzione utilizzata risulta specifica per le proteine.

Il cocktail così composto è stato dosato in funzione dell'Unità di Attività indicata dal produttore e la soluzione è stata mantenuta indisturbata in termostato a  $35^{\circ}\text{C}$  per 24 h.

#### 3.2.1 VALUTAZIONE DELL' EFFICACIA DEI PRETRATTAMENTI

In Tabella 3.7 sono riportate le misure eseguite per la valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti.

Le osservazioni tramite microscopio ottico e le analisi eseguite con il citofluorimetro verranno definite in sede di discussione dei risultati "valutazioni su scala microscopica" in quanto sono state utilizzate per la valutazione dello stato di integrità della parete e della cellula, mentre le altre analisi saranno definite come "valutazioni su scala macroscopica".

*Tabella 3.7: analisi svolte per la valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti*

<b><i>campione</i></b>	<b><i>misura</i></b>
<i>tal quale</i>	<i>spettro nel visibile</i>
<i>tal quale</i>	<i>OD<sub>picco</sub> totale, <math>\lambda_{\text{picco}}</math></i> <i>OD<sub>picco</sub> totale, netto</i>
<i>tal quale</i>	<i>OD 750 totale</i> <i>OD750 totale, netto</i>
<i>tal quale</i>	<i>analisi con il citofluorimetro</i>
<i>tal quale</i>	<i>conta cellulare e osservazione con microscopio ottico</i>

<i>tal quale</i>	<i>osservazione tramite microscopio a fluorescenza e misura della vitalità del campione</i>
<i>filtrato</i>	<i>spettro nel visibile</i>
<i>filtrato</i>	<i>OD 680 filtrato</i>
<i>filtrato</i>	<i>OD 260 filtrato</i>
<i>solubile</i>	<i>COD<sub>sol</sub></i>
<i>solubile</i>	<i>TN</i>
<i>solubile</i>	<i>NH<sub>4</sub></i>

### 3.2.2 METODI PER LA VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DEI PRETRATTAMENTI

#### Metodi analitici:

Di seguito si riportano le procedure, le metodiche e gli strumenti utilizzati per effettuare le misure in Tabella 3.7.

*Misure di assorbanza sul campione tal quale:* Misure effettuate tramite Spettrofotometro UV-VIS Hach Lange DR6000. Lo *spettro nel visibile* è stato misurato effettuando la lettura dell'assorbanza del campione per lunghezze d'onda comprese tra 330-770 nm. La misura *OD picco* corrisponde all'assorbanza del secondo picco di assorbanza della clorofilla A, solitamente presente a lunghezze d'onda pari a 680 nm. Se dall'analisi preliminare dello spettro nel visibile è risultato uno spostamento del picco, è stato considerato il valore del picco spostato e indicata la lunghezza d'onda corrispondente. La misura *OD 750 totale* corrisponde all'assorbanza del campione tal quale ad una lunghezza d'onda pari a 750 nm.

*Misure di assorbanza sul campione filtrato:* Misure effettuate tramite Spettrofotometro UV-VIS Hach Lange DR6000 dopo filtrazione del campione attraverso filtri di porosità 0.45 µm. La misura dello *spettro nel visibile* è stata eseguita misurando l'assorbanza del campione filtrato per lunghezze d'onda  $\lambda$  comprese tra 330-770 nm. La misura *OD 680 filtrato* è stata ottenuta misurando l'assorbanza del campione filtrato ad una  $\lambda$  pari a 680 nm. La misura *OD 260 filtrato* è stata eseguita misurando l'assorbanza del campione ad una lunghezza d'onda pari a 260 nm, poiché la  $\lambda$  utilizzata ricade nel campo dell'ultravioletto esclusivamente per questa misura sono state utilizzate cuvette in quarzo.

*COD<sub>sol</sub>, TN, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:* Misure effettuate tramite metodo colorimetrico in kit Hach Lange previa filtrazione dei campioni su filtri di porosità 0.45 µm, secondo le istruzioni fornite dal produttore. L'assorbanza è stata letta tramite Spettrofotometro UV-VIS Hach Lange ed i kit eventualmente trattati termicamente tramite Termostato Hach Lange LT200.

#### Procedure sperimentali:

*Conte cellulari:* Eseguite con camera di Burker tramite microscopio Optikam 4083.8 prodotto da OPTIKA® Srl.

*Determinazione della vitalità e osservazione con microscopio a fluorescenza:* Per l'osservazione tramite microscopio a fluorescenza è stato centrifugato 1 mL di campione tramite centrifuga Z 323 K, prodotta da HERMLE Labortechnik con velocità di centrifugazione: 5000 rpm per una durata di 6 minuti e risospeso in 1 mL di acqua deionizzata.

Al campione è stato quindi aggiunto 1 µL di SYTOX™ Green Dye in concentrazione pari a 5 mM in soluzione DMSO. La soluzione così preparata è stata lasciata in incubazione in assenza di luce per

almeno 10 minuti e osservata tramite microscopio a fluorescenza Zeiss Axiolab HB 50 ad una lunghezza d'onda di 490 nm. La vitalità è stata eseguita contando randomicamente un numero di cellule superiore a 100 e suddividendole in base al colore in morte (colore verde) e vive (colore rosso). La proporzione ottenuta dal conteggio è stata poi applicata all'intero campione.

*Analisi con il citofluorimetro:* i campioni opportunamente diluiti sono stati sottoposti ad analisi tramite citofluorimetro CytoFLEX S, prodotto da Beckman Coulter. Sono stati analizzati tramite citometria a flusso sia i campioni tal quali sia i campioni iniettati precedentemente con SYTOX™ Green Dye secondo la procedura descritta per la determinazione della vitalità.

Di seguito si riporta una breve descrizione del significato dei parametri utilizzati in fase di elaborazione dei dati, per una spiegazione più approfondita si consiglia di consultare il manuale "Practical Flow Cytometry" (Shapiro, 1995)

I parametri che sono stati considerati significativi in sede di elaborazione dei dati sono le conte eseguite sui solidi, i parametri geometrici e di complessità cellulare espressi dal Forward Scatter (FSC) e Side Scatter (SSC) e le misure di fluorescenza (APC, PerCP, FITC).

I parametri FSC e SSC vengono misurati applicando il principio di diffrazione della luce.

L'FSC viene misurato tramite un sensore posto di fronte al raggio laser emesso dallo strumento e la sua intensità dipende dal livello di diffrazione che il raggio subisce nell'attraversare il campione, ad un aumento dell'FSC è dunque associato un aumento della diffrazione e quindi del volume della cellula.

Il sensore che misura l'SSC è posto invece a 90° rispetto al raggio emesso ed è quindi legato alla riflessione e all'indice di rifrazione del solido incontrato. Per cellule prive di parete la misura del SSC dipende esclusivamente dalla complessità e dalla granulometria interna (i valori di FSC-SSC ad esempio vengono solitamente usati in medicina per suddividere le cellule del sangue), nelle cellule in cui è presente parete cellulare l'SSC è determinato principalmente dalle caratteristiche di quest'ultima.

L'intensità di fluorescenza viene misurata mediante il sistema ottico presente nello strumento. Un raggio laser monocromatico eccita i fluorocromi presenti all'interno del campione, i quali assorbono l'energia in arrivo e la riemettono a lunghezze d'onda maggiori. I fluorocromi che sono stati investigati sono i pigmenti clorofilliani presenti nelle alghe e il tracciante SYTOX Green Dye®. I canali di eccitazione e lettura della risposta emissiva che sono stati considerati in sede di elaborazione dei dati sono i seguenti e prendono il nome dal complesso proteico che sono in grado di rilevare:

- ❖ APC (Allophycocyanin Protein Complex): eccitazione tramite raggio laser rosso,  $\lambda_{\text{eccitazione}} = 650 \text{ nm}$  e lettura della risposta nel rosso,  $\lambda_{\text{emissione}} = 660-620 \text{ nm}$ .
- ❖ PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein Complex): eccitazione tramite raggio laser blu,  $\lambda_{\text{eccitazione}} = 488 \text{ nm}$  e lettura della risposta nel rosso,  $\lambda_{\text{emissione}} = 695 \text{ nm}$ .
- ❖ PE (Phycoerythrin): eccitazione tramite raggio laser blu,  $\lambda_{\text{eccitazione}} = 488 \text{ nm}$  e lettura della risposta nel rosso,  $\lambda_{\text{emissione}} = 670 \text{ nm}$ .
- ❖ FITC: eccitazione tramite raggio laser blu,  $\lambda_{\text{eccitazione}} = 488 \text{ nm}$  e lettura della risposta nel verde,  $\lambda_{\text{emissione}} = 500 \text{ nm}$ .

### 3.2.3 ELENCO DELLE PROVE DI PRETRATTAMENTO

In Tabella 3.8 si riporta l'elenco delle prove effettuate, suddivise in base al campione algale di partenza.

Tabella 3.8: Elenco prove di pretrattamento svolte.

Set	Codice prova	Campione algale	Pretrattamento
PM	PM.NT	Popolazione mista	Non pretrattato
PM	PM.T1	Popolazione mista	70 °C, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min, 360 min
PM	PM.T2	Popolazione mista	100 °C, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min, 360 min
PM	PM.T3	Popolazione mista	90 °C, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min, 360 min
PM	PM.T4	Popolazione mista	60 °C, 30 min, 60 min, 120 min, 240 min, 360 min
CHL	CHL.NT	<i>C. sorokiniana</i>	Non pretrattato
CHL	CHL.T1	<i>C. sorokiniana</i>	70 °C, 1h
CHL	CHL.T2	<i>C. sorokiniana</i>	100 °C, 1h
CHL	CHL.A	<i>C. sorokiniana</i>	pH=2, 1h
CHL	CHL.B	<i>C. sorokiniana</i>	pH=11, 1h
CHL	CHL.S	<i>C. sorokiniana</i>	Sonicazione a 80 W, 1h
SC	SC.NT	<i>S. obliquus</i>	Non pretrattato
SC	SC.T1	<i>S. obliquus</i>	70 °C, 1h
SC	SC.T2	<i>S. obliquus</i>	100 °C, 1h
SC	SC.A	<i>S. obliquus</i>	pH=2, 1h
SC	SC.B	<i>S. obliquus</i>	pH=11, 1h
SC	SC.S	<i>S. obliquus</i>	Sonicazione a 80 W, 1h
SC	SC.E	<i>S. obliquus</i>	Enzimatico
EU	EU.NT	<i>E. gracilis</i>	Non pretrattato
EU	EU.T1	<i>E. gracilis</i>	70 °C, 1h
EU	EU.T2	<i>E. gracilis</i>	100 °C, 1h
EU	EU.A	<i>E. gracilis</i>	pH=2, 1h
EU	EU.B	<i>E. gracilis</i>	pH=11, 1h

### 3.3 PROVE DI BMP

Le prove di BMP realizzate nell'ambito di questa sperimentazione sono state eseguite con la finalità di valutare la resa metanigena della biomassa algale e l'efficacia di alcuni pretrattamenti applicati, nonché con l'obiettivo di trovare uno o più parametri indicatori del buon esito del processo di pretrattamento.

Le prove di BMP sono state allestite all'interno di bottiglie in vetro dal volume di circa 330 mL e la produzione di biogas è stata valutata attraverso metodo manometrico.

L'inoculo batterico anaerobico è stato posto in termostato a 35°C per un periodo compreso tra i 3 ed i 10 giorni prima dell'inizio della prova per ridurre la produzione metanigena endogena.

La sospensione di prova è stata ottenuta miscelando la biomassa algale, l'inoculo pre-degasato e una soluzione di oligoelementi in accordo allo standard OECD 311. La soluzione standard di oligoelementi è stata dosata in rapporto 1:10 rispetto al volume totale della soluzione. È stato inoltre aggiunto bicarbonato di ammonio in tutte le bottiglie per fornire potere tampone alla soluzione, in concentrazione pari a  $7 \pm 1$  g/l di soluzione finale.

Infine è stato aggiunto un volume di acqua in modo tale da ottenere la concentrazione desiderata di solidi in sospensione e allo stesso tempo una pressione ottimale prodotta dal biogas all'interno delle bottiglie.

Le bottiglie sono state flussate con azoto per garantire le condizioni anaerobiche per un tempo di circa 10 minuti.

La miscela è stata poi sigillata all'interno delle bottiglie mediante un tappo in gomma assicurato con una ghiera metallica e rivestito con del parafilm per ridurre eventuali perdite di pressione. La miscela è stata dunque posta in agitazione su scuotitore alternato e mantenuta a 35 °C per tutto il corso della prova. Oltre alle matrici da digerire è stato preparato un "bianco" in cui il substrato algale è stato sostituito da un pari volume di acqua al fine di valutare la produzione endogena di metano e di sottrarla alla produzione di metano misurata nel corso della prova e poter ricavare dunque la produzione di metano attribuibile alla sola biomassa algale. Ogni campione è stato preparato in doppio.

In modalità manometrica, la produzione di biogas viene valutata a partire dal valore della pressione che si genera all'interno delle bottiglie, misurata inserendo l'ago di un manometro attraverso il tappo in gomma all'interno delle bottiglie chiuse; la sovrappressione generatasi rispetto a quella misurata al tempo 0 infatti non può che essere attribuita al processo di degradazione anaerobico attuato dal consorzio batterico presente nell'inoculo.

Per ottenere il volume di biogas prodotto a partire dalla sovrappressione si applica l'equazione 3.1.

$$V_{b,n} = V_{HS} * \frac{\Delta P}{P} * \frac{T_0}{T_{op}} \quad 3.1$$

La percentuale di metano nel biogas non è costante ma tende ad aumentare nel corso della prova. Per conoscere la percentuale di metano istantanea all'interno della bottiglia viene svolta un'analisi della composizione con il gas cromatografo. Per motivi organizzativi ed operativi l'analisi della composizione del gas è stata eseguita tra le due e le tre volte nel corso di ogni prova di BMP. Per il calcolo della dell'andamento nel tempo della produzione cumulata di metano viene fatta l'ipotesi approssimativa per cui la composizione del gas nell'intervallo di tempo intercorso tra due esami con il gas cromatografo rimanga invariata; sotto queste ipotesi la frequenza con cui vengono svolte le suddette analisi ha un impatto rilevante sull'accuratezza dei risultati finali.

Il Volume di metano ( $V_m$ ) istantaneamente prodotto risulta dunque (Eq.3.2):

$$V_m = V_b * \%CH_4 \quad 3.2$$

Dove la  $\%CH_4$  esprime la percentuale di metano espressa rispetto al volume di biogas prodotto, ottenuta dall'analisi con il gas cromatografo.

La resa di metano attribuibile al substrato algale ( $V_{m,sub}$ ), calcolata al netto della produzione endogena ( $V_{m,bianco}$ ), è espresso mediante l'Eq. 3.3.

$$V_{m,sub} = (V_m - V_{m,bianco})/VSS_{alghe} \quad 3.3$$

Laddove possibile, le prove sono state interrotte quando l'incremento giornaliero di biogas per ogni bottiglia è risultato minore dell'1% rispetto al volume cumulato prodotto fino a quel momento.

A fine prova è stata valutata la biodegradabilità (B%) del substrato algale mediante l'Eq. 3.4.

$$B(\%) = (COD_{in} - COD_{CH_4}) / COD_{in} * 100 \quad 3.4$$

Dove:

- ❖  $COD_{in} = C_s * V_s * F$  in cui  $C_s$  rappresenta la concentrazione del substrato [gVSS/L],  $V_s$  il volume di substrato [L] ed  $F$  rappresenta il rapporto tra solidi sospesi volatili e COD medio della biomassa algale, pari a 1.51 gCOD/gVSS (rapporto ricavabile a partire dalla formula stechiometrica (Larsdotter, 2006) e misurato in passato dagli operatori del Laboratorio Rozzi).
- ❖  $COD_{CH_4} = \frac{V_{m,sub} * C_s * V_s}{0.350 \frac{LCH_4}{gCOD}}$

### 3.3.1 METODI ANALITICI PER L'ESECUZIONE DELLE PROVE DI BMP

#### Metodi analitici:

*Solidi:* i contenuti di ST, SV, SST e SSV sono stati determinati in doppio in accordo al Metodo Standard 2540 (APHA 2005).

*pH:* è stato misurato per via potenziometrica direttamente sui campioni liquidi utilizzando una sonda portatile (Hach-Lange HQ40d).

*Analisi gas:* le analisi composizionali del biogas prodotto sono state effettuate per mezzo del gascromatografo (DANI Master GC) con rivelatore a conducibilità termica (TCD 86/40).

#### Procedure sperimentali:

*Centrifugazione:* la centrifugazione dei campioni è avvenuta tramite centrifuga C2012, prodotta da Centurion Scientific Ltd con una velocità di rotazione 2800 rpm per una durata pari a 10 minuti.

### 3.3.2 MODELLI PER LA STIMA DELLA PRODUZIONE DI BIOGAS

Sono stati valutati tre differenti modelli per interpretare i dati sperimentali ottenuti dalle prove di BMP. Ogni set è stato interpolato con un unico modello al fine di permettere un confronto adeguato tra i campioni. La scelta del modello migliore è stata eseguita valutando per ogni funzione interpolante i coefficienti di determinazione  $R^2$  di ogni campione e scegliendo la funzione la cui media degli  $R^2$  è risultata essere più alta.

#### *Modello di pseudo-primo ordine*

Quando l'intero processo di digestione anaerobica viene descritto da una cinetica di pseudo-primo ordine, la funzione interpolante i dati sperimentali della produzione di biogas nel assume la seguente forma (Eq. 3.5).

$$V(t) = V_{\infty} * (1 - e^{-k*t}) \quad 3.5$$

In cui  $V_{\infty}$  [mL/gVSS] rappresenta la resa di biogas asintotica e  $k$  [ $d^{-1}$ ] il rateo di produzione del primo ordine.

La stima di  $V_{\infty}$  e di  $k$  è stata eseguita applicando il metodo dei minimi quadrati, minimizzando dunque il coefficiente di determinazione  $R^2$  tra i dati sperimentali ed il modello variando iterativamente il valore di  $k$  e di  $V_{\infty}$ .

### Modello composto dalla somma di due cinetiche di pseudo-primo ordine

In alcune prove è stato costruito un modello cinetico “two-step contribution” (Lv, et al., 2007) per interpretare i flessi visibili in alcune prove sperimentali. In tal caso sono stati valutati separatamente i due contributi e sono stati successivamente sommati per costruire la curva interpolante i dati. il modello assume la seguente forma (Eq. 3.6).

$$y(t) = \begin{cases} y1 = V_{\infty,1} * (1 - e^{-k1*t}) & \text{per } t \leq t^* \\ y2 = V_{\infty,2} * (1 - e^{-k2*t}) + V_{\infty,1} * (1 - e^{-k1*t^*}) & \text{per } t > t^* \end{cases}$$

3.6

Dove  $t^*$  rappresenta il tempo in corrispondenza del quale si verifica il flesso. Per individuare il flesso è stato individuato l'intervallo temporale con il contributo maggiore nella resa di biogas  $[(\Delta V/\Delta T)/V_{fin}]_{max}$ , il  $t^*$  è stato individuato come limite inferiore del  $\Delta t$  corrispondente. La stima dei parametri  $V_{\infty}$  e  $k$  è stata eseguita analogamente a quanto fatto con il modello di pseudo-primo ordine, l' $R^2$  del modello è stato invece valutato globalmente, calcolando la devianza residua e la devianza totale dell'intero set di dati e del modello completo.

In Fig. 3.2 è mostrato un esempio dell'interpolazione dei dati sperimentali mediante il modello appena descritto e dei valori stimati ottenuti.

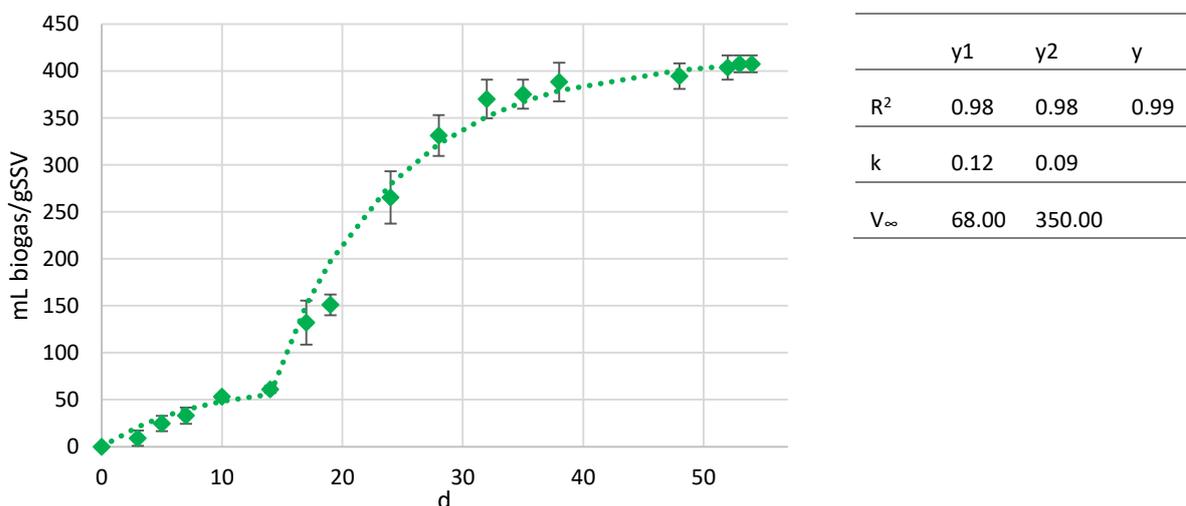


Figura 3.2: Interpolazione dei dati sperimentali della prova di BMP del campione CHL.B con il modello dell'Eq. 3.6

### Modello “ad esse”

Il modello *ad esse* (Tjørve & Tjørve, 2017) è stato utilizzato per interpolare i dati sperimentali in cui era evidente la presenza di un flesso nella cinetica di produzione del biogas. L'equazione che descrive il modello è la seguente (Eq.3.7)

$$V(t) = V_{\infty} * \left( 1 - \frac{1}{1 + \frac{t^b}{a}} \right)$$

Dove a [d<sup>-1</sup>] e b [-] rappresentano i parametri di forma della funzione.

### 3.3.3 ELENCO DELLE PROVE DI BMP ESEGUITE

La Tabella 3.9 riassume le prove di BMP svolte durante la sperimentazione. I codici assegnati alle prove di BMP sono stati affiancati ai codici assegnati in fase di pretrattamento e valutazione dell'esito dei pretrattamenti. Nel capitolo successivo ci si riferirà ai campioni sottoposti sia alle misure di pretrattamento che alle prove di BMP con il nome indicato nella colonna "codice prova".

Tabella 3.9: Prove di BMP effettuate e codici assegnati ad ogni prova.

Codice prova	Codice prova pretrattamento	Codice prova BMP	Pretrattamento
PM.NT	PM.NT	BMP1.NT	Non pretrattato
PM.T1	PM.T1	BMP1.T1	70 °C, 1h
PM.T2	PM.T2	BMP1.T2	100 °C, 1h
PM.T3	PM.T3	BMP1.T3	100 °C, 4h
CHL.NT	CHL.NT	BMP2.NT	Non pretrattato
CHL.T1	CHL.T1	BMP2.T1	70 °C, 1h
CHL.T2	CHL.T2	BMP2.T2	100 °C, 1h
CHL.A	CHL.A	BMP2.A	pH=2, 1h
CHL.B	CHL.B	BMP2.B	pH=11, 1h
CHL.S	CHL.S	BMP2.S	Sonicazione a 80 W, 1h
SC.NT	SC.NT	BMP3.NT	Non pretrattato
SC.T1	SC.T1	BMP3.T1	70 °C, 1h
SC.T2	SC.T2	BMP3.T2	100 °C, 1h
SC.A	SC.A	BMP3.A	pH=2, 1h
SC.B	SC.B	BMP3.B	pH=11, 1h
SC.S	SC.S	BMP3.S	Sonicazione a 80 W, 1h
SC.E	SC.E	BMP3.E	Enzimatico
SC.NT	SC.NT	BMP4.NT	Non pretrattato
SC.T1	SC.T1	BMP4.T1	70 °C, 1h
SC.T2	SC.T2	BMP4.T2	100 °C, 1h
SC.A	SC.A	BMP4.A	pH=2, 1h
SC.B	SC.B	BMP4.B	pH=11, 1h

## 3.4 COLTIVAZIONE DI EUGLENA GRACILIS

### 3.4.1 FOTOREATTORI

Le prove di coltivazione di *Euglena gracilis* sono state svolte nel laboratorio Rozzi di Cremona utilizzando di un sistema formato da quattro fotoreattori a colonna (IDEA Bioprocess), dotati

ognuno di un miscelatore magnetico, di una sonda pH e di una sonda per la misura della Temperatura; il sistema è dotato inoltre di una sonda per la misura dell'ossigeno disciolto che è stata spostata tra le quattro colonne per monitorare il livello di OD in tutti i reattori. L'illuminazione è garantita da un sistema di lampade ad illuminazione LED (OSRAM FLUORA L36 W/77) che si estende lungo la parete retrostante i reattori per un'estensione di 45x125 cm<sup>2</sup> ad una distanza di 10 cm dai fotoreattori. Il sistema si attiva automaticamente alle h 18.00 e si spegne alle h 6.00 del giorno dopo e garantisce dunque cicli giorno/notte di 12 ore ciascuno.

La coltivazione all'interno del sistema può essere eseguita in batch o in semicontinuo; in questo ultimo caso il sistema viene alimentato da una pompa peristaltica temporizzata. Lo scarico avviene per gravità tramite un sifone posto a 35 cm di altezza rispetto alla base delle colonne.

È possibile inoltre regolare il valore del pH impostando un valore di set-point che, una volta superato, attiva l'insufflazione di CO<sub>2</sub>.

I flussi di CO<sub>2</sub> immessi, il valore dell'ossigeno disciolto, della temperatura e del pH vengono acquisiti tramite il software IDEA Bioprocess attraverso il quale è possibile settare i valori di set-point del pH e gli rpm del miscelatore e monitorare l'andamento dei fotobioreattori.

In Figura 3.3 si riporta uno schema del sistema:

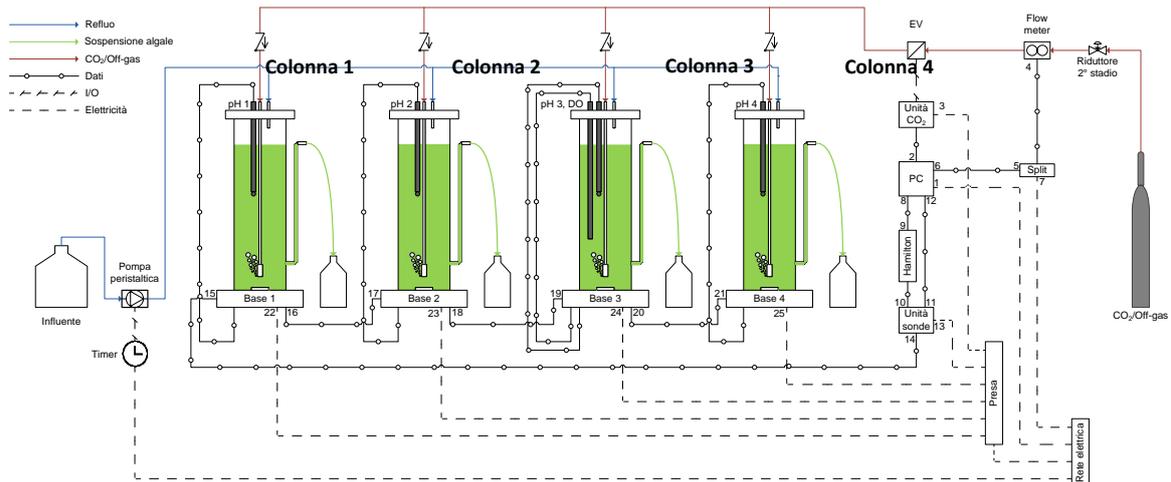


Figura 3.3: schema del sistema di fotobioreattori per la coltivazione di *Euglena gracilis*. Immagine gentilmente concessa dal Ing. Dott. Simone Rossi.

Ogni fotoreattore presenta dunque le seguenti caratteristiche:

- ❖ Colonna in plexiglas.
  - I. Diametro 10 cm
  - II. Altezza 50 cm
  - III. Volume utile 2.5 litri
- ❖ Sonda pH<sup>2</sup>
- ❖ Sonda per la Temperatura
- ❖ Pietra porosa collegata al sistema di insufflazione della CO<sub>2</sub> per il controllo pH
- ❖ Tubo in plastica collegato alla pompa peristaltica per l'alimentazione

<sup>2</sup> La sonda pH della colonna 3 è stata accidentalmente danneggiata in fase di calibrazione e non è più stato possibile eseguire il monitoraggio del pH né controllare l'insufflazione di CO<sub>2</sub> nella suddetta colonna

- ❖ Collegamento al software IDEA Bioprocess per il monitoraggio di pH, flusso di CO<sub>2</sub> e temperatura.
- ❖ Ancoretta magnetica
- ❖ Vaso di raccolta dell'effluente

L'intensità luminosa media calcolata che penetra all'interno di ogni fotoreattore è stata calcolata tramite misuratore PAR (Apogee Instruments, MQ-500) ed è indicata di seguito:

- ❖ Fotoreattore 1 (Colonna 1):  $95 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
- ❖ Fotoreattore 2 (Colonna 2):  $98 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
- ❖ Fotoreattore 3 (Colonna 3):  $103 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
- ❖ Fotoreattore 4 (Colonna 4):  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

### 3.4.2 PIANO SPERIMENTALE

La sperimentazione è stata condotta in batch secondo il seguente piano sperimentale:

- ❖ FASE 1: Crescita su medium sintetico (M)  
Due colonne mantenute con pH minore di 7.1 e due colonne con pH non controllato
- ❖ FASE 2: Crescita su refluo (R) nelle colonne C1 e C2 e crescita su medium sintetico modificato (M\*) nella colonna C4.

Le caratteristiche del medium (M) e del medium modificato (M\*) sono riportate in Tab. 3.5 e quelle del refluo (R) in Tab. 3.6.

#### Fase 1

Per avviare la fase 1 è stato utilizzato un inoculo precedentemente coltivato in batch all'interno del laboratorio Rozzi di Cremona. Il fattore di diluizione dell'inoculo di partenza è stato scelto in modo tale che il valore di assorbanza a 680 nm iniziale nelle colonne fosse nell'intorno di 0.05.

Il medium sintetico preparato è stato diluito 1:5. In Tabella 3.10 si riportano i volumi componenti la soluzione finale delle colonne e le concentrazioni in termini di nutrienti che ne conseguono.

Tabella 3.10: Proprietà delle soluzioni di crescita della fase 1.

Volume totale	mL	2500
Volume medium	mL	500
Volume alghe	mL	67
Volume acqua	mL	1933
N presente	mgN/l	42
P presente	mgP/l	46
C presente	mg/l	256
N/P	gN/gP	0.9
pH		7.6

#### Fase 1\_bis

Poiché al termine della fase 1 è stata osservata una contaminazione delle colonne da parte di alghe del genere *Chlorella* è stato necessario utilizzare un nuovo inoculo puro di *E. gracilis* fornito dall'Istituto italiano Lazzaro Spallanzani. A partire dal nuovo inoculo è stata nuovamente coltivata la biomassa nelle colonne 1, 2 e 4 alimentate come indicato in Tab. 4.1. Una volta raggiunto lo stato di crescita stazionario di questa nuova fase 1\_bis ed avendo escluso tramite osservazione al microscopio la possibilità di una nuova contaminazione, è stato possibile procedere con la fase 2.

### Fase 2

Per la fase 2 si è scelto di utilizzare solo le 3 colonne nelle quali è stato possibile controllare il pH tramite insufflazione di CO<sub>2</sub>.

Il refluo R (Tabella 3.6) è stato diluito di un fattore 4, mentre il medium (M\*) è stato modificato affinché le concentrazioni di ammonio e COD<sub>sol</sub> nei reattori fossero confrontabili e diluito di un fattore 2 (Tabella 3.5).

In Tabella 3.11 si riportano le caratteristiche delle soluzioni di crescita alimentate con refluo (R) e con medium modificato (M\*) (Tab 4.2) e le proprietà in termini di COD, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e P<sub>tot</sub> dei due alimenti.

Tabella 3.11: Proprietà dell'alimento delle colonne C1, C2 e C4. I valori contrassegnati da \* indicano che la misura è avvenuta il giorno 1 della sperimentazione.

		C1 e C2 (R)	C4 (M*)
Volume totale	mL	2500	2500
Volume R/M*	mL	625	1250
Volume alghe	mL	115	115
Volume acqua	mL	1760	1135
NH <sub>4</sub> presente	mgN/l	422 <sup>3</sup>	425
TN <sub>sol</sub> presente	mgN/l	458	425
COD <sub>sol</sub> presente	mgO <sub>2</sub> /l	2992 <sup>3</sup>	2761
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> presente	mgP/l	2	114
TP <sub>sol</sub> presente	mgP/l	2 <sup>3</sup>	114

### Monitoraggio:

Il monitoraggio è stato svolto misurando i seguenti parametri di crescita delle alghe e di rimozione di nutrienti dalla soluzione acquosa secondo il piano di campionamento riportato in Tabella 3.12.

Tabella 3.12: Parametri misurati e frequenza del monitoraggio.

PARAMETRI DI CRESCITA ALGALE					PARAMETRI DI RIMOZIONE DI NUTRIENTI				
OD 680	torbidità	conta cellulare	TSS	VSS	COD <sub>sol</sub>	NH <sub>4</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>
-	-	cell/mL	g/L	g/L	mgO <sub>2</sub> /l	mgN/l	mgN/l	mgN/l	mgP/l
5/w	2/w	1/w	1/w	1/w	2/w	2/w	1/w	1/w	1/w

<sup>3</sup>: Valori misurati tra il giorno 0 ed il giorno 1 della prova. La caratterizzazione del refluo in Tab. 2.5 non è risultata indicativa degli effettivi valori di partenza della Fase 0 per via degli apporti di nutrienti dovuti al volume di alghe immesso e delle diverse modalità di scongelamento del refluo tra la fase di caratterizzazione e la fase 1 del piano.

### 3.4.3 METODI ANALITICI E PROCEDURE SPERIMENTALI PER LE PROVE DI COLTIVAZIONE

*Determinazione solidi:* i contenuti di ST, SV, SST e SSV sono stati determinati in doppio in accordo al Metodo Standard 2540 (APHA 2005).

*pH:* è stato misurato per via potenziometrica direttamente sui campioni liquidi utilizzando una sonda portatile (Hach-Lange HQ40d).

*COD totale:* è stato determinato in accordo al metodo 5130 (APAT/IRSA-CNR) tramite l'ossidazione della sostanza organica con  $K_2Cr_2O_7$  in presenza di  $H_2SO_4$  95-96% e  $Ag_2SO_4$  (Velp Scientifica, Termoreattore ECO6), e successiva titolazione con solfato ferroso ammonico (Ferrous ammonium sulfate, FAS).

*TKN (Total Kjeldahl Nitrogen):* è stato misurato in accordo ai Metodi di Analisi del Compost (ANPA 2001) tramite digestione acida con  $H_2SO_4$  95-96% (Velp Scientifica, Digestore Kjeldahl DK6), distillazione (Velp Scientifica, Distillatore Kjeldahl UDK139) e titolazione con  $H_2SO_4$ .

*Metodi per il monitoraggio dei parametri di crescita:*

*OD 680:* cfr Cap 2.2

*torbidità:* Misura di attenuazione del flusso radiante effettuata tramite Spettrofotometro UV-VIS Hach Lange DR6000 secondo la metodica EN ISO 7027

*conta cellulare:* cfr Cap 2.2

*Metodi per il monitoraggio dei parametri di rimozione dei nutrienti:*

*$COD_{sol}$ ,  $NH_4^+$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $PO_4^{3-}$ , TN, TP:* Misure effettuate tramite metodo colorimetrico in kit Hach Lange previa filtrazione dei campioni su filtri di porosità 0.45  $\mu m$ , secondo le istruzioni fornite dal produttore. L'assorbanza dei kit è stata letta tramite Spettrofotometro UV-VIS Hach Lange ed i kit eventualmente trattati termicamente tramite Termostato Hach Lange LT200.

### 3.4.4 MODELLI PER LA VALUTAZIONE DELLA CRESCITA ALGALE

Per la stima del tasso di crescita specifico della biomassa algale  $\mu$  è stata considerata la fase di crescita esponenziale (Eq. 3.8)

$$N(t) = N_0 * \exp(\mu * t) \quad 3.8$$

Dove  $N_0$  rappresenta il numero di cellule presenti all'inizio della fase esponenziale nel reattore e  $N(t)$  il numero di cellule presenti al tempo t. In assenza di dati sul numero di cellule presenti, è stata considerata la misura dell'OD 680 totale.

Linearizzando l'Eq. 3.7 su un piano semilogaritmico è possibile costruire la retta interpolante i dati e stimare la  $\mu$ , come mostrato nell'esempio in **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**

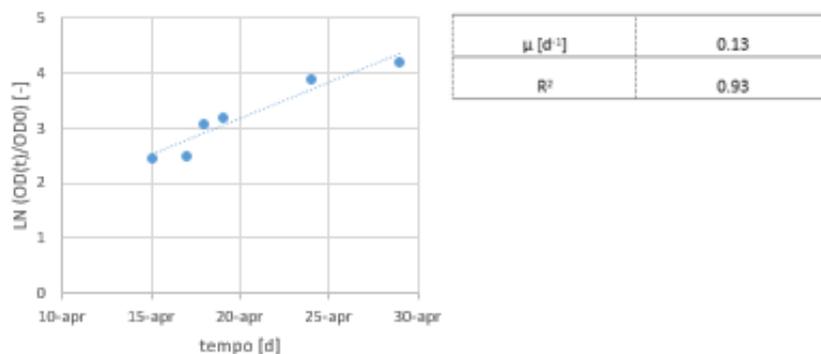


Figura 3.4: Esempio di linearizzazione su piano semilogaritmico della curva di assorbanza appartenenti alla colonna C1, fase 0 e interpolazione dei dati.

Il giorno di inizio della fase esponenziale ( $t_{0,exp}$ ) è stato individuato linearizzando l'eq. 3.8, variando  $t_{0,exp}$  e massimizzando il valore del coefficiente di determinazione  $R^2$  della retta interpolante. In Fig. 3.5 è mostrata la procedura appena descritta ed eseguita per la valutazione della crescita.

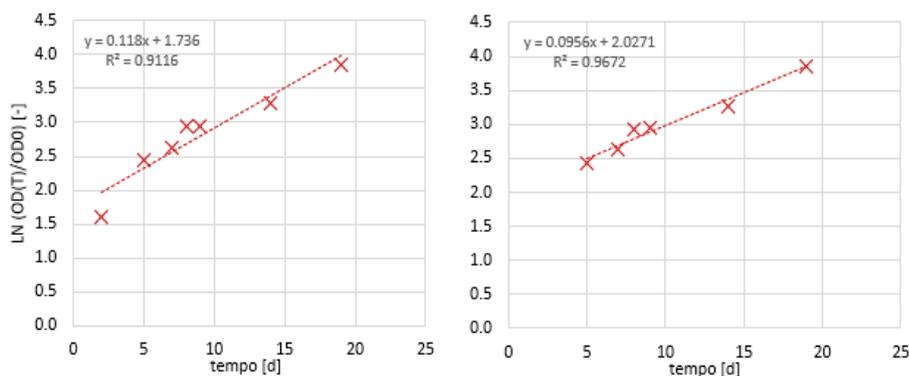


Figura 3.5: Valutazione del giorno di inizio della fase esponenziale. 4.2 A:  $t_{0,exp}=2$ . 4.2 B:  $t_{0,exp}=5$ .

### 3.5 ELABORAZIONI STATISTICHE

*Test statistici:* Sono stati eseguiti test di significatività mediante il software RStudio®.

Sono stati eseguiti test ANOVA ad una via con livello di significatività  $\alpha$  pari a 0.95 al fine di verificare l'ipotesi di uguaglianza tra le misure effettuate sui campioni utilizzati per le prove di pretrattamento.

Nel caso di rifiuto dell'ipotesi  $H_0$  del test ANOVA è stato eseguito il test di TukeyHSD per identificare le coppie di campioni significativamente differenti (con livello di confidenza pari a 0.95).

## 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 PROVE DI PRETRATTAMENTO: RISULTATI

Le prove di pretrattamento sono state eseguite per valutare la massima produzione di metano ottenibile dai substrati algali presentati nel paragrafo 3.3.1 e per valutare contestualmente le diverse modalità di azione e l'efficacia dei pretrattamenti nell'incrementare la biodegradabilità dei campioni.

Le modalità di pretrattamento e di allestimento delle prove sono state esposte nei paragrafi 3.3.2 e 3.3.4, in questa sede vengono esposti e discussi i risultati ottenuti.

È stata valutata l'informazione restituita dalle misure eseguite, la correlazione tra queste e la possibilità di valutare l'effetto dei pretrattamenti tramite dei macroindicatori costruiti a partire dall'aggregazione di più misure. A partire dalle misure eseguite è stato inoltre possibile fornire una descrizione delle modalità con cui ogni pretrattamento agisce nei confronti dei substrati utilizzati e l'effetto che questi hanno sulla resa di metano ottenuta nelle prove di BMP.

In questo capitolo vengono presentate esclusivamente le misure ritenute significative ai fini della valutazione degli effetti e dell'efficacia dei pretrattamenti. Ulteriori approfondimenti sui dati raccolti sono riportati nella sezione "Appendice" del testo.

Si richiamano in Tabella 4.1 le misure eseguite per la valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti e le informazioni che ogni misura dovrebbe fornire in base ai risultati presenti in letteratura.

Tabella 4.1: Misure per la valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti e informazione restituita attesa.

<i>campione</i>	<i>misura</i>	<i>informazione restituita</i>	<i>riferimenti</i>
<i>tal quale</i>	<i>spettro nel visibile</i> <i>spettro nel visibile netto</i>	<i>denaturazione, modifica o scomparsa di pigmenti</i>	(Shan, et al., 2001)
<i>tal quale</i>	<i>OD<sub>picco</sub> totale, λ<sub>picco</sub></i> <i>OD<sub>picco</sub> totale, netto</i>	<i>un suo aumento può indicare modifiche nella parete che ne alterano la capacità protettiva, rilascio di clorofilla. Uno scostamento del picco indica denaturazione del pigmento</i>	(Wang, et al., 2014)
<i>tal quale</i>	<i>OD 750 totale</i> <i>OD 750 totale, netto</i>	<i>un suo aumento indica maggiore torbidità associabile a formazione di nuovi detriti, indica disgregazione delle cellule</i>	(Spiden, et al., 2013) (Spiden, et al., 2015)
<i>tal quale</i>	<i>analisi con il citofluorimetro</i>	<i>dimensione e forma dei solidi, intensità di autofluorescenza su diverse lunghezze d'onda, vitalità, densità cellulare e densità solidi totali e detriti</i>	(Wang, et al., 2014) (Wang & Yuan, 2015)
<i>tal quale</i>	<i>conta cellulare e osservazione con microscopio ottico</i>	<i>consente di valutare la % di cellule danneggiate</i>	(Wang, et al., 2014) (Spiden, et al., 2014)
<i>tal quale</i>	<i>osservazione tramite microscopio a fluorescenza e vitalità del campione</i>	<i>vitalità, osservazione di agglomerati composti da materiale nucleico riflocculati all'esterno della cellula, indice di danneggiamento e fuoriuscita di materiale</i>	(González-Fernández, et al., 2012a) (Ometto, et al., 2014)
<i>filtrato</i>	<i>spettro nel visibile</i>	<i>Presenza di pigmenti in soluzione, parete parzialmente danneggiata</i>	(Safi, et al., 2015)

<i>filtrato</i>	<i>OD 680 filtrato</i>	<i>rilascio di clorofilla in soluzione, indice di parete almeno parzialmente danneggiata</i>	(Gerde, et al., 2012)
<i>filtrato</i>	<i>OD 260 filtrato</i>	<i>rilascio di materiale nucleico in soluzione, indice di parete almeno parzialmente danneggiata</i>	(Spiden, et al., 2013) (Spiden, et al., 2015) (Kelemen & Sharpe, 1979)
<i>solubile</i>	<i>COD<sub>sol</sub></i>	<i>rilascio di componenti intra o extra cellulari di natura varia</i>	(Passos, et al., 2013)
<i>solubile</i>	<i>TN</i>	<i>rilascio di materiale proteico</i>	(Mendez, et al., 2014)
<i>solubile</i>	<i>NH<sub>4</sub></i>	<i>stato di ammonificazione dell'azoto presente</i>	(Alzate, et al., 2012)

Si ricorda in questa sede inoltre che le misure eseguite tramite microscopio e citofluorimetro sono state denominate “misure a scala microscopica”, tutte le altre misure sono invece state indicate come “misure a scala macroscopica”. Nella seguente trattazione verrà utilizzata questa nomenclatura.

Per la valutazione delle assorbanze sul campione tal quale, talvolta si è rivelato utile eliminare il rumore di fondo del campione e considerare esclusivamente le differenze nette tra i vari campioni. Per fare ciò è stato sottratto a tutti i valori misurati il valore dell'assorbanza a 770 nm. L'interferenza del rumore di fondo è stata giudicata non accettabile nei set in cui l'OD770 di almeno un campione ha subito un incremento maggiore del 10% rispetto all'OD770 del campione non trattato, rendendone impossibile il confronto. In caso contrario sono stati utilizzati i valori di assorbanza grezzi.

L'assorbanza della clorofilla A è stata valutata considerando il valore del secondo picco di assorbimento, solitamente visibile ad una lunghezza d'onda  $\lambda$  pari a 680 nm. Tuttavia alcune prove hanno mostrato uno spostamento del suddetto picco; solamente in questo caso è stato indicato accanto al valore OD<sub>picco</sub> quello della lunghezza d'onda corrispondente al picco di OD ( $\lambda_{picco}$ ), laddove non è stata indicata la  $\lambda_{picco}$  è dunque sotteso che la lunghezza d'onda corrispondente è 680 nm.

In Figura 4.1 è mostrato un esempio di rielaborazione dello spettro di assorbanza per eliminare il rumore di fondo e la valutazione dell'OD<sub>picco</sub> nel caso di spostamento della  $\lambda$ .

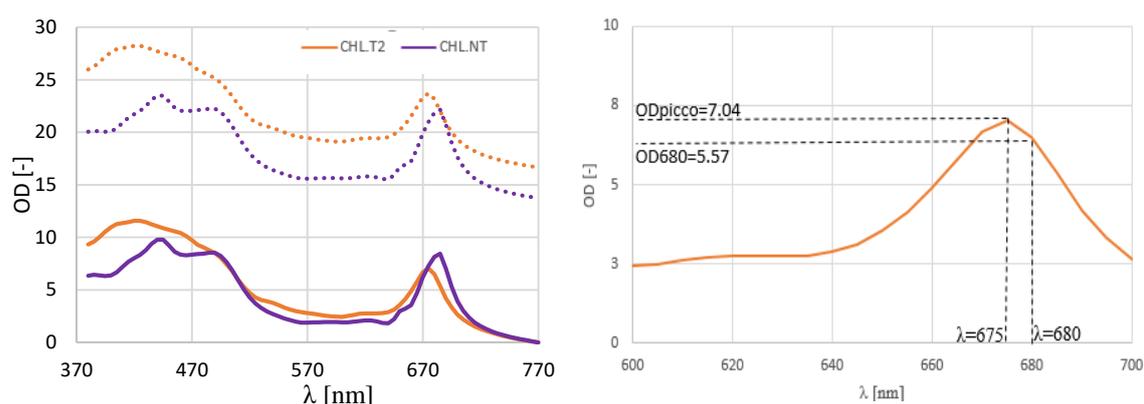


Figura 4.1: Elaborazione dello spettro di assorbimento grezzo: eliminazione del rumore di fondo e valutazione della  $\lambda_{picco}$ .

L'elaborazione dei dati ottenuti con il citofluorimetro è stata effettuata individuando le diverse popolazioni componenti il campione non trattato in base alle dimensioni e ai valori dell'APC. La popolazione algale è stata individuata ponendo una soglia minima nei valori di APC (generalmente compresa tra  $10^4$  e  $10^5$ ) ed eventualmente suddivisa in sottopopolazioni in base alle dimensioni e ai valori di autofluorescenza. I solidi presenti nel campione ma caratterizzati da bassa APC sono stati

invece classificati come detriti, batteri e rumore di fondo; in Figura 4.2 è mostrato un esempio di classificazione del campione non trattato.

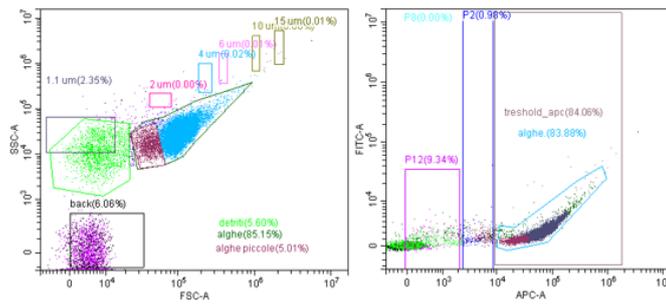


Figura 4.2: Delimitazione delle aree che racchiudono le popolazioni presenti nel campione. A sinistra: in verde i detriti e i batteri. In azzurro e in porpora la popolazione algale ed in viola il rumore di fondo. A destra è mostrato in grigio il riquadro entro il quale i solidi vengono considerati alghe.

Sono state quindi valutate eventuali differenze nei campioni pretrattati in base alle variazioni nelle densità delle popolazioni così individuate. Inoltre, sono state considerate rilevanti ai fini della valutazione le differenze nei canali di autofluorescenza APC, PerCP, APC750 e nei valori di SSC e FSC (cfr Par 3.2.2). Tali differenze sono state misurate individuando la regione sui piani y-FSC (dove per y si intendono i parametri appena citati) che comprende il 99% del campione e confrontando questa regione con quella individuata per il campione non trattato; è stato considerato inoltre lo spostamento della mediana nell'istogramma di queste variabili. In Figura 4.3 è mostrato un esempio dell'elaborazione dei dati ottenuti tramite citofluorimetro.

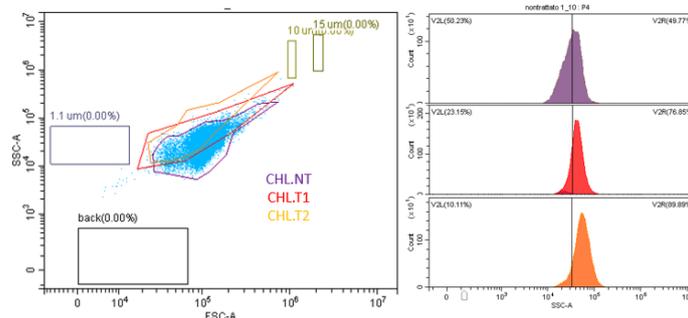


Figura 4.3: Aree individuate sul piano FSC-SSC e scostamento della mediana dei campioni considerati rispetto al campione non trattato.

Le variazioni nei canali di autofluorescenza sono state valutate sulla base delle esperienze riportate in letteratura nel seguente modo: i decrementi sono stati interpretati come indice di possibile rilascio in soluzione di contenuto intracellulare, diminuzione dell'attività fotosintetica o denaturazione dei pigmenti, mentre gli incrementi sono stati interpretati come indice di frammentazione dei solidi contenenti pigmento e riduzione dell'effetto schermante della parete. Sono stati valutati diversi canali di autofluorescenza poiché non tutte le specie algali hanno mostrato differenze nello stesso canale di eccitazione e lettura della risposta emissiva. La causa del perché ogni specie algale mostri una diversa risposta nei canali di autofluorescenza è da ricercarsi nella diversa composizione e abbondanza relativa dei pigmenti che compongono le cellule e che subiscono effetti diversi se pretrattati, come mostrano anche le diverse risposte ottenute negli spettri di assorbimento delle specie algali studiate. Per una valutazione più completa sono necessari studi dedicati in spettrofluorimetria.

È stata inoltre valutata la densità di fluorescenza nel canale della FITC per valutare la vitalità e per confrontarla con la metodica eseguita tramite microscopio a fluorescenza.

La variazione del parametro FSC è stata interpretata in un'ottica di frammentazione e riduzione delle dimensioni del particolato. Il parametro SSC dipende dall'indice di rifrazione del solido investigato dal raggio laser e fornisce informazioni sulle caratteristiche geometriche del particolato, sulla sua granulometria e omogeneità del contenuto interno. Quando il solido in questione è una cellula dotata solamente di una sottile membrana, il raggio riesce a penetrarvi e viene rifratto dagli organelli presenti all'interno della cellula, motivo per cui in questo caso il parametro SSC descrive la granulometria e la complessità interna del solido (Shapiro, 1995). Nel caso di pareti complesse come quelle che caratterizzano le alghe verdi, il raggio luminoso non riesce a penetrare all'interno della cellula, e dunque il valore del SSC dipende esclusivamente dall'indice di rifrazione della parete, che può subire variazioni in caso di frammentazione della parete, rottura parziale e variazioni nella scabrezza. In questo caso l'incremento del SSC è stato valutato come indice di una maggiore scabrezza della parete e danneggiamento.

Le variazioni in termini di APC, PerCP, SSC e FSC sono state valutate anche considerando il range di valori assunti dai parametri a seguito di pretrattamenti. La variazione è stata definita "assoluta" se la mediana del parametro del campione pretrattato assume valori esterni rispetto al range di valori proprio del parametro del campione non trattato, viceversa la variazione è stata considerata "relativa". In Figura 4.4 è mostrato un esempio in cui il campione CHL.T2 è interessato da una variazione in termini assoluti, mentre il campione CHL.T1 da una variazione in termini relativi.

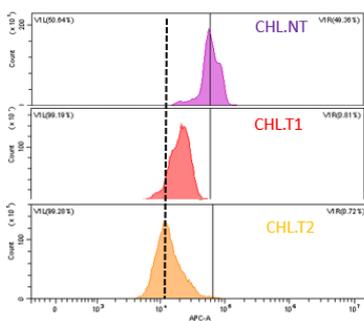


Figura 4.4: Variazioni in termini assoluti ed in termini relativi nei valori di APC.

In sede di valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti, le misure che sono risultate significativamente differenti in base ai test ANOVA e ai successivi test di TukeyHSD con livello di confidenza pari al 95% rispetto al campione non trattato sono indicate con una lettera posta come apice del valore della misura suddetta. Due valori della stessa misura connotati dalla stessa lettera indicano che questi sono significativamente differenti dal campione non trattato ma statisticamente uguali tra loro. Il test è stato applicato ogni qualvolta il numero di dati per ogni campione fosse superiore o uguale a tre.

Gli incrementi misurati nelle rese di BMP, per le quali si disponeva solamente di due dati per ogni campione, sono stati giudicati significativamente differenti se la differenza tra le rese è risultata maggiore della somma delle deviazioni standard dei due campioni. Le differenze significative in questo caso sono espresse con una lettera seguita da un asterisco posti come apice.

#### 4.1.1 CAMPIONE DI POPOLAZIONE MISTA: SET "PM"

In Tabella 4.2 si richiamano i codici assegnati al campione composto da popolazione mista nel Par. 3.2.3.

Tabella 4.2: Codici prova assegnati al set composto da popolazione mista

Set	Codice prova	Campione algale	Pretrattamento	Note
PM	PM.NT	Popolazione mista	Non pretrattato	
PM	PM.T1	Popolazione mista	70 °C, 1h	Campione mantenuto 5 giorni in più in frigorifero a + 4°C
PM	PM.T2	Popolazione mista	100 °C, 1h	
PM	PM.T3	Popolazione mista	100 °C, 4h	Prova interrotta tra il giorno 14 e il giorno 33
PM	PM.T4	Popolazione mista	60°, 70°, 90°, 100°, 0.5, 1, 2, 4, 6 h	Assenza di prove di BMP

In Figura 4.5 vengono mostrati i risultati ottenuti dalle valutazioni eseguite su scala microscopica sul campione PM.

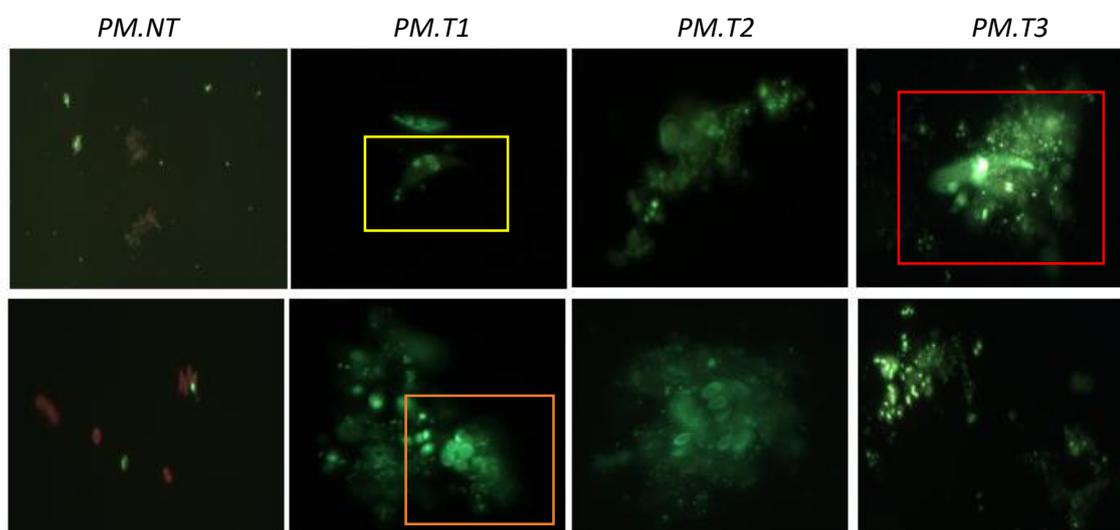


Figura 4.5: Fotografie scattate tramite fotocamera interna del microscopio a fluorescenza utilizzato per le osservazioni. PM.NT A(10x), tutte le altre immagini sono immagini al 40x.

I campioni di biomassa sono stati sottoposti a pretrattamenti termici, variando temperatura e durata del pretrattamento. Dei campioni trattati con SYTOX Green Dye® e osservati con microscopio a fluorescenza è stata valutata la vitalità e lo stato di aggregazione del materiale (Figura 4.5). Poiché la morte cellulare è un'indicazione della permeabilità della parete (Gerken, et al., 2012) l'incremento della mortalità è stato ritenuto un possibile fattore determinante nell'incremento della biodegradabilità del substrato.

I risultati mostrano che a temperature maggiori o uguali a 70° C e per durate superiori all'ora, il campione presenta sempre una vitalità pari allo 0%. Per durate superiori ad un'ora inoltre si osservano cellule parzialmente prive di materiale cellulare, come viene mostrato in Figura 4.5 all'interno del box giallo; per durate superiori alle 2 ore sono presenti agglomerati composti da materiale aggregato e cellule visibilmente integre (box arancione), che secondo diversi autori implica rottura parziale della parete e fuoriuscita di materiale organico che, per via di interazioni elettrochimiche, tende a riagglomerarsi includendo anche cellule solo parzialmente lisate (González-Fernández, et al., 2012), (Prajapati, et al., 2015). Pretrattando il campione a 100 °C il

numero e le dimensioni degli agglomerati crescono e per durate maggiori o uguali alle 4 ore sono presenti grandi agglomerati in cui non sono più visibili cellule integre (box rosso).

Da queste osservazioni è stato concluso che 70 °C è la temperatura minima in grado di indurre la fuoriuscita di materiale cellulare. Per temperature comprese tra 70°C e 90 °C le osservazioni eseguite non suggeriscono nessun cambiamento nello stato globale del campione, mentre a 100° C si osserva un aumento delle dimensioni e del numero degli aggregati, nonché una minor presenza di cellule integre al loro interno. Tali effetti risultano inoltre proporzionali alla durata del pretrattamento.

La Tabella 4.3 riassume i risultati ottenuti dalle misure eseguite su scala macroscopica.

Tabella 4.3: Misure su scala macroscopica eseguite per la valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti nella prova di BMP del set PM.

<b>Codice Prova</b>	<b>COD<sub>sol</sub></b>	<b>TN<sub>sol</sub></b>	<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/TN</b>
	<b>mg/l</b>	<b>mgN/l</b>	<b>mgN/l</b>	<b>%</b>
PM.NT	200	103	10	10
PM.T1	1600	164	58	35
PM.T2	970	141	13	11
PM.T3	1135	152	16	10

I risultati in Tabella 4.3 mostrano come i pretrattamenti termici siano accompagnati spesso da grandi rilasci di materia organica in soluzione (Passos, et al., 2014). Si evidenzia inoltre una proporzionalità tra rilascio di materiale organico e rilascio di azoto in soluzione, presente perlopiù in forma organica, a suggerire la solubilizzazione di materiale proteico. L'unica prova contraddistinta da una percentuale importante di azoto mineralizzato è la PM.T1.

In Figura 4.6 si riporta la resa netta di biogas misurata nel corso della prova BMP ed espressa come rapporto tra produzione netta cumulata di biogas e solidi sospesi volatili di biomassa algale sottoposti a digestione.

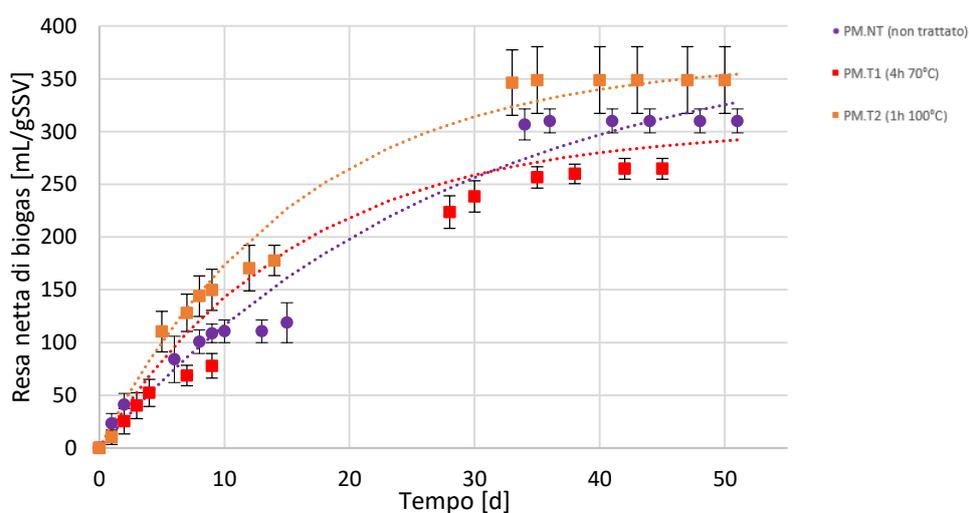


Figura 4.6: Andamento delle produzioni specifiche cumulate di biogas (linee continue) e curve interpolanti (linee tratteggiate) della prova di BMP del set PM.

Si noti che le prove di BMP mostrano un andamento caratterizzato dalla presenza di flessi, tipico dei substrati complessi (Kafle, et al., 2013), motivo per cui la cinetica di pseudo primo ordine, pur avendo generalmente un coefficiente di determinazione accettabile, in alcuni momenti si discosta dai punti sperimentali. Non è stato possibile applicare modelli differenti in questo caso per via dei pochi punti sperimentali presenti nella fase intermedia della prova.

La Tabella 4.4 riporta i risultati della prova di BMP eseguita sul campione PM.

Tabella 4.4: Risultati delle prove di BMP del set PM.

<b>Codice Prova</b>	<b>CH<sub>4</sub> nel biogas</b>	<b>Resa CH<sub>4</sub></b>	<b>Biodegradabilità</b>	<b>k</b>	<b>V<sub>∞</sub></b>	<b>Coefficiente di determinazione R<sup>2</sup></b>
	<b>%</b>	<b>mLCH<sub>4</sub>/gSSV</b>	<b>%</b>	<b>d<sup>-1</sup></b>	<b>mL/gSSV</b>	<b>-</b>
PM.NT	68±0	202±1	38	0.035	393	0.97
PM.T1	68±2	188±2 <sup>a</sup> *	35	0.063	368	0.98
PM.T2	65±0	225±20	43	0.048	304	0.99

Secondo il criterio esposto ad inizio del Par.4.1, il campione PM.T1 ha subito un decremento significativo a seguito del pretrattamento termico (-6%), mentre il campione PM.T2 non ha evidenziato differenze nella resa finale. Si riscontra invece un incremento nelle cinetiche di entrambi i campioni.

#### 4.1.2 CAMPIONE DI *CHLORELLA SOROKINIANA*: SET “CHL”

Le misure eseguite in questo caso sono state ampliate rispetto alla prova PM al fine di avere maggiori informazioni per valutare l'effetto che ogni pretrattamento ha avuto sul campione di *C. Sorokiniana* (set CHL).

In Tabella 4.5 si riportano i codici prova assegnati al campione composto da *C. sorokiniana* assegnati nel Par 3.2.3.

Tabella 4.5: Codici prova assegnati al set CHL composto da *C. sorokiniana*.

<b>Set</b>	<b>Codice prova</b>	<b>Campione algale</b>	<b>Pretrattamento</b>
CHL	CHL.NT	<i>C. sorokiniana</i>	Non pretrattato
CHL	CHL.T1	<i>C. sorokiniana</i>	70 °C, 1h
CHL	CHL.T2	<i>C. sorokiniana</i>	100 °C, 1h
CHL	CHL.A	<i>C. sorokiniana</i>	pH=2, 1h
CHL	CHL.B	<i>C. sorokiniana</i>	pH=11, 1h
CHL	CHL.S	<i>C. sorokiniana</i>	Sonicazione a 80 W, 1h

In Figura 4.7 sono mostrate le immagini ottenute tramite microscopio a fluorescenza del set CHL.

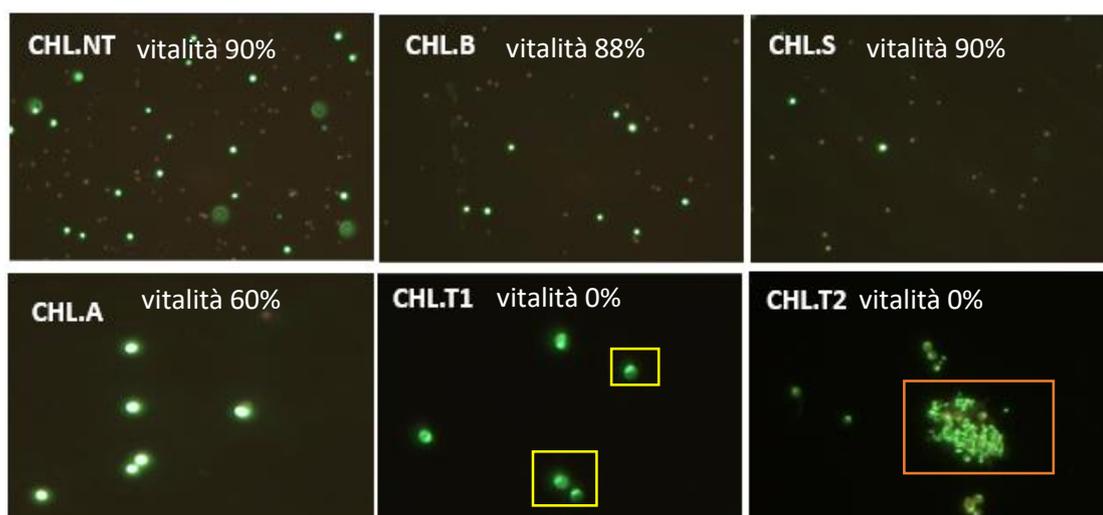


Figura 4.7: Immagini catturate tramite microscopio a fluorescenza del campione CHL. CHL.NT (20x). CHL.B (20x). CHL.S (20x). CHL.A (40x, ingrandimento). CHL.T1 (40x, ingrandimento). CHL.T2 (40x).

Dalle immagini in Figura 4.7 si può notare che CHL.NT presenta un'elevata percentuale di cellule vitali. CHL.B e CHL.S non mostrano differenze rispetto al campione CHL.NT né nella vitalità né nella struttura della cellula.

Il campione CHL.A, pur essendo contraddistinto da una vitalità inferiore rispetto al campione CHL.NT, presenta cellule integre. CHL.T1 presenta cellule prive di colorante o di un verde meno intenso (riquadri gialli). In CHL.T2 invece, oltre a cellule parzialmente svuotate, sono presenti degli agglomerati formati da detriti e cellule integre, come osservato precedentemente nel set PM (riquadro arancione).

La presenza di cellule svuotate in CHL.T1 e CHL.T2 può essere interpretata come evidenza della fuoriuscita di parte del contenuto cellulare, analogamente a quanto fatto con i campioni PM.T1 e PM.T2; sembra invece che il pretrattamento acido non abbia comportato una fuoriuscita di materiale ma solo una maggiore permeabilità della parete, che ha causato un decremento di vitalità.

Si riportano in Tabella 4.6 le misure su scala macroscopica eseguite per il set CHL.

Tabella 4.6 Misure eseguite su scala macroscopica del set CHL

<b>Codice prova</b>	<b><math>COD_{sol}</math> mg/L</b>	<b><math>TN_{sol}</math> mgN/L</b>	<b><math>OD_{picco, netto}</math></b>	<b><math>OD_{750 totale, netto}</math></b>	<b><math>OD_{680 filtrato}</math></b>	<b><math>OD_{260 filtrato}</math></b>
CHL.NT	73±7	<20	8.12±.3	0.41±2.0	0.01±0.0	0.35±0.0
CHL.T1	550±7	111.2	3.22±0.9 <sup>a</sup>	0.29±0.9 <sup>a</sup>	0.01±0.0	3.68±0.0 <sup>a</sup>
CHL.T2	376±25	98	7.04±0.6 <sup>b</sup> $\lambda$ picco= 670	0.37±0.5	0.07±0.0 <sup>a</sup>	4.93±0.0 <sup>b</sup>
CHL.A	121	<20	7.17±2.0	0.42±2.1	0.05±0.0 <sup>b</sup>	1.21±0.0 <sup>c</sup>
CHL.B	118	<20	7.28±0.4	0.41±0.8	0.01±0.0	0.46±0.0 <sup>d</sup>
CHL.S	144±44	<20	7.4±1.7	0.43±2.0	0.01±0.0	1.19±0.0 <sup>c</sup>

Ancora una volta i pretrattamenti termici sono caratterizzati da un ingente rilascio di materiale organico in soluzione; nella prova CHL.T2 è probabile l'effetto di volatilizzazione di una parte del

materiale organico, motivo per cui il valore del  $COD_{sol}$  risulta minore in questo campione rispetto al campione CHL.T1 (Solé-Bundó, et al., 2017). Tuttavia la maggior presenza di materiale nucleico in questo campione, evidenziata dalla misura OD260 sul filtrato, è un'evidenza del fatto che a 100 °C il campione subisce una maggiore solubilizzazione.

Diversamente dai pretrattamenti termici, i trattamenti chimici non confermano la stessa proporzionalità tra rilascio di azoto e di sostanza organica. È dunque probabile una differenza nell'azione degli altri pretrattamenti rispetto a quelli termici.

Le misure di assorbanza e gli spettri totali, riportati in Figura 4.7 mostrano che le temperature applicate hanno un effetto denaturante sui pigmenti clorofilliani: i picchi nello spettro che corrispondono all'assorbimento da parte della Clorofilla A infatti risultano non più visibili nell'intorno di 440 nm e spostati verso lunghezze d'onda minori nonché significativamente più bassi nell'intorno di 680 nm (Tabella 4.6). La Figura 4.8 inoltre evidenzia per il campione CHL.T2 un effetto di aumento notevole dell'assorbanza per lunghezze d'onda inferiori ai 470 nm. Non sono state invece rilevate differenze negli spettri dei campioni CHL.A, CHL.B e CHL.S i cui spettri sono stati omessi.

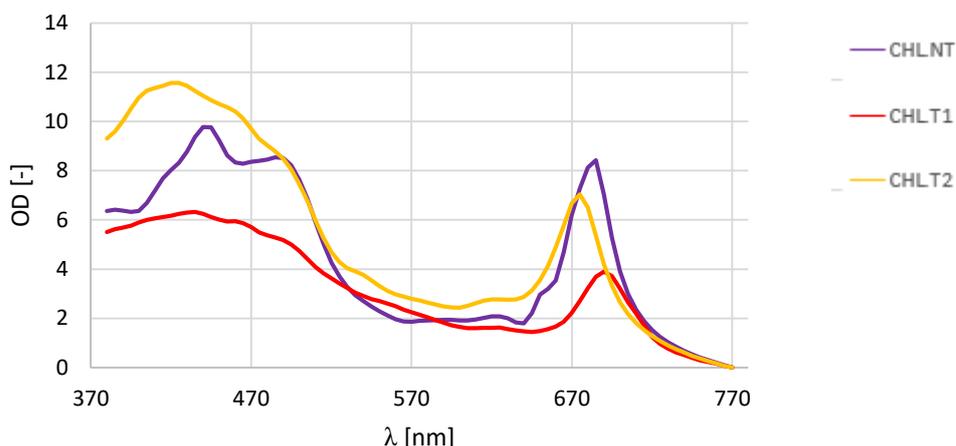


Figura 4.8: Spettri di assorbimento netti dei campioni CHL.NT, CHL.T1 e CHL.T2.

Le osservazioni eseguite tramite citofluorimetro forniscono ulteriori interessanti informazioni riguardo le modalità d'azione dei pretrattamenti eseguiti. In Figura 4.9 si riportano le variazioni osservate in termini di complessità della parete (espressa dal valore del Side Scatter, SSC) dei campioni CHL.T1 e CHL.T2. In Figura 4.10 ed in Figura 4.11 le variazioni in termini di autofluorescenza (misurate nel canale dell'APC) dei campioni CHL.T1, CHL.T2 e CHL.A. Gli stessi dati relativi ai campioni CHL.B e CHL.S sono stati omessi poiché non sono state rilevate differenze significative tra questi campioni ed il campione CHL.NT.

In Figura 4.9 è mostrata la collocazione del campione non trattato sul grafico FSC-SSC, individuata dall'area viola; l'area rossa e arancione denotano la collocazione del 99% del campione di biomassa algale rispettivamente di CHL.T1 e CHL.T2. Si noti che la variazione dell'SSC non è tanto evidente in termini assoluti quanto in termini di complessità media del campione, come mostrato dagli istogrammi. Ciò significa, secondo la definizione fornita ad inizio capitolo, che la maggior parte della popolazione algale a seguito dei pretrattamenti aumenta la complessità della propria parete ma che la mediana dei campioni ricade nell'intervallo di valori assunti dal campione CHL.NT.

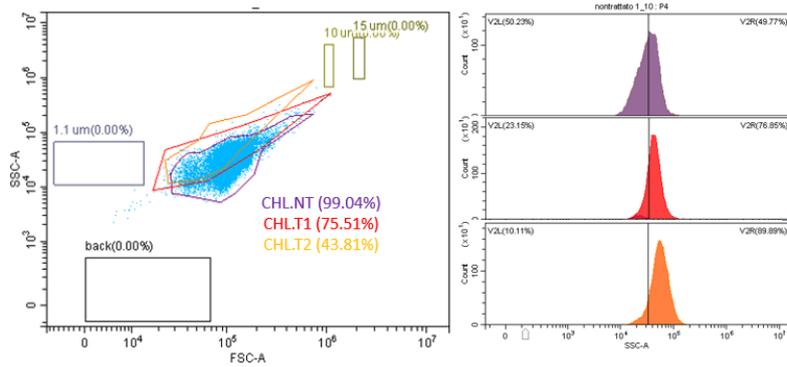


Figura 4.9: Variazioni in termini di SSC causate dai pretrattamenti termici rispetto al campione non trattato.

In Figura 4.10 è mostrata la collocazione del campione non trattato sul piano FSC-APC e le aree che delimitano la collocazione del 99% dei campioni CHL.T1 e CHL.T2, a destra invece sono rappresentati gli istogrammi dell'APC dei tre campioni.

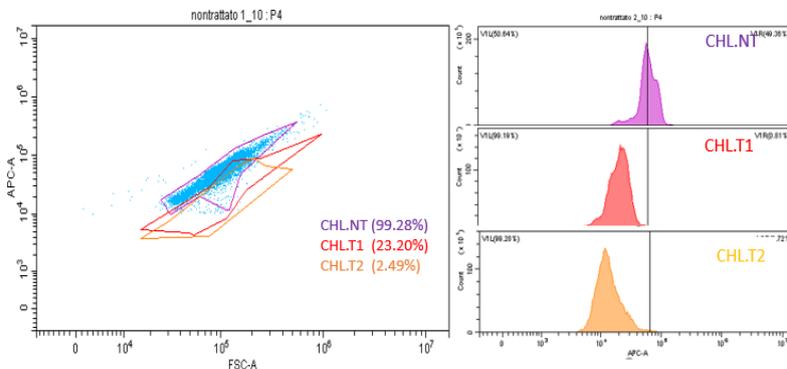


Figura 4.10: Variazioni in termini di APC causate dai pretrattamenti termici rispetto al campione non trattato.

I decrementi dell'APC rilevati a seguito dei pretrattamenti termici sono proporzionali alle temperature applicate ed il campione CHL.T2 mostra un decremento in termini assoluti.

In Figura 4.11 sono rappresentati i risultati ottenuti iniettando SYTOX Green Dye nel campione CHL.A. Grazie all'iniezione del tracciante son state individuate sul piano APC-FITC le cellule non vitali (rappresentate in verde in Figura 4.11) ed è stata esaminata la correlazione tra vitalità e APC del campione CHL.A.

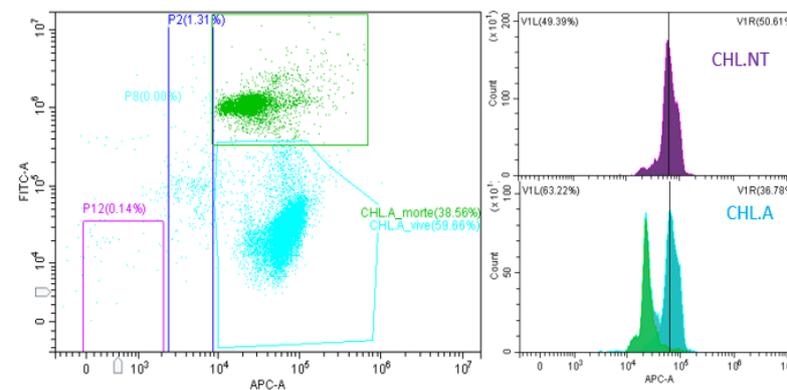


Figura 4.11: Correlazione tra mortalità e decremento dell'APC mostrata sul piano APC-FITC e come istogramma.

I grafici in Figura 4.11 mostrano una perfetta corrispondenza tra mortalità e decremento dell'APC. Il decremento dell'APC osservato nel campione CHL.T1 (Figura 4.10) è analogo a quello osservato nel campione CHL.A e dunque imputabile alla morte cellulare. Il campione CHL.T2 invece mostra un'ulteriore significativo decremento, la cui causa non può dunque essere attribuita alla morte cellulare. Si desume dunque che la morte cellulare comporta un decremento nei valori dell'APC e che altre cause concorrono nell'ulteriore decremento misurato per il campione CHL.T2.

In Tabella 4.7 sono mostrate le valutazioni sul numero di solidi totali e di alghe presenti ottenute grazie all'uso della citometria a flusso.

Tabella 4.7: Conte eseguite tramite citofluorimetro del set CHL.

Codice prova	densità alghe	alghe/eventi totali
	cell/mL	%
CHL.NT	1.21E+08	84.0
CHL.T1	1.14E+08	86.3
CHL.T2	1.11E+08	87.7
CHL.A	1.05E+08	86.3
CHL.B	1.50E+08	80.0
CHL.S	1.27E+08	76.9

Le conte mostrate in Tabella 4.7 (verificate anche tramite conte eseguite con microscopio ottico) mostrano variazioni troppo lievi per essere significative, tuttavia si osserva una tendenza all'aumento del rapporto alghe/eventi totali nei campioni CHL.T1, CHL.T2 e CHL.A che hanno mostrato differenze con il campione non trattato nelle misure di SSC e APC. I campioni CHL.B e CHL.S mostrano invece la tendenza opposta a diminuire il rapporto alghe/eventi totali, indice di una tendenza alla frammentazione.

In Figura 4.12 sono mostrati i risultati della prova di BMP in termini di produzione cumulata di biogas.

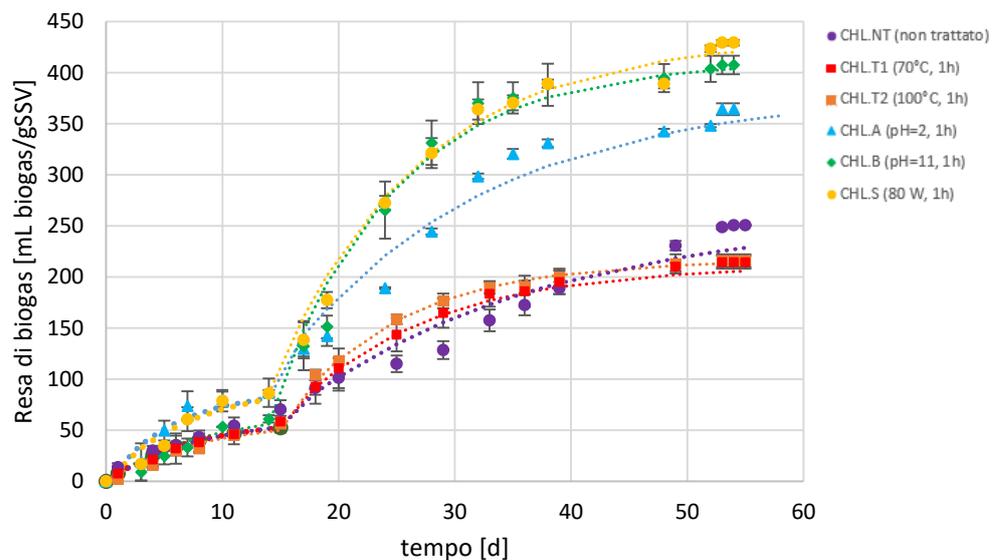


Figura 4.12: Andamento delle produzioni specifiche cumulate di biogas (linee continue) e curve interpolanti (linee tratteggiate).

Il set di prove CHL mostra in modo particolarmente evidente l'andamento a flessi tipico dei substrati particolati complessi e già osservato nel set PM. La modellizzazione del processo di digestione anaerobica tramite cinetica di ordine uno in questo caso risulta molto distante dall'andamento reale della degradazione del substrato, per questo motivo è stato deciso di utilizzare una funzione sviluppata empiricamente (Cap 3.3.2 Eq. 3.6) che prevede la presenza di due substrati con diversa biodegradabilità degradati in modo indipendente tra loro.

I risultati finali della prova di BMP sono riassunti in Tabella 4.8.

Tabella 4.8: Risultati finali del set CHL ottenuti nelle prove di BMP.

<b>Codice prova</b>	<b>CH<sub>4</sub> %</b>	<b>Resa di CH<sub>4</sub> mL CH<sub>4</sub>/gSSV</b>	<b>Biodegradabilità %</b>	<b>k d<sup>-1</sup></b>	<b>V<sub>∞</sub> mL CH<sub>4</sub>/gSSV</b>	<b>Coefficiente di determinazione R<sup>2</sup></b>
CHL.NT	61.9±0.1	155±0	29	k1=0.125 k2=0.045	V1=63 V2=261	0.95
CHL.T1	59.7±0.6	125±2 <sup>a*</sup>	25	k1=0.139 k2=0.082	V1=60 V2=211	0.99
CHL.T2	60.5±0.0	131±5 <sup>b*</sup>	24	k1=0.128 k2=0.099	V1=58 V2= 217	0.99
CHL.A	59.8±5.0	217±20 <sup>c*</sup>	41	k1=0.170 k2=0.057	V1=90 V2=386	0.98
CHL.B	64.3±0.1	262±9 <sup>d*</sup>	50	k1=0.120 k2=0.095	V1=68 V2=411	0.99
CHL.S	63.7±1.1	274±9 <sup>e*</sup>	52	k1=0.140 k2=0.080	V1=94 V2=434	0.99

I pretrattamenti efficaci sono risultati i pretrattamenti chimici (+40% e +69%) e la sonicazione (+77%). Questi hanno avuto effetto sulla resa finale ma non sulla biodisponibilità del materiale rapidamente biodegradabile, come dimostrano i valori del k1 dei campioni CHL.S e CHL.B che risultano prossimi a quelli di CHL.NT . I pretrattamenti termici al contrario hanno prodotto un decremento nella resa di metano (-15% e -19%) ma le cinetiche risultano accelerate.

Ulteriori approfondimenti sull'efficacia dei pretrattamenti di questo campione sono rimandati alla sezione "Discussione dei risultati".

#### 4.1.3 CAMPIONE DI *SCENEDESMUS OBLIQUUS*: SET "SC"

In Tabella 4.9 vengono riportati i codici assegnati nel Par. 3.2.3 al campione composto da *Scenedesmus obliquus*.

Tabella 4.9: Codici prova assegnati al campione composto da *Scenedesmus obliquus*.

<b>Set</b>	<b>Codice prova</b>	<b>Campione algale</b>	<b>Pretrattamento</b>	<b>Note</b>
SC	SC.NT	<i>S. obliquus</i>	Non pretrattato	
SC	SC.T1	<i>S. obliquus</i>	70 °C, 1h	Criterio di fine prova non rispettato
SC	SC.T2	<i>S. obliquus</i>	100 °C, 1h	
SC	SC.A	<i>S. obliquus</i>	pH=2, 1h	
SC	SC.B	<i>S. obliquus</i>	pH=11, 1h	
SC	SC.S	<i>S. obliquus</i>	Sonicazione a 80 W, 1h	
SC	SC.E	<i>S. obliquus</i>	Enzimatico	Criterio di fine prova non rispettato

In Figura 4.13 si riportano le immagini ottenute tramite osservazione dei campioni con microscopio a fluorescenza.

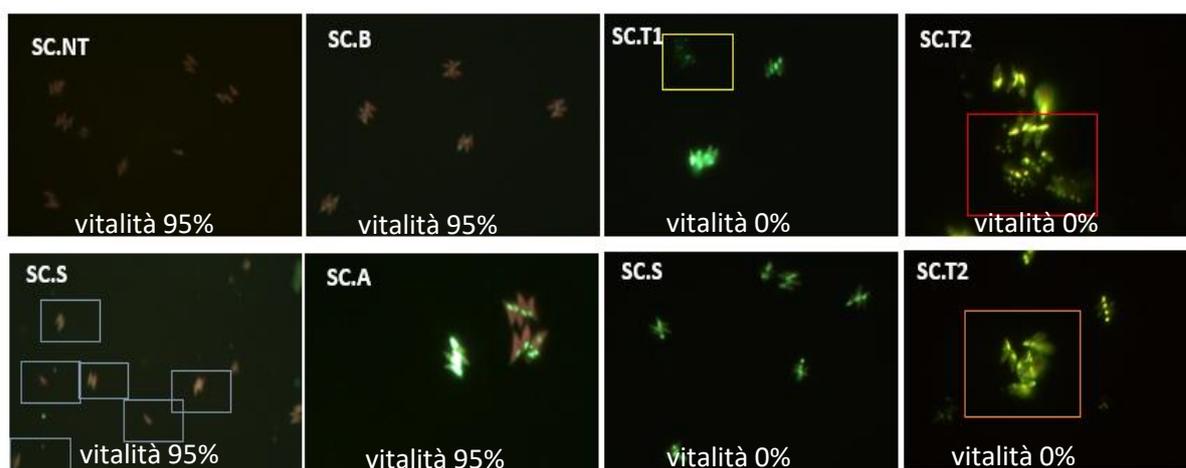


Figura 4.13: Fotografie del set SC scattate tramite fotocamera interna del microscopio a fluorescenza. SC.NT (40x). SC.B (40x). C: SC.T1 (40x). SC.T2 (40x, ingrandimento). SC.S (20x). SC.A (40x, ingrandimento). SC.E (40x).

Per quanto riguarda la vitalità, SC.T1, SC.T2, SC.E mostrano una vitalità residua dello 0%, mentre la vitalità degli altri tre campioni risulta invariata rispetto al campione non trattato. Il campione SC.S presenta un numero maggiore di alghe singole e in coppia, visibili all'interno dei riquadri blu, a differenza degli altri campioni in cui c'è una prevalenza di colonie formate da quattro cellule, anche se non vitali (SC.T1, SC.T2, SC.E).

SC.T1 presenta detriti sparsi, visibili all'interno del riquadro giallo. Nel campione SC.T2 si osserva un numero più cospicuo di detriti (box rosso) e la presenza di cellule agglomerate (box arancione), che anche in questo caso sono state interpretate come evidenza di una parziale idrolisi della parete e rilascio di materiale che interagisce elettrostaticamente con le cellule lisate (González-Fernández, et al., 2012).

SC.B e SC.A non mostrano differenze rispetto al campione SC.NT.

Il campione SC.E è caratterizzato da una vitalità prossima allo 0%. La parete risulta dunque permeabile, tuttavia non sono stati evidenziati rilasci di materiale né agglomerati di alghe parzialmente integre.

Se si escludono le modifiche nella vitalità, i campioni pretrattati non mostrano particolari differenze nei parametri morfologici rispetto al campione non trattato, in accordo con la grande resistenza della parete cellulare di questa specie algale (Stahelin & Pickett-Heaps, 1975).

La Tabella 4.10 riassume i principali risultati ottenuti su scala macroscopica.

Tabella 4.10: Misure per la valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti sul campione SC.

Codice prova	COD <sub>sol</sub> mg/l	TN <sub>sol</sub> mgN/l	OD <sub>picco totale</sub> -	OD <sub>680 filtrato</sub> -	OD <sub>750 totale</sub> -	OD <sub>260 filtrato</sub> -
SC.NT	85	<20	12.6±0.0	0.000±0.0	7.79±0.0	0.08±0.0
SC.T1	755	37.3	10.5±0.0 <sup>a</sup> λ picco = 670	0.003±0.01	7.23±0.0 <sup>a</sup>	1.37±0.1 <sup>a</sup>
SC.T2	594	29.6	10.2±0.2 <sup>a</sup> λ picco = 675	0.004±0.0	7.82±0.0	0.82±0.0 <sup>b</sup>
SC.A	239	<20	12.4±0.0	0.005±0.0	7.51±0.0	0.16±0.0
SC.B	135	<20	13.1±0.0	0.004±0.0	8.04±0.0	0.11±0.1
SC.S	155	23.2	13.8±0.0 <sup>b</sup>	0.008±0.0	8.21±0.0 <sup>b</sup>	0.17±0.1
SC.E	731	231.5	8.2±0.1 <sup>c</sup>	0.018±0.0 <sup>a</sup>	6.63±0.0 <sup>c</sup>	2.27±0.0 <sup>c</sup>

I pretrattamenti termici anche in questo caso sono caratterizzati da diminuzione e scostamento del picco di assorbanza della clorofilla A, rilascio di materiale organico in soluzione e di metaboliti interni.

Il pretrattamento enzimatico sembra avere un effetto simile ai pretrattamenti termici ma più marcato per quanto concerne la solubilizzazione del campione ed il rilascio di materiale nucleico in soluzione. A differenza dei pretrattamenti termici, nel campione SC.E si registra un aumento importante anche dell'OD680 su campione filtrato.

I pretrattamenti termici mostrano ancora una volta una proporzionalità tra presenza di azoto e COD in fase solubile

Si noti inoltre l'aumento significativo del campione SC.S nei valori di assorbanza ODpicco e OD750.

Gli spettri di assorbanza al netto del rumore di fondo mostrati in Figura 4.14 confermano l'ipotesi di una riduzione della capacità di assorbimento di SC.T1, SC.T2 ed SC.E, ipotizzata dalla riduzione dell'OD750 e dell'ODpicco. Al contrario si conferma la tendenza del campione SC.S ad incrementare le sue capacità di assorbimento.

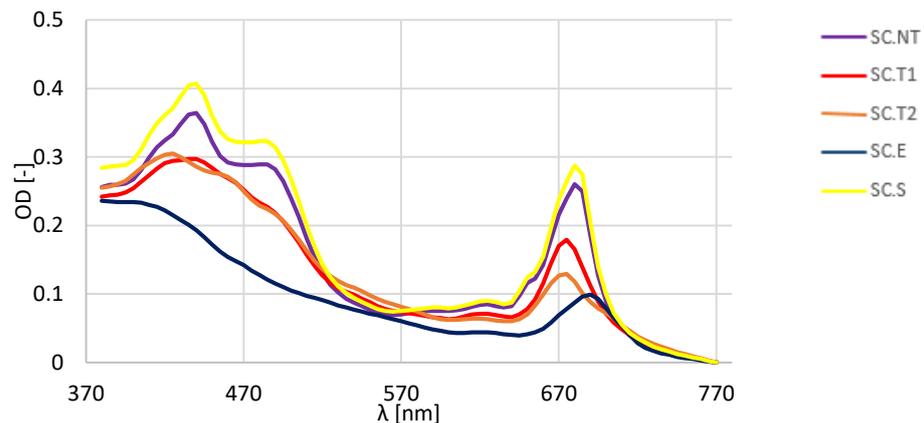


Figura 4.14: spettri di assorbimento netti dei campioni SC.NT, SC.T1, SC.T2, SC.S, SC.E

Le analisi eseguite tramite citofluorimetro hanno mostrato alcune differenze tra i campioni pretrattati rispetto ed il campione non trattato. La Figura 4.15 mostra le variazioni in termini di SSC sul piano FSC-SSC, le aree che individuano un campione sul piano FSC-SSC sono state individuate secondo la procedura esposta ad inizio capitolo.

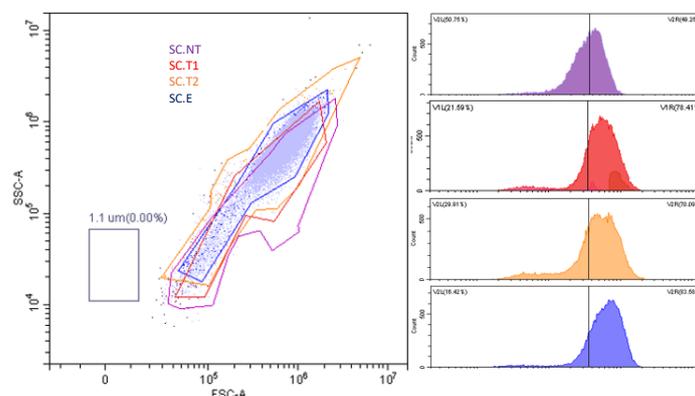


Figura 4.15:Variazioni in termini di SSC mostrate sul piano SSC-FSC e come istogrammi dei campioni SC.T1, SC.T2, SC.E.

Osservando le aree in Figura 4.15 e gli istogrammi relativi si nota una tendenza dei campioni a spostarsi verso valori maggiori dell'SSC e minori del FSC.

Anche in questo caso la variazione dell'SSC non è evidente in termini assoluti, i valori delle mediane dei campioni pretrattati infatti sono ancora compresi nell'intervallo di valori individuato dal campione SC.NT. Analogamente a quanto dedotto per il campione CHL si conclude che il danneggiamento della parete è avvenuto in maniera parziale. Ancora una volta, i pretrattamenti chimici e la sonicazione non hanno causato differenze significative nei valori dell'SSC.

La denaturazione dei pigmenti è osservabile non più dall'autofluorescenza dell'APC come per le *C. sorokiniana*, bensì dal valore della PerPC, come mostrato nella Figura 4.16, che mostra le variazioni in termini di densità di fluorescenza sul piano PerCP-FSC e come istogrammi.

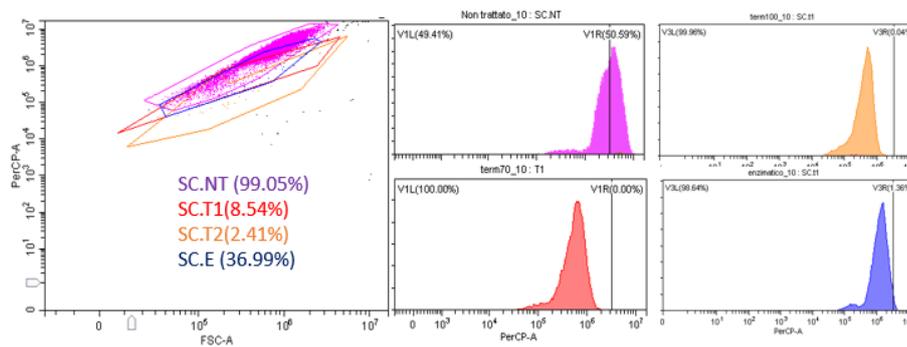


Figura 4.16: Variazioni significative in termini di autofluorescenza sul canale PerCP nel set di prove CHL. Le percentuali tra parentesi mostrano la porzione di campione non trattato compreso nelle aree che individuano il 99% dei campioni pretrattati.

Come nel set di prove CHL il decremento dell'autofluorescenza risulta proporzionale alla temperatura applicata. L'area che individua sul piano FSC-PerCP il 99% del campione SC.NT comprende il 37% del campione SC.E, l'8% del campione SC.T1 e solamente il 2% del campione SC.T2. A differenza di quanto accade nei parametri FSC ed SSC, i decrementi dell'autofluorescenza dei campioni sono apprezzabili in valore assoluto.

Nel campione sono state individuate due popolazioni differenti, distinte per dimensione. Una popolazione denominata "alghe piccole" di dimensioni comprese tra i 2-5  $\mu\text{m}$  e una popolazione di dimensioni superiori ai 6  $\mu\text{m}$ , denominata "alghe grandi". Quest'ultima popolazione rappresenta più del 90% del campione non trattato ed è probabilmente costituita da *S. obliquus* riunite in colonie comprese tra i due ed i quattro organismi, le "alghe piccole" di contro rappresentano le cellule singole.

Le differenze tra il campione SC.NT e SC.S in termini di dimensioni è mostrata in Figura 4.17.

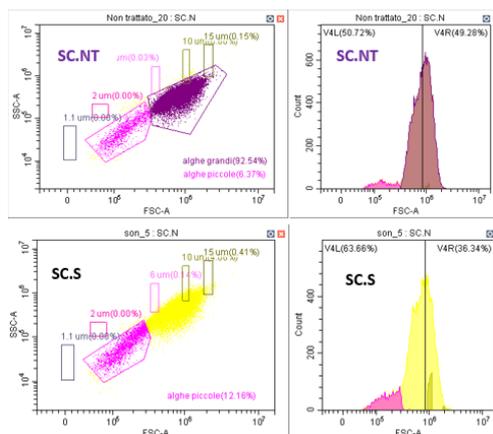


Figura 4.17: Confronto in termini di FSC tra il campione SC.NT e SC.S

Il campione SC.S in Figura 4.17 mostra un decremento significativo delle dimensioni medie del campione causato dall'incremento percentuale delle "alge piccole", già ipotizzabile dalle immagini in Figura 4.13 (riquadri blu). La popolazione "alge piccole", individuata dall'area in fucsia, passa dal 6% al 12% dell'intera popolazione algale. A questa variazione è inequivocabilmente legato il decremento del valore della mediana del parametro FSC (a destra in Figura 4.17).

I campioni SC.A, SC.B non evidenziano nessuna differenza significativa rispetto al campione SC.NT a livello di modifiche della parete o dei pigmenti presenti al loro interno.

In Tabella 4.11 sono mostrate le conte eseguite con il citofluorimetro.

Tabella 4.11: Conte eseguite tramite citofluorimetro per il campione SC.

<b>codice prova</b>	<b>densità eventi totali</b>	<b>alge/ eventi tot</b>	<b>grandi/ eventi tot</b>	<b>piccole/ eventi tot</b>	<b>piccole/ grandi</b>
	<b>cell/mL</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
SC.NT	1.5E+07	76.0	71.6	4.4	6.1
SC.T1	1.3E+07	79.6	74.8	5.0	6.6
SC.T2	1.4E+07	80.8 <sup>a</sup>	73.8	7.2	9.7 <sup>a</sup>
SC.A	1.3E+07	78.4	73.7	4.7	6.4
SC.B	1.5E+07	74.9	70	4.9	6.9
SC.S	1.8E+07 <sup>a</sup>	69.8 <sup>b</sup>	62.0 <sup>a</sup>	7.8 <sup>a</sup>	12.6 <sup>b</sup>
SC.E	1.5E+07	77.70	73.3	4.4	6.0

Le conte in Tabella 4.11 confermano le variazioni osservate in Figura 4.17 per il campione SC.S, inoltre si nota un incremento significativo di SC.S anche nella densità degli eventi totali. I dati suggeriscono dunque che sia avvenuta una disgregazione delle colonie tale da causare l'incremento delle "alge piccole" e che parte della biomassa algale abbia subito un'ulteriore frammentazione, motivo per cui la densità degli eventi totali ha subito un incremento e il rapporto tra alge e gli eventi totali ha invece subito un decremento.

Il campione SC.T2 mostra un incremento significativo della percentuale di alge rispetto ai solidi totali misurati, dovuto ad una diminuzione della densità di eventi totali.

La Figura 4.18 mostra l'andamento della resa specifica di biogas misurata nel corso della prova di BMP del campione SC.

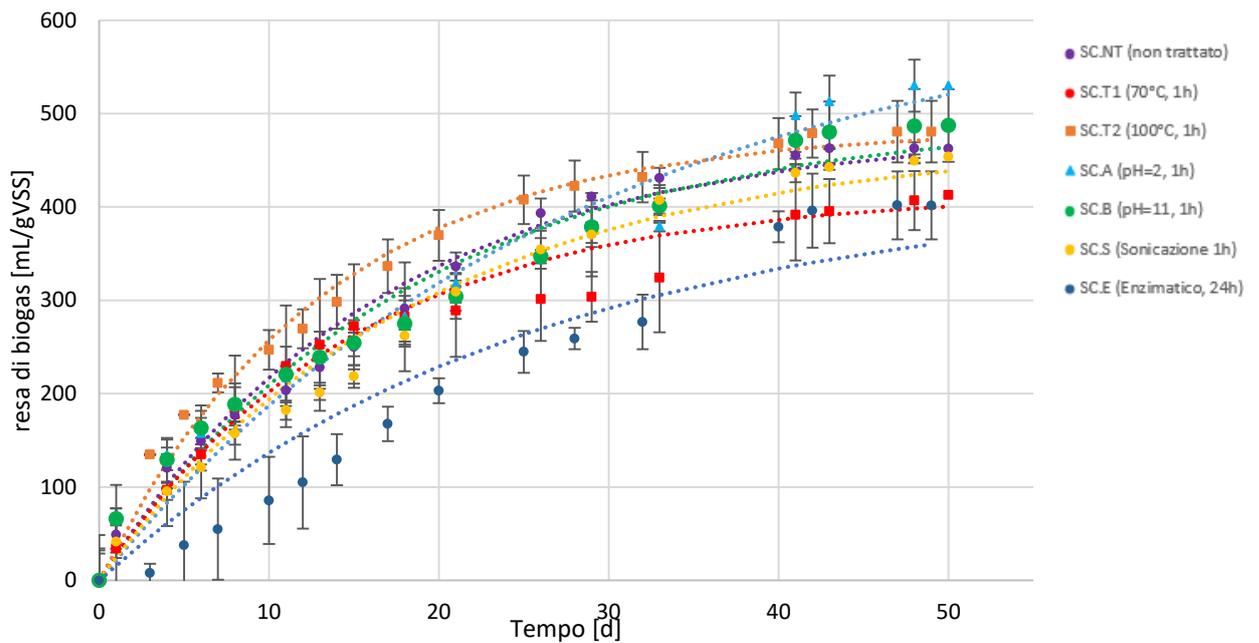


Figura 4.18: Produzione specifica cumulata di biogas della prova di BMP del campione SC.

La produzione di biogas dei campioni è stata stimata attraverso il modello di pseudo primo ordine poiché, globalmente, è risultato interpretare meglio i dati sperimentali. Tuttavia i campioni SC.E e SC.T1 mostrano diversi flessi nell'andamento della produzione di biogas la cui natura verrà discussa nel paragrafo successivo.

I risultati ottenuti a fine prova sono mostrati in Tabella 4.12.

Tabella 4.12: Risultati finali della prova di BMP del set SC.

Pretrattamento	CH <sub>4</sub> nel biogas %	Resa CH <sub>4</sub> mL CH <sub>4</sub> /gSSV	Biodegradabilità %	k d <sup>-1</sup>	V <sup>∞</sup> mLbiogas /gSSV	Coefficiente di determinazione R <sup>2</sup>
SC.NT	62±0	297±3	56	0.060	481	0.98
SC.T1	62±5	227±1 <sup>a*</sup>	43	0.067	415	0.96
SC.T2	62±1	291±20	55	0.070	484	0.99
SC.A	61±1	310±7 <sup>b</sup>	57	0.035	626	0.98
SC.B	64±2	294±21	53	0.055	496	0.97
SC.S	60±1	290±26	55	0.05	471	0.98
SC.E	62±1	235±14 <sup>a*</sup>	44	0.04	422	0.92

I risultati in tabella evidenziano il decremento significativo dei campioni SC.T1 (-24%) e SC.E (-21%) rispetto al campione SC.NT ed il lieve incremento significativo del campione SC.A (+4%).

#### 4.1.4 CAMPIONE DI *EUGLENA GRACILIS*: SET "EU"

Si riportano in Tabella 4.13 i codici assegnati al campione composto da *Euglena gracilis*.

Tabella 4.13: Codici prova assegnati al campione EU.

Set	Codice prova	Campione algale	Pretrattamento	Note
EU	EU.NT	<i>E. gracilis</i>	Non pretrattato	Criterio di fine prova non rispettato

EU	EU.T1	<i>E. gracilis</i>	70 °C, 1h	Criterio di fine prova non rispettato
EU	EU.T2	<i>E. gracilis</i>	100 °C, 1h	Criterio di fine prova non rispettato
EU	EU.A	<i>E. gracilis</i>	pH=2, 1h	Criterio di fine prova non rispettato
EU	EU.B	<i>E. gracilis</i>	pH=11, 1h	Criterio di fine prova non rispettato

In Figura 4.19 vengono mostrate le immagini ottenute tramite osservazione con microscopio ottico, in questo caso più esplicative rispetto a quelle ottenute con microscopio a fluorescenza

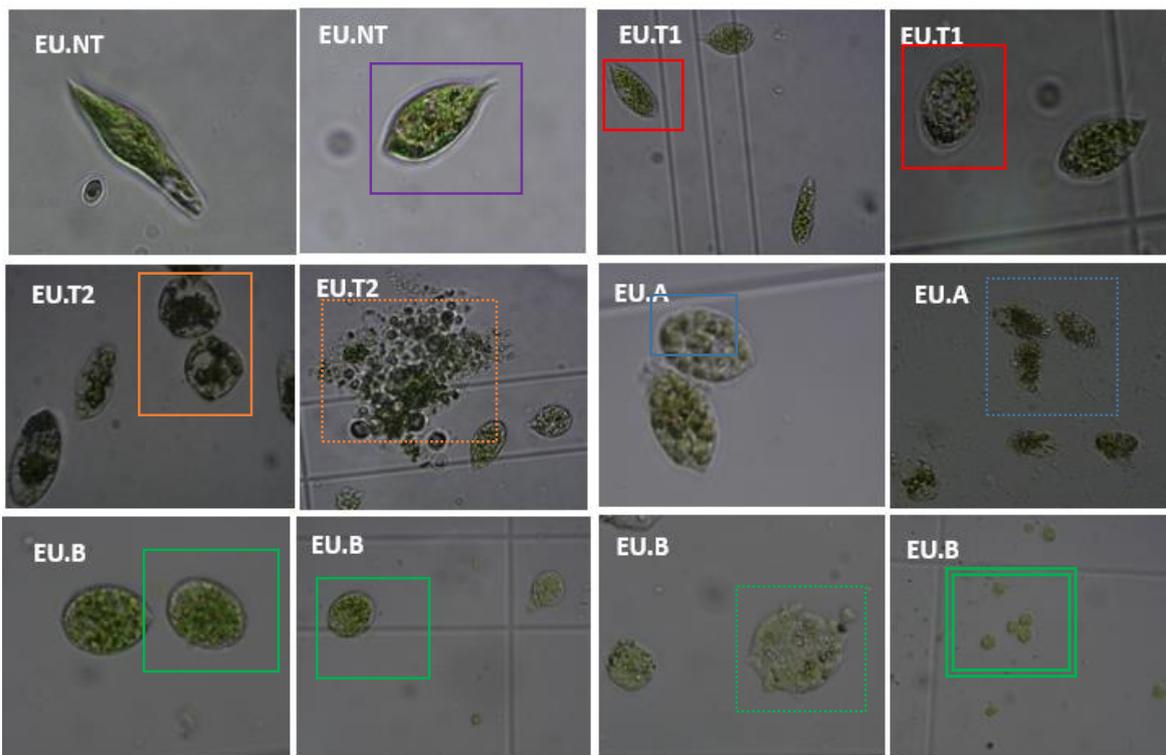


Figura 4.19: Immagini scattate tramite fotocamera del microscopio ottica del campione utilizzato per la prova BMP del sett EU.: EU.NT (100x). EU.T1 (40x). EU.T2. EU.A (40x, 40x). M,N: EU.B (40x, 40x, 100x, 40x).

Il contenuto delle cellule del campione EU.NT appare omogeneo e la parete priva di rugosità (box viola). Le cellule del campione EU.T1 appaiono parzialmente svuotate e dai contorni più scabri (box rossi). L'effetto dei pretrattamenti sui campioni EU.T2 e EU.A è ancora più acuto: le cellule appaiono visibilmente svuotate del loro contenuto (box arancione). Nel campione EU.T2 si osservano numerosi agglomerati di materiale cellulare (box arancione tratteggiato), nel campione EU.A le cellule appaiono meno svuotate del loro contenuto (box azzurro), tuttavia la parete acquisisce scabrezza e diventa talmente sottile da renderne difficile l'identificazione (box azzurro tratteggiato). Nel campione EU.B invece l'aspetto delle cellule che hanno mantenuto le loro dimensioni originali è simile a quello del campione EU.NT, sia per quanto riguarda l'omogeneità del materiale interno, sia per quanto riguarda l'aspetto della parete e il colore brillante delle cellule (box in verde), tuttavia si notano cellule di dimensioni minori, comprese tra i 3-6  $\mu\text{m}$  (la misura approssimativa della dimensione è stata possibile grazie alla presenza del reticolo della camera di Burkner), visibilmente danneggiate (box verde tratteggiato), inoltre si rileva la presenza di materiale cellulare fuoriuscito contenente pigmento di dimensioni approssimativamente pari a 0.5  $\mu\text{m}$ , probabilmente cloroplasti che si sono mantenuti integri (box verde doppia linea).

I dati sulla vitalità sono stati omessi in quanto anche il campione non trattato si è rivelato non vitale, nonostante le modalità di centrifugazione e conservazione siano state le stesse adottate per gli altri campioni. La morte cellulare è dunque ascrivibile ad una minor resistenza che contraddistingue questa specie algale.

Le misure ottenute su scala macroscopica sono mostrate in Tabella 4.14.

Tabella 4.14: Misure a scala macroscopica eseguite sui campioni EU.

Codice prova	COD <sub>sol</sub> mgO <sub>2</sub> /l	TN <sub>sol</sub> mgN/l	OD <sub>picco totale, netto</sub> -	OD <sub>680 filtrato</sub> -	OD <sub>750 totale</sub> -	OD <sub>260 filtrato</sub> -
EU.NT	745	87	1.75±0.05 λ picco = 675 nm	0.02±0.00	4.61±0.07	2.00±0.00
EU.T1	1190	88	0.94±0.02 <sup>a</sup> λ picco = 670	0.07±0.00 <sup>a</sup>	3.61±0.01 <sup>a</sup>	2.60±0.01 <sup>b</sup>
EU.T2	2340	89	0.97±0.19 <sup>a</sup> λ picco = 670	0.04±0.00	4.13±0.11 <sup>b</sup>	6.00±0.0 <sup>c</sup>
EU.A	1296	93	1.2±0.02 <sup>a</sup> λ picco = 675 nm	0.12±0.09 <sup>a</sup>	3.22±0.09 <sup>c</sup>	3.41±0.01 <sup>d</sup>
EU.B	1528	155	3.29±0.11 <sup>b</sup> λ picco = 675 nm	0.20±0.01 <sup>b</sup>	4.45±0.11	3.55±0.00 <sup>d</sup>

Nonostante l'alto valore di COD solubile presente sul campione non trattato, tutti i pretrattamenti sono caratterizzati da un notevole ulteriore rilascio di materiale organico in parte ascrivibile a materiale intracellulare, come mostrano gli alti valori di OD260. In questo caso non c'è proporzionalità tra rilascio di COD e TN, il quale si mantiene prossimo ai valori del campione EU.NT. Il campione EU.B è caratterizzato da un grande rilascio di azoto in forma solubile.

In Figura 4.20 sono mostrate le differenze sul piano FSC-SSC dei campioni pretrattati rispetto al campione non trattato ed i relativi istogrammi.

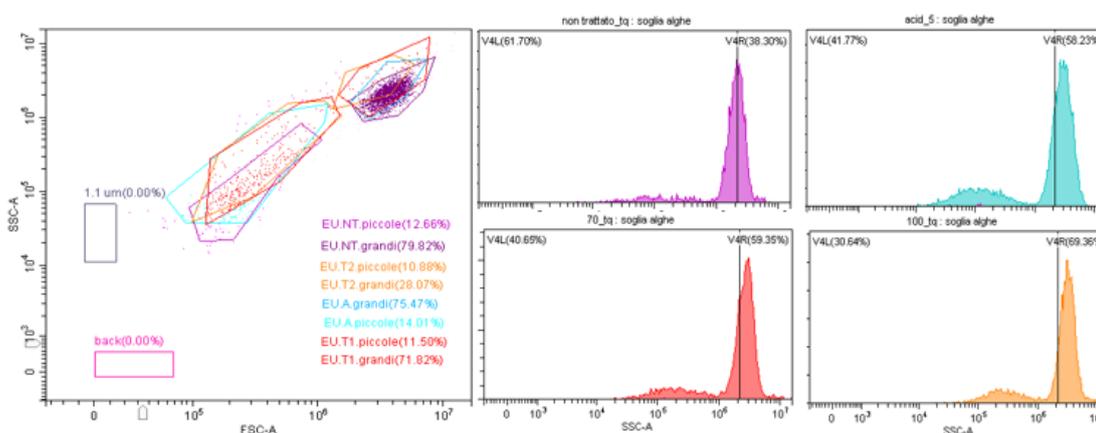


Figura 4.20: Variazioni nel piano FSC-SSC del campione EU.

Il campione di controllo EU.NT è caratterizzato da due popolazioni algali, quella prevalente è stata denominata "alghe grandi", ha dimensioni di circa 10-15 µm e corrisponde a circa l'88% del campione algale considerato. La popolazione "alghe piccole" costituisce il 12% dell'intera popolazione algale, ha dimensioni comprese tra i 2-6 µm ed ha valori di APC inferiori. Si ritiene improbabile la presenza di una contaminazione da parte di altre specie algali per via delle frequenti osservazioni al microscopio avvenute in fase di coltivazione, si desume dunque che la popolazione "alghe piccole" sia costituita da *E. gracilis* di dimensioni inferiori.

I campioni mostrano la tendenza già evidenziata nelle altre prove a spostarsi verso valori di SSC maggiori e FSC leggermente inferiori. I campioni EU.T1 ed EU.A continuano in gran parte ad essere compresi nelle aree che individuano il 95% del campione EU.NT, mentre il campione EU.T2 mostra differenze in termini assoluti nel valore del SSC. Il campione EU.B non mostra alcuna variazione significativa nei valori del SSC.

In Figura 4.21 si riportano gli istogrammi relativi all'APC osservati per tutti e cinque i campioni.

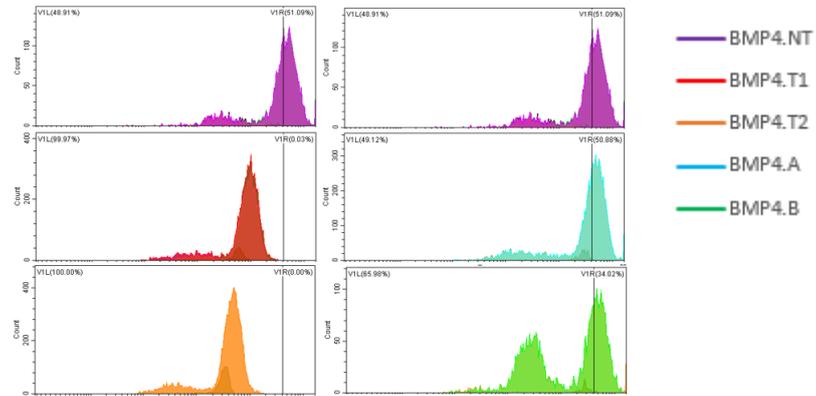


Figura 4.21: istogrammi PerCP- densità cellulare dei campioni della prova EU.

Tutti i canali di autofluorescenza considerati in questo caso hanno mostrato differenze significative tra i campioni pretrattati e il campione non trattato. I pretrattamenti termici mostrano nuovamente un decremento dell'intensità di autofluorescenza dei pigmenti contenuti all'interno delle cellule molto accentuati e proporzionali alla temperatura applicata. Il campione EU.B mostra un aumento notevole del secondo picco di autofluorescenza ma non un decremento nell'intensità del primo. Il campione EU.A non mostra differenze significative.

Sono stati misurati gli spettri di assorbimento del campione totale e, per valutare la presenza di pigmenti in fase solubile, sono stati misurati anche gli spettri di assorbanza sul campione filtrato, mostrati di seguito in Figura 4.22.

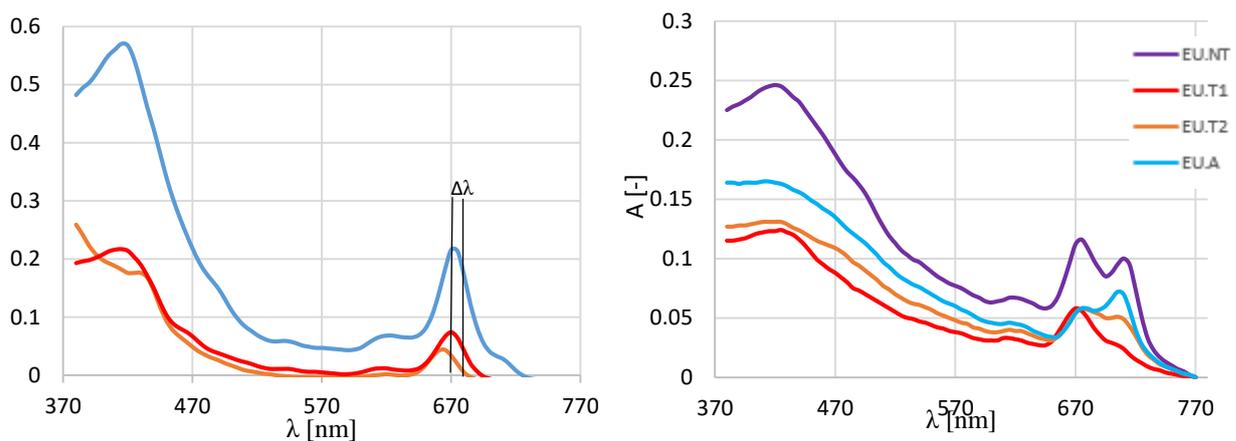


Figura 4.22: Spettri di assorbimento sul campione filtrato (A) delle prove EU.T1, EU.T2, EU.A e sul campione totale (B).

Dagli spettri in Figura 4.22 si evince una minor presenza di pigmenti sia in fase solubile che sul campione totale nei campioni pretrattati termicamente rispetto al campione EU.A. Si noti inoltre lo scostamento dei picchi di assorbimento in fase solubile di tutti i campioni.

Si evidenzia nello spettro totale un secondo picco per lunghezze d'onda prossime ai 715 nm ascrivibili alla presenza dell'eritricina nei fotosistemi di *E. gracilis*.

La variazione del rapporto tra alghe di dimensioni diverse e tra popolazioni algali individuate ed eventi totali a seguito di ogni pretrattamento è mostrata in Tabella 4.15.

Tabella 4.15: Conte degli eventi totali e delle popolazioni rilevate nei campioni EU tramite citofluorimetro.

Codice prova	densità eventi totali cell/mL	alghe totali / eventi totali %	alghe grandi/eventi totali %	alghe piccole/eventi tot %
EU.NT	1.4E+06	9.3	8.03	1.2
EU.T1	5.4E+05 <sup>a</sup>	23.3 <sup>a</sup>	19.6 <sup>a</sup>	3.6
EU.T2	3.5E+05 <sup>a</sup>	23.8 <sup>a</sup>	19.5 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>
EU.A	4.5E+05 <sup>a</sup>	26.4 <sup>a</sup>	22.6 <sup>a</sup>	3.8 <sup>a</sup>
EU.B	8.2E+05 <sup>b</sup>	17.7	9.7	8.0 <sup>b</sup>

Come si apprezza dal decremento significativo della densità degli eventi totali, tutti i pretrattamenti hanno effetto sulla solubilizzazione del particolato di fondo, con una riduzione di eventi totali meno marcata per il campione EU.B. La tendenza alla solubilizzazione ha effetti anche sull'aumento percentuale delle alghe nel campione. Si noti invece la differente azione del pretrattamento basico che non produce un incremento significativo nelle alghe totali, bensì un netto incremento nelle "alghe piccole" rispetto alle "alghe grandi".

I risultati ottenuti dalle prove di BMP del set EU sono mostrati in Figura 4.23.

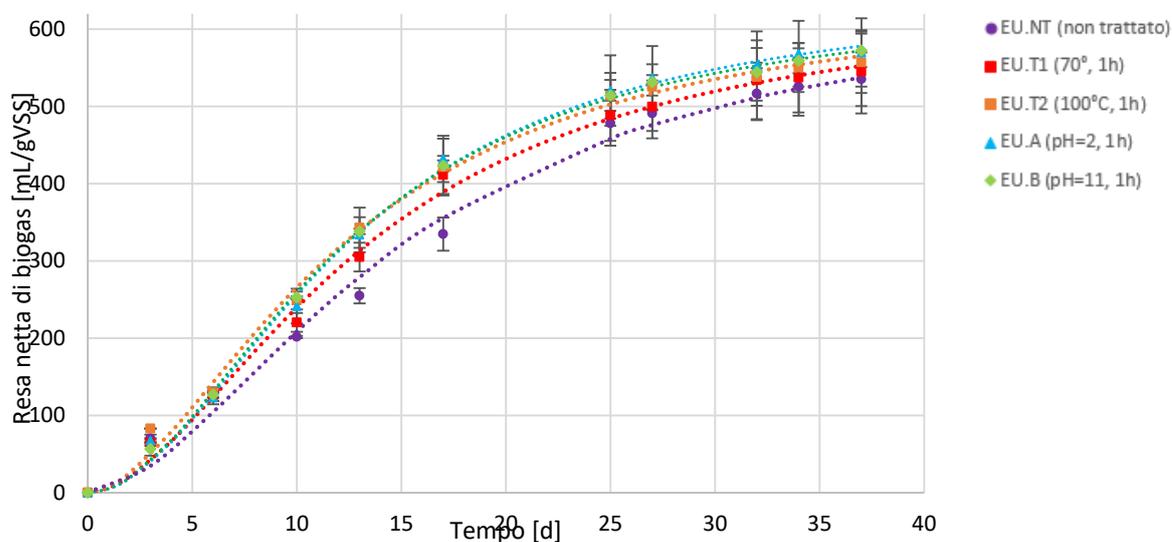


Figura 4.23: Andamento della resa netta cumulata di biogas nelle prove di BMP del set EU.

Anche in questo caso la cinetica presenta dei flessi, il modello più adeguato per descrivere globalmente la cinetica del set EU è risultato il modello *ad esse* descritto dall'Eq. 3.7, Par. 3.3.2, il quale interpreta molto bene i flessi visibili nei dati sperimentali.

In Tabella 4.16 sono riportati i risultati finali ottenuti nella prova di BMP del set EU.

Tabella 4.16: Risultati finali delle prove di BMP del set EU

<b>Pretrattamento</b>	<b>CH<sub>4</sub> nel biogas</b>	<b>Resa CH<sub>4</sub></b>	<b>Biodegradabilità</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>V<sub>∞</sub></b>	<b>V<sub>ultimo</sub></b>	<b>Coefficiente di determinazione R<sup>2</sup></b>
	<b>%</b>	<b>mL/gSSV</b>	<b>%</b>	<b>d</b>	<b>-</b>	<b>mL biogas/gSSV</b>	<b>mL biogas/gSSV</b>	
EU.NT	67±1	306±5	58	15.29	1.77	620	535	0.99
EU.T1	65±1	344±40	65	13.34	1.79	641	545	0.99
EU.T2	65±0	354±29 <sup>a</sup> *	67	12.26	1.76	645	557	0.99
EU.A	67±1	368±29 <sup>b</sup> *	70	12.49	1.92	650	570	0.99
EU.B	67±0	371±12 <sup>c</sup> *	70	12.26	1.90	642	572	0.99

Ancora una volta il pretrattamento termico a 70° non ha portato ad incrementi giudicati significativi, tutti gli altri pretrattamenti hanno invece avuto un impatto positivo sulla resa finale di metano, gli incrementi sono compresi tra +13% e +17%. Si noti inoltre dalla Tabella 4.13 che il criterio di fine prova non è stato rispettato in nessuno dei campioni per cui i valori finali ottenuti non possono essere considerati i valori di BMP finali, come dimostrano anche i valori di V<sub>∞</sub> che predicono un volume finale di biogas sensibilmente maggiore rispetto al V<sub>ultimo</sub> misurato.

Si noti inoltre l'elevata biodegradabilità ottenuta in tutte le prove.

## 4.2 PROVE DI PRETRATTAMENTO: DISCUSSIONE

### 4.2.1 SIGNIFICATIVITÀ DELLE MISURE UTILIZZATE

Il protocollo eseguito ha previsto la valutazione dell'effetto dei pretrattamenti su diverse biomasse algali. Scopo del protocollo è stato quello di indagare il meccanismo di azione dei pretrattamenti e di trovare un set di parametri in grado di prevedere l'effetto del pretrattamento in termini di resa di metano.

Di seguito verrà analizzata l'informazione restituita da ogni misura effettuata e investigata la presenza di misure che forniscono la medesima informazione e che dunque risultano superflue e possono essere eliminate dal protocollo in un'ottica di riduzione di tempi e costi di indagine.

Le misure sono state elaborate in termini di incrementi percentuali del campione rispetto al corrispettivo campione non trattato, a titolo di esempio si consideri la misura "% COD<sub>sol</sub>" (4.1).

$$\% \text{ COD}_{sol} = \frac{\text{COD}_{sol,pret} - \text{COD}_{sol,NT}}{\text{COD}_{sol,NT}} * 100 \quad 4.1$$

#### *Rilascio di materiale organico e di metaboliti*

La misura del COD<sub>sol</sub> e l'OD260 risultano in ottima corrispondenza, è plausibile infatti che all'aumentare della sostanza organica rilasciata aumenti il contributo dei metaboliti interni. Nel grafico in Figura 4.24 sono stati plottati gli incrementi risultati significativi delle due misure.

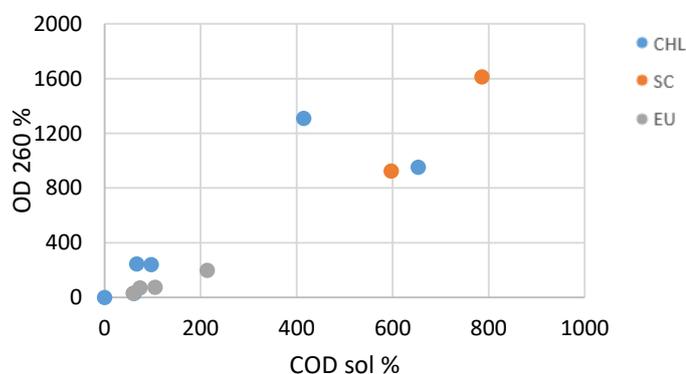


Figura 4.24: Incremento % di OD260 in funzione dell'incremento % di CODsol.

L'OD680 sul filtrato è un parametro usato spesso per quantificare la presenza di pigmenti fotosintetici in soluzione (Gerde, et al., 2012) e può essere dunque utilizzato come indice di rilascio di metaboliti interni. Tuttavia quando il campione subisce un pretrattamento termico subentrano fenomeni di denaturazione che riducono la capacità di assorbimento dei pigmenti fotosintetici. Per i campioni non trattati termicamente, si nota una correlazione tra OD680 sul filtrato e OD260 sul filtrato, come mostra il grafico in Figura 4.25 in cui sono state considerate solo le coppie di valori risultate entrambe significativamente differenti dal campione non trattato.

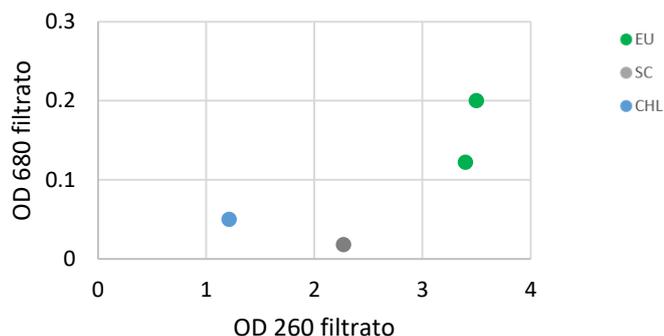


Figura 4.25: Correlazione tra OD680 e OD260 sul filtrato nei campioni pretrattati non termicamente

Si conclude dunque che per i pretrattamenti che non agiscono sulla denaturazione dei pigmenti clorofilliani, l'OD680 sul filtrato è un buon indicatore di rilascio pigmenti, i quali denotano la presenza di materiale cellulare fuoriuscito. Tale misura però non può essere applicata allo stesso modo per i pretrattamenti termici.

L'osservazione del campione tramite microscopio a fluorescenza, utilizzato per rilevare rilascio di materiale intracellulare, si è rivelato efficace solo in presenza di agglomerati composti da detriti e cellule parzialmente danneggiate, in assenza di questi effetti, come nel campione SC.E, l'osservazione al microscopio non consente di osservare il rilascio di materiale intracellulare, valutabile invece tramite le misure sopra esposte. Anche l'osservazione di cellule parzialmente prive del loro contenuto risulta di scarsa affidabilità per via del decadimento del tracciante e delle dimensioni ridotte delle cellule. Solo per il set EU, in cui le cellule sono molto grandi e gli effetti dei pretrattamenti molto accentuati, l'osservazione al microscopio permette valutazioni robuste.

#### Rapporto TN/COD<sub>sol</sub>

I risultati esposti nel Cap.4.1 hanno mostrato una grande variabilità nella solubilizzazione dell'azoto e nel rapporto TN/COD<sub>sol</sub>.

Nelle alghe verdi i pretrattamenti termici hanno mostrato sempre un fattore di proporzionalità tra COD<sub>sol</sub> e TN, come mostrato in Figura 4.26.

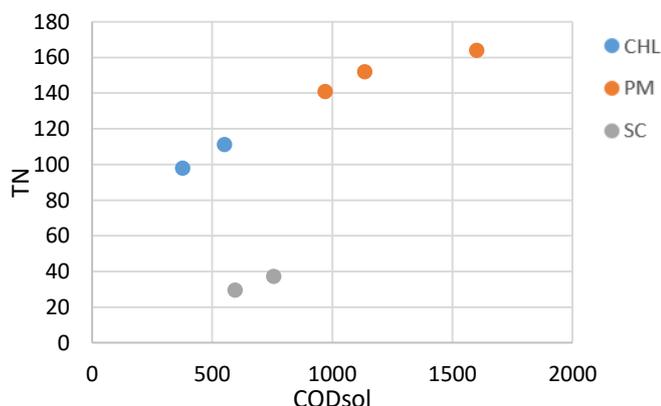


Figura 4.26: rilascio di azoto totale in funzione del rilascio di CODsol nei campioni pretrattati termicamente PM, SC, CHL

La retta di regressione costruita con i dati considerati in Figura 4.26 indica un rapporto  $\Delta TN/\Delta COD$  specifico dei pretrattamenti termici delle alghe verdi di 0.085.

Per stimare l'origine dell'azoto solubilizzato è stata considerata la formula bruta che descrive la composizione media delle proteine presenti nell'alga *Chlorella vulgaris*  $C_6H_{13.1}O_1N_{0.6}$ , empiricamente stimata da Heaven et al (Heaven, et al., 2011) ed è stato applicato il procedimento descritto dall'Eq. 4.2.

$$\left[ \frac{gN}{gCOD} \right]_{prot} = \frac{0.6 \frac{gN}{gSV_{prot}}}{2.78 \frac{gCOD}{gSV_{prot}}} \quad 4.2$$

In cui:

- ❖ 0.6 gN/gSV<sub>prot</sub> è la percentuale media dell'azoto presente nelle proteine secondo la formula stechiometrica
- ❖ 2.78 g COD/gSV<sub>prot</sub> è il fattore di conversione della proteina considerata (Heaven, et al., 2011)

Applicando l'Eq. 4.2, il rapporto N/COD proprio della proteine presenti nelle alghe verdi risulta pari a 0.082, valore molto prossimo al rapporto  $\Delta TN/\Delta COD$  stimato dai dati sperimentali in Figura 4.26. Si può dunque affermare che i pretrattamenti termici agiscono preferenzialmente sulle proteine della biomassa algale. Poiché la parete di queste alghe è costituita principalmente da carboidrati (Abo-Shady, et al., 1993) si può concludere che la provenienza del materiale proteico è materiale intracellulare.

Gli altri pretrattamenti non mostrano una correlazione tra TN e COD<sub>sol</sub>. In mancanza dei valori puntuali di TN di buona parte dei campioni non è possibile avanzare alcuna ipotesi sulla natura del materiale rilasciato. Si può però desumere un'azione diversa rispetto ai pretrattamenti termici proprio a partire dall'assenza della correlazione mostrata invece dai pretrattamenti termici.

Il campione EU non mostra alcun incremento nel TN all'aumentare del COD<sub>sol</sub>, eccezion fatta per la prova EU.B, il cui rapporto  $\Delta TN/\Delta COD_{sol}$  risulta pari a 0.086. Se si considera la natura glicoproteica della parete si può desumere che questo pretrattamento ha avuto un'azione preferenziale nei confronti della solubilizzazione della parete, mentre la solubilizzazione negli altri campioni ha agito nei confronti di componenti non proteiche.

#### *Variazioni dei solidi presenti nel campione*

Le conte eseguite attraverso il citofluorimetro e la rappresentazione del campione sul piano FSC-SSC hanno permesso di conoscere in maniera approfondita la composizione dei solidi, i quali sono stati suddivisi di volta in volta in popolazioni algali, detriti di fondo e comunità batterica, qualora presente. La solubilizzazione del detrito di fondo avvenuta nelle prove EU.T1, EU.T2, EU.A, SC.T2 e in misura meno marcata nelle prove CHL.T2 e CHL.A espressa dalla riduzione della densità degli eventi totali e/o dall'aumento percentuale delle alghe presenti (Tabella 4.7, Tabella 4.11, Tabella 4.15), trova buona corrispondenza con i decrementi dell'OD750 sul campione totale, che misura il livello di torbidità del campione (Spiden, et al., 2013). La buona corrispondenza tra la misura della densità degli eventi totali e l'OD750 è evidenziata dal grafico in Figura 4.27, in cui sono riportate le variazioni percentuali delle due misure significativamente differenti rispetto al campione non trattato.

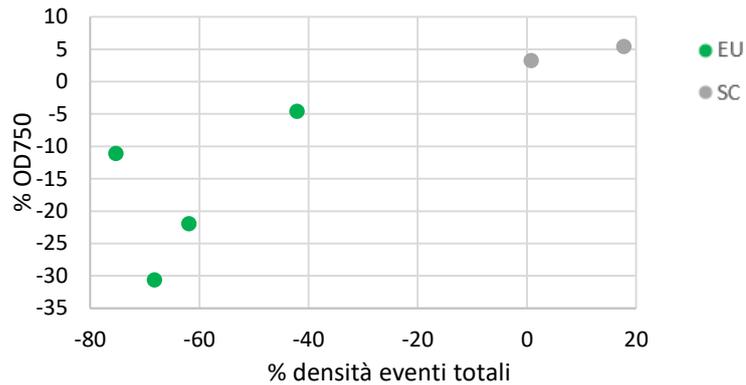


Figura 4.27: Variazione dell'OD750 in funzione della densità degli eventi.

La retta interpolante costruita a partire dai dati mostrati in Figura 4.27 indica un rapporto tra le due misure pari a 0.31 e un  $R^2$  pari a 0.70. I decrementi delle due misure indicano solubilizzazione del materiale di fondo e gli incrementi sono associati ad un aumento dei solidi in soluzione e dunque alla frammentazione dei solidi presenti.

La frammentazione del campione e la riduzione delle dimensioni della biomassa algale si esprime anche in un decremento nella percentuale di alghe rispetto ai solidi totali ed in un incremento nella percentuale di alghe dalle dimensioni inferiori, come accade per il campione SC.S (Tabella 4.11). Alla frammentazione del particolato è anche associato l'aumento dell'ODpicco sul campione tal quale, come accade per il campione EU.B e SC.S ed in misura meno marcata per il campione SC.B in cui l'impatto del pretrattamento non è sufficiente affinché la misura dell'OD680 mostri una differenza significativa. La corrispondenza tra la riduzione delle dimensioni della biomassa algale e l'incremento dell'OD680 nei tre campioni sopra citati è descritta in Figura 4.28.

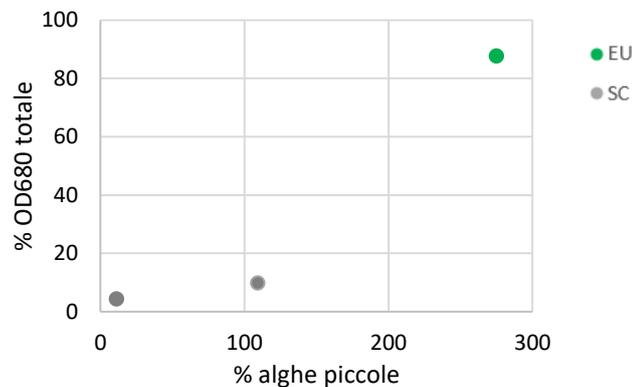


Figura 4.28: correlazione tra riduzione delle dimensioni e incremento dell'OD 680.

L'aumento dell'ODpicco nei campioni frammentati trova buona corrispondenza con le esperienze di letteratura in cui alla frammentazione del campione in solidi di dimensioni e complessità minori ancora contenenti pigmenti fotosintetici associano un aumento dell'autofluorescenza per via della maggior facilità della luce di penetrare attraverso i solidi e una ridotta capacità schermante (Wang, et al., 2014), è plausibile dunque che anche la misura di assorbanza aumenti con la frammentazione.

#### Variazioni nella struttura della parete

Le variazioni dei parametri SSC e FSC indicano cambiamenti nella geometria, dimensione e integrità della cellula. In tutti i campioni esaminati si osserva una variazione della distribuzione dimensionale ed una riduzione del valore medio di FSC rispetto al campione non trattato; tuttavia il range dimensionale dei campioni trattati risulta analogo a quello del campione non trattato. La diminuzione del FSC sembra piuttosto una conseguenza dell'aumento del SSC, che invece subisce incrementi più marcati; questi incrementi nei campioni SC.T2, SC.E, EU.T2 si traducono in incrementi in termini assoluti. Sebbene l'interpretazione di questo parametro sia controversa e strettamente dipendente dal tipo di cellula in esame, un suo aumento indica sempre l'aumento dell'indice di rifrazione dei solidi (Shapiro, 1995) e la misura del SSC risulta un indice del grado di scabrezza della parete.

In un'alga come l'*E. gracilis*, caratterizzata da una sottile pellicola glicoproteica trasparente posta al di sotto della membrana cellulare (Okuda, 2002), è probabile che il raggio laser agisca come nelle cellule prive di parete e che la sua rifrazione dipenda quindi dalla granulometria interna (Figura 4.19, Figura 4.20). Nel campione EU l'aumento dell'SSC osservato nei campioni EU.T1, EU.T2, EU.A è accompagnato da diminuzione dell'ODpicco, aumento dell'OD260 e dell'OD680 (Tabella 4.14.

Tabella 4.14), tutte misure che sono state correlate a fuoriuscita di materiale interno alla cellula. Le immagini riprese tramite microscopio in Figura 4.19 mostrano cellule pretrattate parzialmente prive di contenuto (box arancione), dalla granulometria interna disomogenea e dalla parete cellulare più scabra (box azzurro) rispetto alle cellule del campione EU.NT. L'aumento dell'SSC indica in questo caso una maggiore scabrezza della parete e riflette inoltre un'eterogeneità interna imputata all'idrolisi parziale del campione, che non porta dunque ad una disintegrazione dei solidi, come dimostrano le conte cellulari, ma che consente la fuoriuscita di parte del materiale interno. Al contrario il campione EU.B non mostra aumento nel SSC e non si osservano cellule svuotate del loro contenuto né un aumento della scabrezza della parete (box verde).

Nelle alghe verdi si osservano i medesimi fenomeni di aumento dell'SSC e contestuale presenza di metaboliti in soluzione nei campioni SC.T1, SC.T2, SC.E in questo caso però, data la struttura più resistente della parete cellulare, le variazioni dell'SSC sono correlabili esclusivamente alla rottura parziale della parete e non a variazione della struttura interna della cellula.

#### *Quantificazione e attività dei pigmenti fotosintetici*

La presenza della clorofilla A è stata misurata tramite le misure di assorbanza e autofluorescenza dei campioni.

Quando rilasciata, la clorofilla risulta estremamente fotosensibile, la sua assorbanza può ridursi e la misura dell'OD680 sul filtrato può non essere indicativa dell'effettiva quantità di materiale rilasciato. Come mostrato in Figura 4.22, la diversa fotosensibilità delle varie forme di clorofilla può portare ad uno scostamento del picco anche in fase solubile (Brown & French, 1959), ragion per cui si rende necessaria la misura dell'assorbanza su tutto lo spettro per valutare il rilascio di clorofilla, che tuttavia spesso non può essere eseguita per via dei bassi valori di assorbanza nel visibile del campione filtrato.

L'effetto di denaturazione dei pigmenti causata dalle temperature applicate nei pretrattamenti termici rende ancora più difficile rilevare la presenza di clorofilla in soluzione tramite OD680 sul filtrato.

Anche la misura dell'autofluorescenza subisce gli effetti della diversa fotosensibilità dei pigmenti presenti nel campione, i quali a seguito di un pretrattamento possono subire modifiche differenti e causare interferenza nella lettura dei segnali. Il campione andrebbe investigato in spettrofluorimetria per poter verificare la lunghezza d'onda di picco di ogni pigmento a seguito di pretrattamento e valutare la presenza di eventuali interferenze con altri fluorocromi.

Dalle misure di autofluorescenza sui singoli canali APC e PerCP è stato comunque possibile trarre informazioni utili. Nei campioni CHL, SC ed EU sono state misurate differenze significative tra i campioni pretrattati e i campioni non trattati, inoltre i pretrattamenti termici hanno mostrato sempre decrementi in termini assoluti. È probabile che i decrementi misurati siano in parte imputabili alla morte cellulare, come mostrato dal campione CHL.A (Figura 4.11) e ad una riduzione nelle dimensioni dei solidi, come accade nel campione EU.B in Figura 4.21. I decrementi ulteriori che si rilevano nei campioni CHL.T2, SC.T2 e EU.T2 devono essere invece attribuiti al rilascio di pigmenti in soluzione oppure ad una denaturazione dei pigmenti stessi. Sicuramente l'ulteriore diminuzione non può essere attribuita esclusivamente al rilascio di pigmento in soluzione, poiché il campione EU.B è interessato da un cospicuo incremento di OD680 sul filtrato ma non da un decremento del picco principale della PerCP (Figura 4.21 e Tabella 4.14).

Tabella 4.14).

La presenza della clorofilla A è stata monitorata anche tramite ODpicco sul campione tal quale: ad un suo aumento è associato il fenomeno di frammentazione e riduzione del particolato con ridotta solubilizzazione (Wang & Yuan, 2015), come accade nei campioni SC.S e EU.B; ad un decremento è invece associato rilascio in soluzione e la denaturazione del pigmento. In caso di solubilizzazione dei pigmenti si assiste ad un decremento nell'ODpicco sul campione totale e ad un incremento dell'OD680 sul filtrato, come accade nel campione EU.A, SC.E, CHL.A e CHL.S (questi ultimi due in misura meno marcata). I pretrattamenti termici invece agiscono degradando i pigmenti in soluzione, ragion per cui questi non vengono più rilevati sul campione filtrato. I grafici in Figura 4.22 mostrano in modo evidente la corrispondenza del campione EU.A tra decremento dello spettro sul campione totale e incremento sul filtrato, contrariamente ai campioni EU.T1 ed EU.T2 in cui non è presente questa corrispondenza.

#### *Macro-indicatori delle informazioni restituite dalle misure*

La possibilità di osservare il campione tramite citofluorimetro ha permesso di caratterizzare il campione di partenza e di quantificare le variazioni in termini di densità del particolato, geometria, caratteristiche della parete e granulometria interna nonché in termini di autofluorescenza dei pigmenti. Tuttavia il citofluorimetro è uno strumento costoso, il cui utilizzo necessita la presenza di personale appositamente formato; per questi motivi risulta difficile pensare ad una sua integrazione nei normali protocolli per la valutazione dell'efficacia dei pretrattamenti nei processi di digestione anaerobica.

La trattazione appena svolta però ha dimostrato come sia possibile correlare le misure di assorbanza e di rilascio di composti in soluzione (che vengono eseguite quotidianamente da chi opera nel settore) alle elaborazioni effettuate tramite citofluorimetro. In Tabella 4.17 vengono riassunte le informazioni che sono state raccolte a seguito dei pretrattamenti e i possibili macro-indicatori da cui ricavare le suddette informazioni:

Tabella 4.17: Informazioni ricavate dalle misure, macro-indicatori da cui estrarre le informazioni e misure a supporto.

Informazione	Codice indicatore	Macro-indicatori	Altri indicatori	Campione in cui è stato osservato l'indicatore
Frammentazione del campione/Riduzione delle dimensioni della biomassa algale	(1)	Aumento torbidità, Aumento ODpicco	Analisi delle statistiche sui solidi presenti, osservazione al microscopio ottico, formazione di nuovi picchi di autofluorescenza di intensità minore	CHL.S SC.S SC.B
Solubilizzazione del materiale di fondo	(2)	Riduzione torbidità, aumento CODsol	Analisi delle statistiche sui solidi presenti tramite citofluorimetro	Pretrattamenti termici EU.A
Parziale idrolisi del substrato/Rilascio di metaboliti in forma solubile	(3)	Aumento OD260 e OD680 sul filtrato, diminuzione ODpicco sul totale	Aumento del SSC, diminuzione nei picchi di autofluorescenza, mortalità cellulare, osservazione di agglomerati con microscopio a fluorescenza	Pretrattamenti termici SC.S EU.A
Denaturazione dei pigmenti	(4)	Spettro di assorbimento totale senza picchi, diminuzione del OD picco ma assenza di OD 680 sul filtrato	Decrementi nell'autofluorescenza del campione in termini assoluti	Pretrattamenti termici
Azione preferenziale verso alcuni composti, rilascio di proteine	(5)	TN, rapporto TN/CODsol		Pretrattamenti termici EU.B

#### 4.2.2 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DEI PRETRATTAMENTI

##### *Pretrattamenti termici*

Dalle prove eseguite si può dedurre che i pretrattamenti termici comportano sempre una grande solubilizzazione di materiale organico e che parte di questo proviene dal contenuto interno della cellula, come descritto dagli indicatori (1) e (2) in Tabella 4.17. Si rileva inoltre un effetto di denaturazione dei pigmenti presenti all'interno della cellula, descritto dall'indicatore (4). Si conclude dunque che l'applicazione di alte temperature comporta dei cambiamenti nella conformazione dei fluorocromi a livello molecolare che causano una diminuzione sia dell'assorbanza (Shan, et al., 2001) che nell'autofluorescenza (Lazàr & Ilik, 1997).

Si può concludere inoltre dall'indicatore (2) che i pretrattamenti termici agiscono solubilizzando il materiale particolato di piccole dimensioni, che può comprendere detriti di varia natura e batteri; tale considerazione è suffragata dalla diminuzione della torbidità del campione a cui è associato il decremento di materiale particolato (Spiden, et al., 2013) e in misura minore dalle conte eseguite con il citofluorimetro. Solo nel caso di *E. gracilis* il pretrattamento termico a 100 °C ha avuto effetto anche sul numero totale di alghe. La solubilizzazione delle cellule intere in questo caso è ascrivibile alla minor resistenza della parete cellulare dell'alga in questione, che rende la specie più facilmente idrolizzabile.

La solubilizzazione del campione e il rilascio del contenuto interno della cellula provocano l'incremento delle cinetiche di produzione del biogas ma non agiscono sulla resa finale di metano, gli incrementi infatti vanno da -24% del campione SC.T1 a +15% di EU.T2

Alzate et al (Alzate, et al., 2012) a seguito di pretrattamento a 55 °C, a fronte di rilasci di materiale organico in fase solubile del 29% e 30% misurano un incremento nella resa di metano del solo 4% e 5%. Passos et al (Passos, et al., 2013) pretrattando un campione misto a 55 e 75 °C misurano una solubilizzazione compresa tra il 400-700% e un incremento nella resa di metano che non supera il

18%. Si desume dunque che il materiale rilasciato attraverso i pretrattamenti termici verrebbe altrimenti idrolizzato dagli enzimi escreti dai batteri (Cho, et al., 2013), tuttavia gli incrementi nelle cinetiche di produzione di biogas dimostrano che la solubilizzazione rende il materiale organico più rapidamente disponibile.

#### *Pretrattamenti chimici*

Rispetto ai pretrattamenti termici, i pretrattamenti chimici sono generalmente meno aggressivi: sono infatti caratterizzati da un più basso grado di solubilizzazione, di rilascio di metaboliti in fase solubile e mostrano un minor aumento della scabrezza della parete cellulare. Inoltre hanno un minor impatto sulla mortalità del campione e non agiscono degradando i fluorocromi, come dimostrano gli spettri di assorbanza e le densità di autofluorescenza misurate con il citofluorimetro.

Il pretrattamento acido sembra comportare un'idrolisi maggiore rispetto al pretrattamento basico, come dimostrano le conte e le variazioni del SSC nel campione EU.A. Se si considerano gli aspetti appena citati, il pretrattamento acido sembra agire in maniera simile ai pretrattamenti termici, tuttavia l'indicatore (4) in questo caso non è mai stato rilevato, si deduce dunque che l'attività dei pigmenti presenti all'interno dei solidi e rilasciati in fase solubile non risulta compromessa. Nelle prove effettuate sulle alghe verdi invece gli effetti sono meno evidenti, per questi campioni non risulta visibile nessun effetto rilevato dall'indicatore (3) e (4), rendendo il pretrattamento acido più simile a quello basico e alla sonicazione piuttosto che ai pretrattamenti termici.

Il pretrattamento basico nelle alghe verdi non comporta mai un decremento della vitalità né della densità del materiale particolato presente. Rispetto al pretrattamento acido l'effetto di rilascio di materiale organico e metaboliti risulta ancora minore.

Al pretrattamento basico è legato l'effetto di riduzione del particolato, ben visibile nei campioni SC.B e EU.B come si evince dalle informazioni sintetizzate nell'indicatore (1). In quest'ultimo campione le due misure sono avvalorate dalle misure di autofluorescenza della PerCP che mostrano chiaramente un incremento delle alghe di dimensioni ridotte.

È interessante notare come questo pretrattamento sia l'unico a non comportare un aumento dell'SSC, tuttavia è apprezzabile la presenza di organuli visibilmente integri in soluzione, a cui è attribuito l'alto valore di OD680 sul campione filtrato. L'azione prevalente del pretrattamento basico è dunque quella di ridurre le dimensioni della biomassa algale, mantenendone integra la struttura. La presenza di organuli ancora integri in soluzione lascia inoltre supporre che, quando avviene, l'idrolisi delle cellule non solubilizzi completamente il contenuto intracellulare.

Il pretrattamento basico è quello che più spesso ha determinato un incremento nella resa di metano nelle prove di BMP (+69% CHL.B, +0% CHL.S, 17% CHL.EU). Non è possibile stabilire se sia proprio la riduzione del particolato ad aumentare la biodegradabilità della biomassa, al contrario però è possibile concludere che non è la solubilizzazione del materiale organico né il rilascio di contenuto interno a determinare l'incremento di resa finale di metano. Inoltre gli incrementi nella biodegradabilità apportati dall'applicazione del pretrattamento basico non sono mai accompagnati da un'accelerazione della cinetica di produzione del biogas.

Si può desumere che i trattamenti chimici rendano la parete più facilmente biodegradabile pur mantenendola integra, diversamente dall'idrolisi conseguita a seguito dei pretrattamenti termici, che però non rende il resto del contenuto cellulare accessibile ai batteri.

L'azione dei pretrattamenti chimici appena descritta trova riscontro con i dati di letteratura per quanto riguarda la bassa solubilizzazione conseguita (Cho, et al., 2013) e l'azione prevalente nei confronti di componenti extracellulari e superficiali (Mendez, et al., 2013). Tuttavia gli incrementi positivi conseguiti in questa sperimentazione, che vanno da +4% del campione SC.A a +69% del campione CHL.B, sono generalmente maggiori rispetto alle esperienze di letteratura; Cho et al. ottengono un incremento che oscilla tra -3% e +8% pretrattando biomassa algale mista a pH 11 e pH 9 (Cho, et al., 2013), Mahdy et al. ottengono incrementi massimi del 17% e del 20% pretrattando *Sc. sp.* e *Chl sp.* con dosi crescenti di NaOH (Mahdy, et al., 2014).

#### *Sonicazione*

La sonicazione è un pretrattamento che risulta particolarmente efficace; l'applicazione di ultrasuoni agisce sulla frammentazione dei solidi presenti, come dimostrano le analisi dimensionali eseguite da González-Fernández et al. (González-Fernández, et al., 2012a) che rilevano un decremento delle dimensioni medie del campione a seguito di sonicazione ad energia specifica crescente, nonché le osservazioni condotte al microscopio da Park, che mostrano una riduzione evidente nel numero di alghe a seguito di sonicazione (Park, et al., 2013).

Bisogna sottolineare che la sonicazione in questa sperimentazione è avvenuta tramite un bagnetto sonicante, diversamente dai sonicatori a immersione solitamente usati in questo genere di pretrattamento. La sonicazione non ha causato effetti così rilevanti come quelli di cui si è appena parlato, tuttavia in ogni set in cui è stata applicata, ha comportato frammentazione e riduzione delle dimensioni della biomassa, descritti dall'indicatore (1).

L'effetto della sonicazione è in una certa misura analogo a quello ottenuto con il pretrattamento basico, in entrambi i casi descritti dall'indicatore (1). L'azione della sonicazione ha provocato la frammentazione del campione nella prova CHL.S e SC.S. Sempre in analogia con il pretrattamento basico, alla sonicazione non è mai associato un aumento dell'SSC, questo significa che la riduzione delle dimensioni del particolato in entrambi i casi non è mai accompagnata da un aumento della complessità della parete, associata all'idrolisi parziale e causa di fuoriuscita di materiale interno.

#### *Pretrattamento biologico*

Il set SC è l'unico che comprende una prova di pretrattamento enzimatico, la valutazione delle modalità di azione di questo genere di pretrattamento quindi non può che essere specie-specifica. A giudicare dalla presenza degli indicatori (3) e (5) si può ipotizzare che gli effetti del pretrattamento enzimatico siano simili a quelli dei pretrattamenti termici. Tuttavia, a differenza di questi, il campione SC.E non mostra gli effetti descritti dall'indicatore (4). La parziale idrolisi della parete e il rilascio di contenuto interno avvengono quindi senza la denaturazione dei pigmenti clorofilliani.

La parziale idrolisi della parete a seguito di pretrattamento enzimatico è un fenomeno già osservato in precedenti studi (Gerken, et al., 2013) (Prajapati, et al., 2015), così come il notevole rilascio di materiale solubile in soluzione (Ometto, et al., 2014). Le esperienze di letteratura riportano incrementi nella resa metanigena pretrattando con proteasi alghe appartenenti al genere *Chlorella* di +69% (Wieczorek, et al., 2014) e +161% (Mahdy, et al., 2015a), ma anche decrementi dovuti a fenomeni di inibizione occorsi durante il processo di metanogenesi (Mahdy, et al., 2015).

### 4.2.3 VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DEI PRETRATTAMENTI NELLE RESE DI BMP

#### *Set PM*

I risultati mostrati in Tabella 4.4 indicano una bassa biodegradabilità del campione PM. La digestione anaerobica di campioni misti coltivati su reflui presenta spesso rese inferiori rispetto alla digestione di alghe coltivate su medium. Roberts et al (Roberts, et al., 2016) ottengono un BMP finale del campione misto composto da specie appartenenti al genere *Scendesmus* e *Chlorella* pari a 161 mL CH<sub>4</sub>/ g VS, contro i 261 e 307 mL CH<sub>4</sub>/gVS ottenuti digerendo *Scendesmus* sp. e *Chlorella vulgaris* allevate su medium BBM. Passos et al (Passos, et al., 2015) ottengono un BMP finale da biomassa coltivata su refluo pari a 188 mL CH<sub>4</sub>/ g VS. La minor degradabilità delle popolazioni coltivate su acque reflue è probabilmente da ricercarsi nelle modifiche che avvengono nella struttura della parete cellulare indotta da fattori di stress ambientali e presenza di predatori, che possono indurre un ispessimento della parete, lo sviluppo di uno strato glicoproteico esterno e di una mucosa extracellulare protettiva (Van Donk , et al., 1997).

I pretrattamenti termici non hanno provocato nessun incremento significativo nella resa metanigena. Si è già discussa nel Par. 1.4.3 la grande variabilità nell'esito dei pretrattamenti termici. I mancati incrementi (e talvolta i decrementi significativi) nelle rese possono essere attribuiti a fenomeni di volatilizzazione del campione (Solé-Bundó, et al., 2017) e alla presenza di batteri aerobici che degradano la materia organica nel corso della durata del pretrattamento (Alzate, et al., 2012). In questo caso per via delle temperature applicate e dei tempi di pretrattamento brevi è improbabile l'effetto di una degradazione aerobica, è possibile invece che il pretrattamento non abbia reso disponibile nuova materia organica.

Dalle analisi eseguite per la valutazione dell'effetto dei pretrattamenti sul campione algale si deduce dunque che i pretrattamenti termici eseguiti hanno portato ad una solubilizzazione di materiale organico proveniente almeno in parte dal contenuto interno delle cellule, la fuoriuscita di metaboliti ha avuto un impatto sulle cinetiche ma non sulle rese finali di metano.

#### Set CHL

La biomassa utilizzata è risultata particolarmente recalcitrante, come dimostrano le produzioni di metano finali, che si attestano su valori compresi tra 155-274 mL CH<sub>4</sub>/gSSV. La specie *C. sorokiniana* infatti è caratterizzata da una bassa biodegradabilità, come dimostrano i dati di BMP presenti in letteratura sulle rese finali di metano, generalmente comprese tra 100 mL CH<sub>4</sub>/gVS (Polakovičová, et al., 2012) e 170 mL CH<sub>4</sub>/gVS (Ometto, et al., 2014). Queste rese risultano nettamente inferiori a quelle ottenute da alghe dello stesso genere, che di solito si attestano intorno ai 200-250 mL CH<sub>4</sub>/gVS (Polakovičová, et al., 2012), (Mussnug, et al., 2010), (Mendez, et al., 2014).

La parete cellulare della specie *C. sorokiniana*, stando ai dati di letteratura, non è mai stata studiata nel dettaglio, tuttavia all'interno del genere *Chlorella* è stata dimostrata un'elevata specificità delle caratteristiche della parete, di cui si è parlato nel Par. 1.2.1. È dunque probabile che la parete di *C. sorokiniana* abbia delle caratteristiche che la rendono particolarmente refrattaria, inoltre le ridotte dimensioni del campione fanno sì che la proporzione tra la parete cellulare e la massa totale della singola cellula aumenti, inficiando sulla quantità di materiale biodegradabile presente.

La bassa degradabilità di partenza dell'alga rende l'applicazione dei pretrattamenti particolarmente efficace, Polakovičová et al (Polakovičová, et al., 2012) tramite macinazione hanno ottenuto un incremento nella resa di metano del 116%, Ometto et al (Ometto, et al., 2014) di oltre il 300% nella resa di biogas a seguito di pretrattamento enzimatico.

Anche nel corso di questa prova di BMP sono stati misurati notevoli incrementi nei campioni CHL.B (+69%), CHL.S (+77%) e in misura minore nel campione CHL.A (+40%). L'aumento della resa di

metano ottenuto in seguito a pretrattamenti chimici è in buon accordo con gli incrementi riportati da Mendez et al (Mendez, et al., 2013) che, a seguito di pretrattamento termochimico acido e basico di un campione formato da *Chlorella vulgaris*, ottengono un incremento nella resa rispettivamente del +65% e +74%, valori in linea con gli incrementi ottenuti nel corso di questa sperimentazione.

Il modello utilizzato per la cinetica del processo (Figura 4.12) mette in evidenza il contributo proveniente da due tipologie di substrato caratterizzati da un rateo di idrolisi totalmente differente (Tabella 4.8). La prima cinetica, che corrisponde alla degradazione di un substrato rapidamente biodegradabile ha valori di  $V_{\infty}$  confrontabile tra i vari campioni. I pretrattamenti più efficaci agiscono invece sulla biodisponibilità del secondo substrato, aumentandone il rateo di idrolisi. Il punto di flesso infatti corrisponde al medesimo giorno per tutti i campioni, tuttavia l'azione dei pretrattamenti è tale da rendere accessibile ai batteri parte di quel materiale lentamente biodegradabile, come evidenziano i valori di  $V_{\infty,2}$ .

Le valutazioni eseguite dall'analisi delle cinetiche è in perfetto accordo con le altre misure effettuate, che, per i pretrattamenti dimostratisi più efficaci, non hanno evidenziato la presenza dell'indicatore (2), (3) e (4) (Tabella 4.17). Questi pretrattamenti dunque hanno mantenuto integra la parete del campione ma l'hanno resa idrolizzabile dagli enzimi dei batteri anaerobici.

#### Set SC

I pretrattamenti eseguiti sulle alghe della specie *Scenedesmus obliquus* non hanno apportato nessun incremento importante nelle rese finali di metano (Tabella 4.12), l'unico incremento misurato è del +4% del campione SC.A. La specie *S. obliquus* è notoriamente una specie particolarmente refrattaria (Roberts, et al., 2016). In questo caso la resa di metano ottenuta per il campione SC.NT, pari a 297 mL  $CH_4/gSSV$ , risulta decisamente alta se paragonata a quelle riportate in letteratura.

Gli incrementi maggiori che sono stati ottenuti a seguito di pretrattamenti di alghe appartenenti alla specie *Scenedesmus obliquus* sono tra il +50-120% misurati da González-Fernández et al (González-Fernández, et al., 2012), (González-Fernández, et al., 2012a) che portano ad una resa finale che passa da 116  $CH_4/gSSV$  del campione non trattato, a 260 mL  $CH_4/gSSV$  del campione pretrattato a 90 °C. La resa del campione pretrattato a 90 °C è molto simile a quella di SC.NT.

Quando invece il campione non pretrattato ha dimostrato una resa metanigena di partenza superiore a 200 mL  $CH_4/gSSV$ , gli incrementi a seguito di pretrattamenti termici, chimici e termochimici sono sempre stati inferiori al 20% (Mahdy, et al., 2014).

È degno di nota invece il decremento ottenuto nella resa di metano dei campioni SC.T1 e SC.E. L'andamento del campione SC.E mostra una produzione rallentata ma costante, mentre il campione SC.T1 mostra un flesso molto pronunciato, a seguito del quale il rateo di produzione subisce un nuovo incremento (Figura 4.18). I due campioni sono inoltre quelli caratterizzati dal maggior rilascio di  $COD_{sol}$  (Tabella 4.6).

L'andamento della produzione di biogas del campione SC.E trova ottima corrispondenza con quanto rilevato da Mahdy et al nella digestione anaerobica di *C. vulgaris* pretrattata con proteasi (Mahdy, et al., 2015). Nel suddetto studio l'andamento della produzione di metano presenta un flesso simile a quello in Figura 4.18. Gli autori attribuiscono il rallentamento nella cinetica ad un accumulo di VFA dovuto all'alto tasso di idrolisi del campione a seguito di pretrattamento enzimatico. L'ipotesi di un

accumulo di VFA può essere avanzata per spiegare l'andamento dei campioni SC.E ed SC.T1 ma non può essere confermata in mancanza di valutazioni specifiche.

#### *Set EU*

I risultati in Tabella 4.16 mostrano che la degradabilità dell'*Euglena gracilis* è ben maggiore rispetto a quella delle alghe verdi finora considerate. Questo risultato non stupisce, data la parete prevalentemente glicoproteica di *E. gracilis* che rende questo substrato facilmente idrolizzabile dagli enzimi secreti dal consorzio batterico (González-Fernández, et al., 2012).

I risultati sono in buon accordo con quelli ottenuti da Grimm et al (Grimm, et al., 2015) che misurano una resa di metano di *E. gracilis* compresa tra i 380-420 mL CH<sub>4</sub>/gVS. I valori inferiori ottenuti in questo caso non possono essere considerati i valori di BMP<sub>ultimo</sub> poiché il criterio di fine non è stato rispettato e le rese di biogas stimato si attestano su valori significativamente maggiori di quelli misurati l'ultimo giorno di prova Tabella 4.16 .

Anche in questo caso il pretrattamento basico, che si è rivelato il più efficace, ha comportato una riduzione delle dimensioni della biomassa algale ma non una solubilizzazione della stessa, né una parziale idrolisi e rilascio del contenuto cellulare. Il rilascio evidenziato dal pretrattamento EU.T2 ha avuto un lieve effetto sulla cinetica di produzione; il materiale rilasciato è stato dunque degradato più velocemente, ma ancora una volta la solubilizzazione del contenuto intracellulare non ha prodotto effetti significativi nelle rese finali di metano.

Non è possibile confrontare le rese di metano ottenute a seguito dei pretrattamenti poiché, stando agli attuali dati di letteratura, non sono mai stati eseguiti pretrattamenti su *E. gracilis* per la digestione anaerobica.

### 4.3 PROVE DI CRESCITA: RISULTATI

Lo scopo delle prove di crescita è stato quello di valutare l'applicabilità di *E. gracilis* per il trattamento delle acque reflue. Nel capitolo precedente è stata discussa la potenzialità di questa specie algale nell'ambito della digestione anaerobica, in questa sede vengono invece mostrati e discussi i risultati provenienti dalle prove di coltivazione in batch.

La sperimentazione è stata svolta in due fasi distinte (Cap. 3.4.2). In entrambe le fasi della sperimentazione è stata valutata la produttività della biomassa, il rateo di crescita, la rimozione di nutrienti conseguita e il rapporto tra nutrienti rimossi e nutrienti necessari per la sintesi cellulare.

La produttività  $P$  di biomassa al tempo  $t$  corrisponde alla velocità di accrescimento media in un intervallo di tempo, calcolata sulla base dell'incremento della concentrazione dei solidi sospesi volatili, secondo l'Eq. 4.3 (Mahapatra, et al., 2013).

$$P [gSSV * L^{-1} * d^{-1}] = \frac{SSV(t_1) - SSV(t_0)}{t_1 - t_0} \quad 4.3$$

Il rateo di rimozione del generico substrato  $Sub$  ( $r_{sub}$ ) è stato calcolato secondo l'Eq. 4.4

$$r_{sub} [mg * L^{-1} * d^{-1}] = \frac{Sub(t_2) - Sub(t_1)}{t_2 - t_1} \quad 4.4$$

Dove  $Sub(t_{1,2})$  è la concentrazione del substrato  $S$  al tempo  $t_{1,2}$  e  $SSV(t_{1,2})$  è la concentrazione di solidi sospesi volatili ai tempi  $t_{1,2}$ .

È stato inoltre valutato il rapporto tra la rimozione di nutrienti ( $R$ ) misurata tra il generico tempo  $t_1$  e  $t_2$  e la biomassa prodotta nello stesso intervallo di tempo secondo l'Eq. 4.5.

$$R \left[ \frac{gS}{gSSV} \right] = \frac{S(t_2) - S(t_1)}{SSV(t_2) - SSV(t_1)} \quad 4.5$$

Il parametro  $R$  è stato poi confrontato con il fabbisogno di nutrienti per la sintesi cellulare ( $S$ ), calcolato in base alla formula stechiometrica indicata da Larsdotter per una generica cellula microalgale (Larsdotter, 2006) che risulta essere:  $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$ . La quantità del generico nutriente  $S$  necessario per la sintesi di 1 g di cellula è stata calcolata secondo l'Eq. 4.6.

$$S \left[ \frac{gN}{gCellula} \right] = \frac{mol N * \frac{g}{mol} N}{\sum mol E_i * \frac{g}{mol} E_i} \quad 4.6$$

Dove  $E_i$  rappresenta l' $i$ -esimo elemento che compone la cellula ed  $N$  il generico nutriente che compare nella formula stechiometrica, di cui si vuole calcolare il fabbisogno.

Sono stati infine calcolati i rapporti  $N/P$  calcolati mediante l'Eq. 4.5 ( $N/P$  sperimentale) e l'Eq. 4.6 ( $N/P$  stechiometrico) e confrontati.

In fase di esposizione dei risultati sono stati mostrati esclusivamente i dati ritenuti significativi. Dei parametri di crescita misurati che comprendono OD680, densità cellulare, torbidità e

concentrazione di solidi nel reattore sono stati omessi quelli di cui si avevano a disposizione meno misure o che non fornivano ulteriori informazioni rispetto a quelle già fornite dagli altri parametri.

### Fase 1

La prima fase del piano sperimentale è consistita in una prova di crescita in batch su medium sintetico (M) Cramer & Myers, le cui caratteristiche sono state espone in Tabella 3.5.

La prova è stata condotta mantenendo il reattore 1 ed il reattore 4 (C1 e C4) a pH inferiore a 7.1<sup>4</sup> mediante insufflazione controllata di CO<sub>2</sub>, mentre nel reattore 2 e nel reattore 3 (C2 e C3) il pH è stato lasciato non controllato.

In Tab 3.10 del Par. 3.4.2 sono mostrate le caratteristiche della sospensione algale relative al giorno 0. La fase 1 del piano sperimentale è cominciata il 10/04/2019 e ha avuto una durata di 23 giorni, di cui gli ultimi 4 caratterizzati da una carenza di nutrienti residui.

In Figura 4.29 sono mostrati i valori di Temperatura, Ossigeno disciolto (OD) e pH misurati dalle sonde.

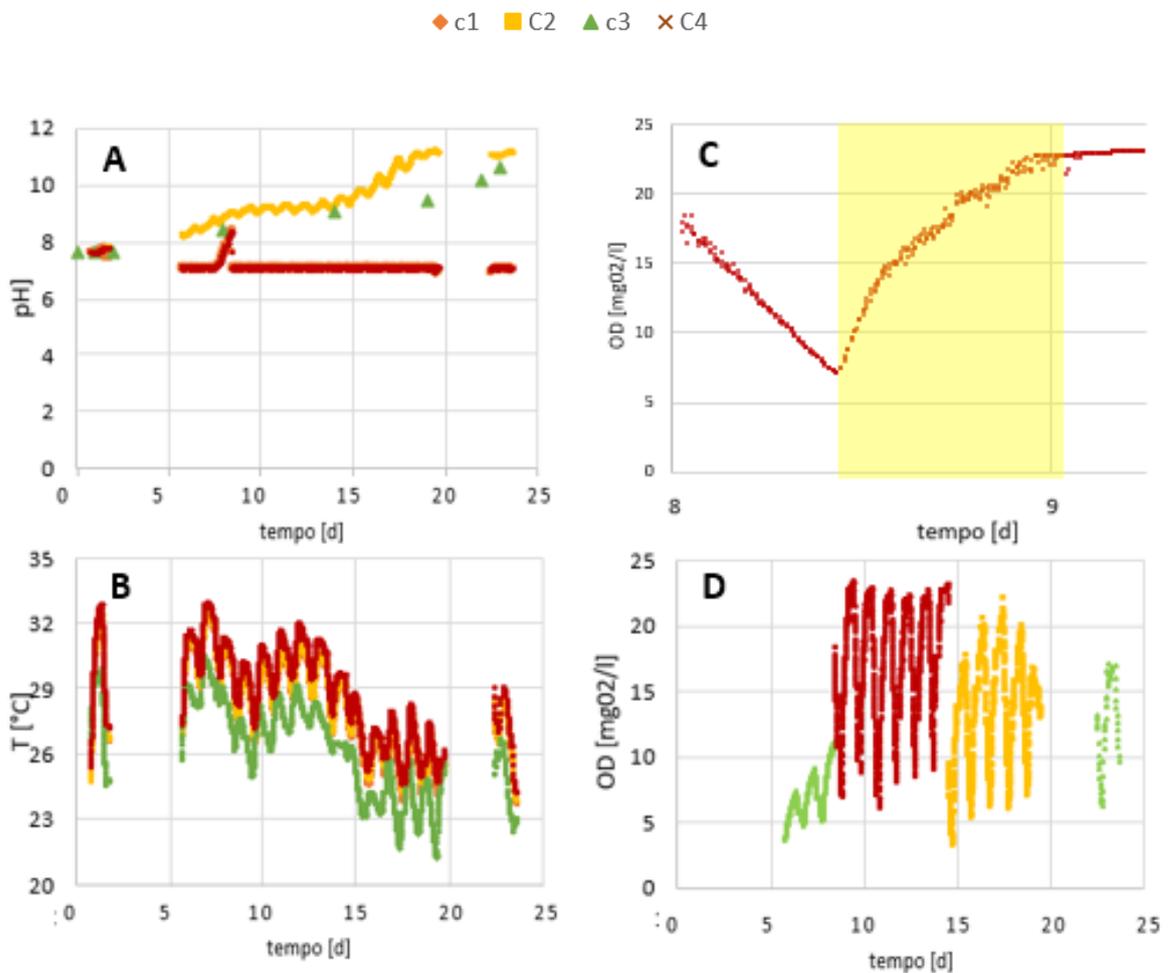


Figura 4.29: Valori di pH(A), Temperatura (B), Ossigeno disciolto (D) nell'intera durata della Fase 1. Ossigeno disciolto misurato tra il giorno 8 e il giorno 9 della Fase 1 (C)

<sup>4</sup> Il controllo del pH nei reattori C1 e C4 ha avuto inizio il giorno 3 della sperimentazione.

In Figura 4.30 si riportano i valori dei parametri di crescita algale e la concentrazione dei substrati all'interno delle colonne. I valori al tempo 0 corrispondono a quelli calcolati in base alle caratteristiche del medium M.

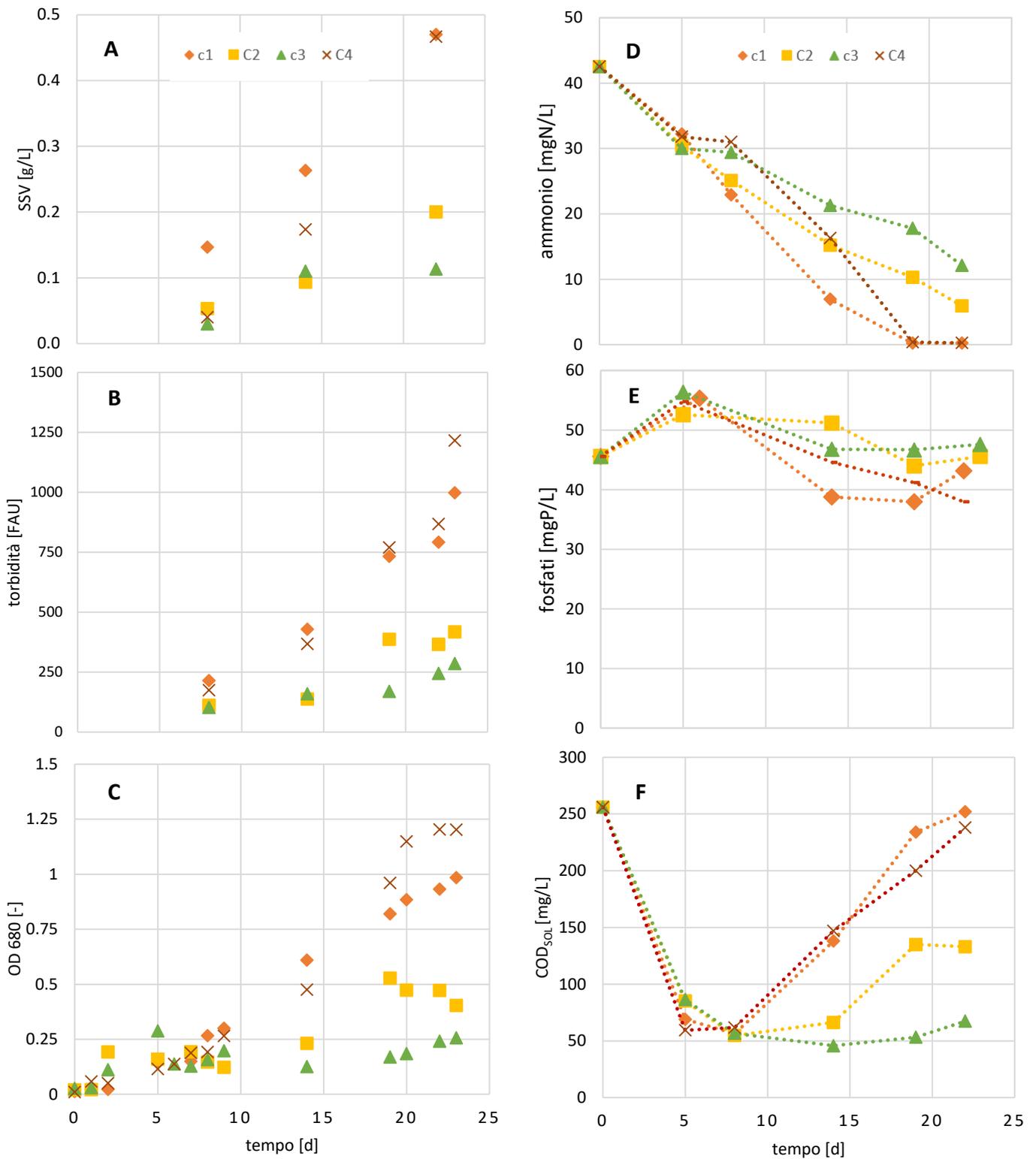


Figura 4.30: Andamenti dei parametri di crescita e di rimozione nei reattori C1, C2, C3 e C4. SSV (A), torbidità (B), OD 680 (C), concentrazione di ammonio (D), fosfati (E) e COD solubile (F).

Si noti che i valori di fosforo al tempo 0, calcolati in base alle caratteristiche del medium M, risultano inferiori rispetto a quelli misurati al giorno 5 (Figura 4.30 E). Ciò è dovuto in parte al contributo di fosforo apportato dall'inoculo algale, in parte al rilascio da parte della biomassa, di cui si discuterà in seguito.

Nelle colonne C2 e C3, in cui il pH non è stato controllato, la crescita è risultata fortemente inibita, come si vede in Figura 4.30 A,B,C. I ratei di crescita in C1 e C4 sono riportati in Figura 4.31. Per individuare la fase esponenziale della crescita non sono stati considerati i primi due giorni di prova, che costituiscono il periodo di acclimatazione e gli ultimi cinque giorni, caratterizzati dalla limitazione di nutrienti, secondo quanto esposto nel Cap. 3.4.4.

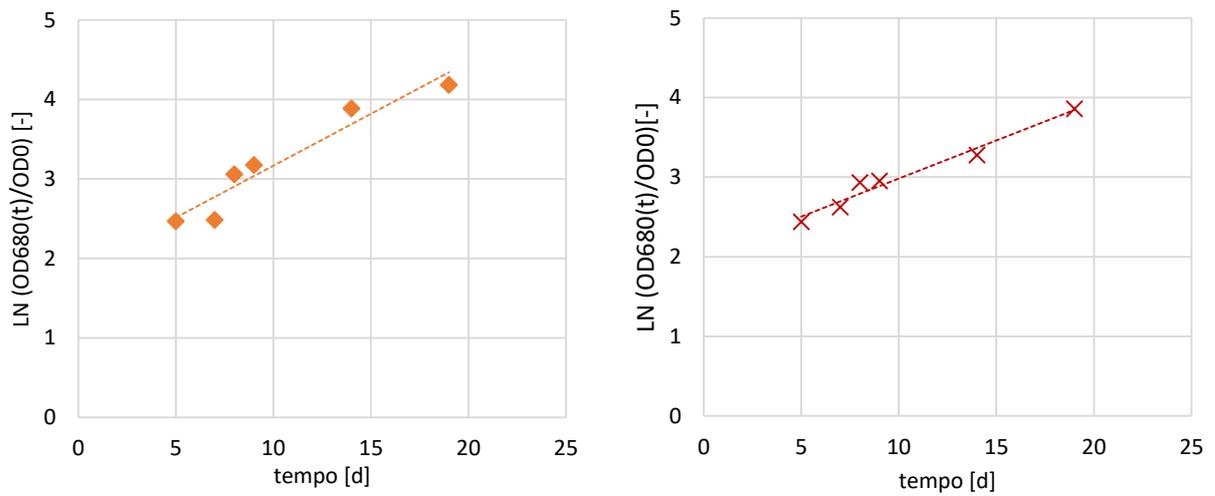


Figura 4.31: stima del rateo di crescita esponenziale nelle colonne C1 e C4.

I valori del rateo di crescita e il relativo coefficiente di determinazione sono riportati nella Tabella 4.18.

Tabella 4.18: Ratei di crescita e relativo coefficiente di determinazione  $R^2$

	<b>C1</b>	<b>C4</b>
$\mu [d^{-1}]$	0.13	0.10
$R^2$	0.92	0.97

I parametri di crescita SST ed SSV risultano ben correlati con l'OD 680, come illustrato in Figura 4.32.

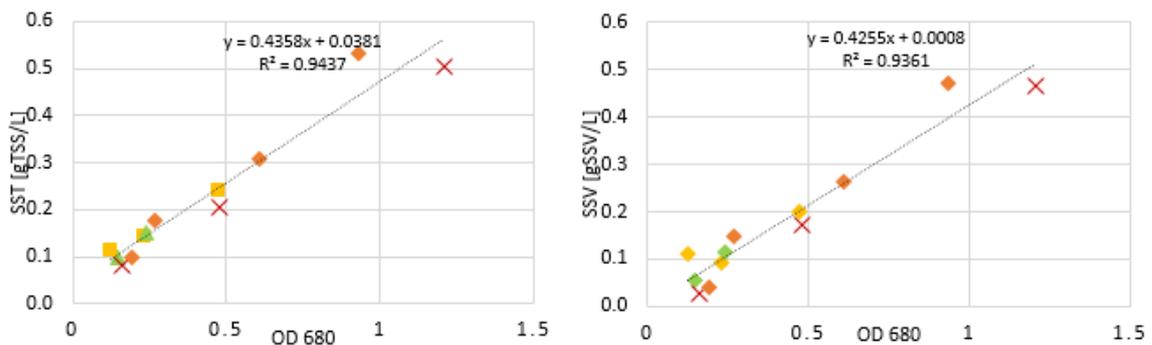


Figura 4.32: correlazione tra le variabili OD 680-SST (A) e OD 680-SSV(B)

A partire dalla relazione trovata tramite la retta di regressione in Figura 4.32, è stato possibile stimare la concentrazione di solidi sospesi nelle colonne in ogni tempo della Fase 1.

I valori di produttività P sono stati calcolati utilizzando la stima del parametro SSV al tempo 0 e al tempo 19, giorno in corrispondenza del quale è stata individuata la fine della crescita esponenziale. I risultati ottenuti secondo l'Eq. 4.3 sono riportati in Tabella 4.19.

Tabella 4.19: Calcolo della produttività di biomassa nei colonne durante la fase 1 al termine della fase esponenziale.

<b>P</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
gSSV*L <sup>-1</sup> *d <sup>-1</sup>	0.018	0.011	0.003	0.021

In Tabella 4.20 sono infine riportati i ratei di rimozione di azoto e fosforo (r(N) e r(P)), la loro rimozione specifica rispetto alla biomassa cresciuta (R(N) ed R(P)), ed i rapporti N/P ottenuti sperimentalmente e calcolati in base alla formula stechiometrica, secondo le equazioni 4.4-4.6. I valori riportati si riferiscono all'intervallo temporale compreso tra il giorno 5 ed il giorno 14.

Tabella 4.20: ratei di rimozione, rimozione specifica (R) e apporto stechiometrico di nutrienti per grammo di biomassa sintetizzata (S).

		<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>
<i>r (N)</i>	mgN*L <sup>-1</sup> *d <sup>-1</sup>	2.8	1.7	1	1.7
<i>r (P)</i>	mgP*L <sup>-1</sup> *d <sup>-1</sup>	1.8	0.2	1.1	1.1
<i>R (N)</i>	mgN/gSSV	126.0	597.0	ND	124.5
<i>R (P)</i>	mgP/gSSV	82.8	55.0	ND	81.9
<i>N/P sperimentale</i>	gN/gP	1.5	10.9	ND	1.5
<i>N/P stechiometrico</i>	gN/gP	7.2	7.2	7.2	7.2

Nelle colonne C2 e C3 il calcolo di R non risulta affidabile poiché la biomassa netta sintetizzata è molto prossima allo zero.

## Fase 2

La Fase 2 del piano sperimentale ha previsto il confronto tra crescita su medium modificato (M\*) e crescita su refluo (R).

Per la Fase 2 del piano è stato possibile utilizzare solo le colonne C1, C2 e C4, dotate di sistema per il controllo del pH. La crescita su refluo è stata eseguita in doppio all'interno di C1 e C2, mentre C4 è stata alimentata con medium modificato. Per distinguere le due Fasi della coltivazione e agevolare la lettura, nella Fase due della sperimentazione le colonne C1 e C2, sono indicate rispettivamente con il nome C.R.1 e C.R.2 e la colonna C4 è denominata C.M.4.

Il medium Cramer & Myers è stato modificato affinché le concentrazioni di COD<sub>sol</sub> e di NH<sub>4</sub><sup>+</sup> all'interno delle colonne fossero confrontabili. Le concentrazioni di COD<sub>sol</sub> e di nutrienti sono state misurate tra il giorno 0 ed il giorno 1 della nuova fase ed il medium M\* è stato modificato in base ai valori misurati nelle colonne C.R.1 e C.R.2. Le caratteristiche del medium M\* sono reperibili nella Tabella 3.5.

La fase 2 ha avuto inizio il giorno 20/05/2019 ed è terminata il giorno 19/06/2019, per una durata complessiva di 30 giorni. Il giorno 15 della prova sono stati aggiunti nelle colonne C.R.1 e C.R.2 0.5

g/L di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al fine di aumentare la concentrazione di fosforo fino al valore di 115 mgP/L, pari alla concentrazione di fosforo iniziale del reattore C.M.4, con lo scopo di verificare se fino al giorno 15 la crescita nei suddetti colonne fosse stata inibita da una condizione di limitazione di fosforo.

In Tabella 3.11 del Cap. 3.4.2 sono riportate le caratteristiche degli alimenti di crescita misurate tra il giorno 0 ed il giorno 1 della sperimentazione.

In Figura 4.33 sono mostrati i valori di Temperatura, Ossigeno disciolto (OD) e pH misurati dalle sonde nel corso della prova.

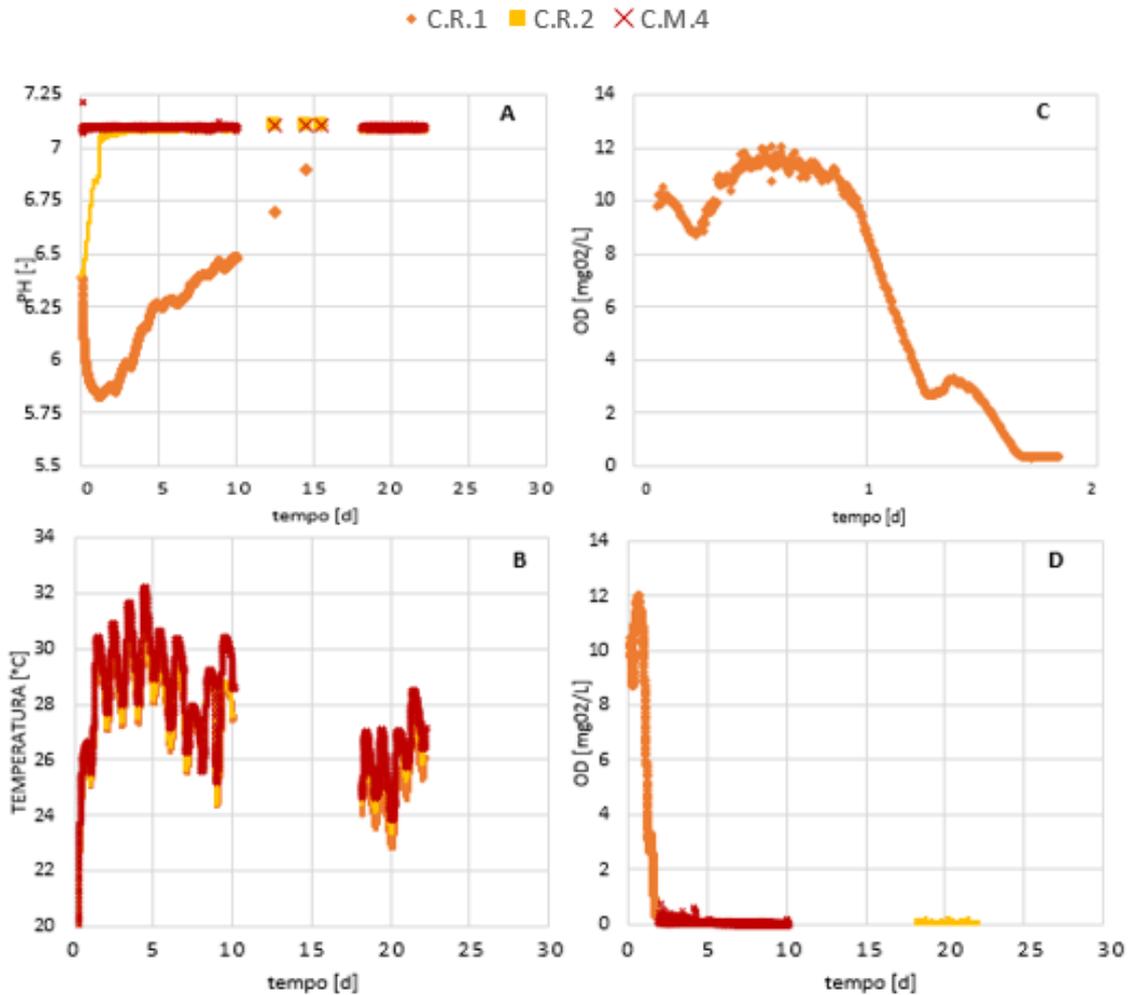


Figura 4.33: Valori di pH (A), Temperatura (B), OD nelle prime 48 h (C) e OD nel corso dell'intera prova (D).

In Figura 4.34 si riportano i valori ottenuti dal monitoraggio delle tre colonne riguardo i parametri di crescita algale (Fig. 3.4 A, B, C) e di rimozione dei nutrienti (Fig. 3.4 D, E, F).

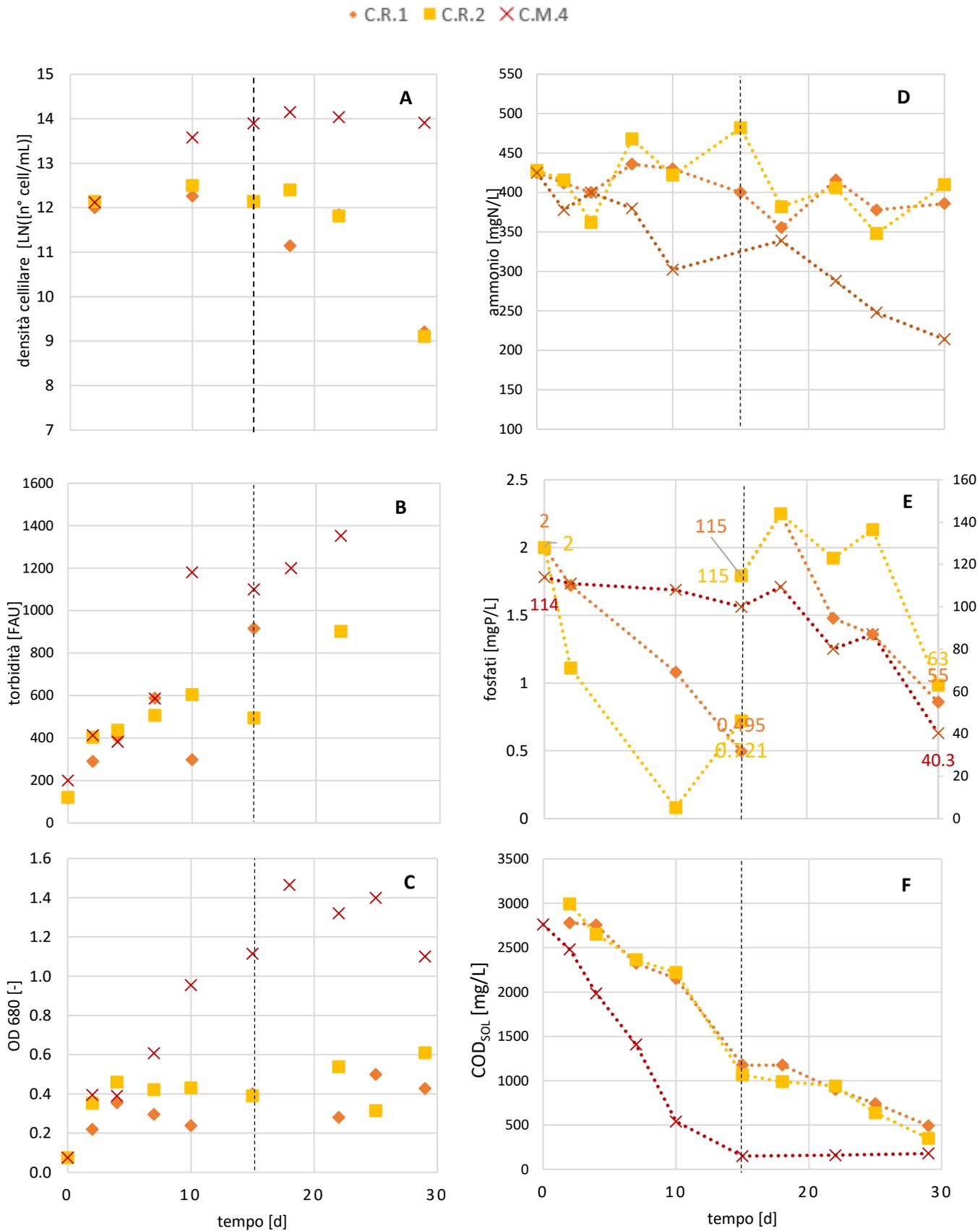


Figura 4.34: Andamenti dei parametri di crescita e di rimozione nei colonne C.R.1, C.R.2 e C.M.4 misurati nel corso della Fase 2.. densità cellulare (A), torbidità (B), OD 680 (C), concentrazione di ammonio (D), fosfati (E) (asse verticale sx: C.R.1 e C.R.2 per  $t < 15$  d; asse verticale dx C.M.4 e C.R.1, C.R.2 per  $t > 15$  d), COD solubile (F).

La linea tratteggiata nei grafici in Figura 4.34 in corrispondenza del giorno 15 della prova evidenzia il momento in cui è stato corretto l'alimento nelle colonne C.R.1 e C.R.2 per portare la concentrazione di fosforo da inferiore ad 1 mgP/l a circa 115 mgP/l.

È stato valutato il rateo di crescita  $\mu$  ed il relativo coefficiente di determinazione  $R^2$  solamente per la colonna C.M.4, in C.R.1 e C.R.2 infatti non è stata osservata alcuna crescita esponenziale. In Figura 4.35 è mostrata la linearizzazione della fase esponenziale di crescita ed il rateo di crescita stimato; la fase esponenziale ha avuto inizio il giorno 2 e termine il giorno 17.

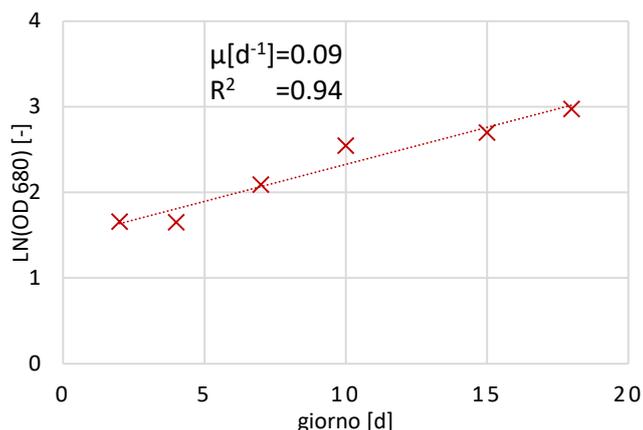


Figura 4.35: Stima del rateo di crescita e del coefficiente di determinazione  $R^2$  nel reattore C.M.4.

I valori di produttività  $P$  calcolati secondo l'Eq. 4.3 al termine della fase esponenziale sono mostrati in Tabella 4.21.

Tabella 4.21: Produttività calcolata al termine della fase esponenziale.

$P$	C.R.1	C.R.2	C.M.4
$\text{gSSV} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	0.005	0.010	0.029

In Tabella 4.22 si riportano i valori dei ratei di rimozione ( $r(N)$  ed  $r(P)$ ), del rapporto tra nutrienti rimossi e biomassa accresciuta nel reattore ( $R(N)$  ed  $R(P)$ ), nonché i rapporti N/P misurati sperimentalmente e calcolati stechiometricamente, tra il giorno 2 ed il giorno 10. Le valutazioni sono state eseguite per la colonna C.M.4, nelle altre colonne infatti i processi di decadimento cellulare e di rilascio di nutrienti non hanno permesso di individuare un periodo di crescita netta in cui poter calcolare tali parametri.

Tabella 4.22: calcolo del rateo di rimozione dei nutrienti e dei parametri  $R$  e  $S$  nella colonna C.M.4.

$r(N)$	$\text{mgN} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	9.5
$r(P)$	$\text{mgP} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	0.4
$R(N)$	$\text{mgN/gSSV}$	96.5
$R(P)$	$\text{mgP/gSSV}$	3.8
N/P sperimentale	N/P rimosso	25.3
N/P stechiometrico	N/P sintesi	7.2

## 4.4 PROVE DI CRESCITA: DISCUSSIONE DEI RISULTATI

### *Fase 1*

Nel corso della Fase 1 delle prove di crescita è stata evidenziata una netta differenza nella crescita tra le colonne in cui il pH è stato mantenuto al di sotto di 7.1 e le colonne in cui il pH non è stato controllato, come si evince dai valori dei parametri di crescita misurati in Figura 4.30 A, B, C. L'inibizione della crescita si rispecchia anche in una maggior concentrazione di nutrienti all'interno dei reattori, come si vede nei grafici E, F, D in Figura 4.30.

Analizzando i dati relativi alla concentrazione di Ossigeno disciolto nelle colonne (Figura 4.29 C,D) è evidente il contributo dell'attività fotosintetica. Nel grafico in Figura 4.29 C si nota un aumento della concentrazione dell'OD in concomitanza con la fase illuminata, evidenziata in giallo in figura. Al termine della fase illuminata si assiste al decremento dell'OD, dovuto alla degradazione aerobica del COD (Figura 4.30 F). Il grafico in Figura 4.29 D indica che questo ciclo di produzione e consumo dell'OD si ripete per tutta la lunghezza della prova, inoltre le colonne C2 e C3 mostrano cicli in cui l'OD massimo ha valori inferiori poiché l'attività fotosintetica delle alghe è ridotta.

Come descritto nel Par. 3.4.1 i fotoreattori non sono totalmente chiusi e la crescita dunque non avviene in condizioni di sterilità, in questo modo non è dunque possibile attribuire la rimozione del COD alla sola attività metabolica delle alghe, poiché è altamente probabile la presenza di una comunità batterica aerobica. Tuttavia diversi studi hanno dimostrato che *E. gracilis* è una specie preferenzialmente fotoeterotrofa (Yamane, et al., 2001), (Ogbonna, et al., 2002). La rimozione del COD, visibile fino al giorno 10 (Figura 4.30 F) è dunque da attribuirsi anche alla crescita algale.

L'aumento del COD che si apprezza a partire dal giorno 10 è un fenomeno noto quando le condizioni di crescita di *E. gracilis* passano da fotoeterotrofe o autotrofe a condizioni eterotrofe anaerobiche, i rilasci di COD sono dovuti alla produzione di acidi organici come succinato e lattato a partire dalle riserve di polisaccaridi presenti all'interno delle cellule, per permettere la formazione dell'ATP (Tomita, et al., 2016). Nel corso della Fase 1 non si instaurano mai condizioni anaerobiche, è possibile tuttavia che in carenza di substrato organico, la cui concentrazione decresce notevolmente fino al giorno 8, le cellule utilizzino le riserve di polisaccaridi accumulati al loro interno. La produzione di acidi grassi e alcoli è stato osservato in *S. platensis* coltivata in condizioni puramente autotrofe e in carenza di azoto (Aoyama, et al., 1997) nonché in diversi generi di phytoplankton. È stato osservato ad esempio che la diatomea *C. affinis* può rilasciare polisaccaridi durante la fase di crescita esponenziale con rateo anche maggiore rispetto a quello di assimilazione del carbonio (Myklestad, 1995).

L'inibizione della crescita in C2 e C3 è chiaramente da attribuirsi al mancato controllo del pH. L'*Euglena gracilis* infatti viene coltivata principalmente su medium acidi o neutri (Cramer & Myers, 1952). Studi eseguiti da Yamane et al (Yamane, et al., 2001) hanno mostrato che le *E. gracilis* sono in grado di crescere senza limitazioni fino a pH vicini a 2, Mapatra et al (Mahapatra, et al., 2013) a pH non controllato hanno misurato una crescita su refluo con pH finale pari a 9. Tuttavia non ci sono esempi di crescita di questa specie su pH vicini al 12, valore prossimo al quale si attestano i pH di C2 e C3 verso la fine della Fase 1. Inoltre nelle colonne C2 e C3 non è mai stata insufflata CO<sub>2</sub> (usata per il controllo del pH), in questo modo le microalghe non hanno avuto un apporto di Carbonio inorganico, che, secondo alcuni autori, in caso di mixotrofia viene usato per la produzione

di prodotti organici di accumulo (Kim, et al., 2013), (Chojnacka & Marquez-Rocha, 2004) e che dunque avrebbe un impatto positivo anche nella crescita mixotrofa.

All'interno delle colonne C2 e C3 non è stata osservata alcuna fase di crescita esponenziale. Fino al giorno 8 della prova, in cui il pH si mantiene ancora al di sotto di 8.5, i valori dei parametri di crescita e concentrazione dei substrati sono confrontabili con quelli delle colonne C1 e C4, con il proseguire della prova e l'aumento del pH però la crescita in queste due colonne si arresta, come dimostrano i valori stazionari dei parametri di crescita (Figura 4.30 A, B, C). La produttività delle suddette colonne risulta dunque estremamente ridotta (Tabella 4.19).

Nelle colonne C1 e C4 è invece stata osservata la curva caratteristica di crescita che si osserva nelle coltivazioni di microrganismi in batch (Monod, 1949). Il grafico in Figura 4.36 rappresenta la curva di crescita osservata nella colonna C4. La prima linea tratteggiata separa la fase di acclimatazione e accelerazione dalla fase di crescita esponenziale, la seconda linea tratteggiata invece individua il momento in cui ha termine la crescita esponenziale e comincia la fase stazionaria, che si verifica quando l'azoto diventa limitante (Figura 4.30 B).

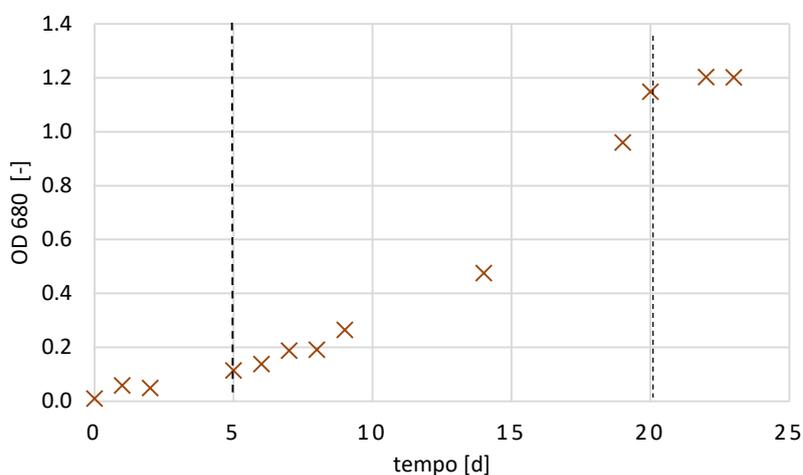


Figura 4.36: Curva di crescita nel reattore C4.

I valori della costante di crescita  $\mu$  nelle colonne C1 e C4 risultano confrontabili tra loro. La leggera differenza in questo caso ricade all'interno dell'incertezza legata alla misura. I valori calcolati, se paragonati con quelli reperibili in letteratura, sono piuttosto bassi. Torihara & Kishimoto (Torihara & Kishimoto, 2015) misurano un rateo di crescita compreso tra 0.5 e 0.6  $d^{-1}$  nelle stesse condizioni di intensità luminosa e Temperatura. Cramer & Myers (Cramer & Myers, 1952) misurano un rateo compreso tra 0.3 e 0.6  $d^{-1}$  al variare dell'intensità luminosa e della fonte di Carbonio. In condizioni di non sterilità tuttavia i ratei di crescita risultano inferiori, Torihara & Kishimoto (Torihara & Kishimoto, 2015) rilevano un decremento della  $\mu$  in presenza di batteri in soluzione. È possibile dunque che la presenza di batteri che competono per i substrati abbia avuto un'influenza sul rateo di crescita della biomassa algale. Bisogna anche considerare che i diversi metodi di valutazione del rateo di crescita e la valutazione dell'inizio e della fine della fase esponenziale hanno un'influenza sulla stima della  $\mu$ . I diversi metodi con cui viene calcolato il rateo di crescita e la mancanza di un metodo standard nello stabilire l'intervallo di tempo dell'elaborazione rendono il parametro difficile da confrontare.

La rimozione di ammonio e fosforo valutata in Tabella 4.20 mostra un'ottima riproducibilità della prova di crescita a pH controllato, i parametri di rimozione specifica (R) infatti risultano pressoché identici. La rimozione specifica dell'azoto si attesta su valori più alti ma comunque confrontabili con l'apporto di nutrienti necessario per la sintesi calcolato stechiometricamente (S), a differenza della rimozione del fosforo che risulta nettamente maggiore. Ciò si traduce in un rapporto N/P di circa 1.5, contro il valore di sintesi pari a 7. Diverse ipotesi possono essere fatte per spiegare il fenomeno: innanzitutto l'assimilazione del fosforo dipende dalla sua concentrazione nell'alimento, dalla fisiologia e dal contenuto interno di fosforo della cellula e da caratteristiche ambientali quali il pH e la temperatura del medium (Choi & Lee, 2015). Per questi motivi spesso la rimozione di fosforo non trova corrispondenza con l'apporto stechiometrico per la sintesi. Inoltre diverse ricerche hanno misurato un decremento del rapporto N/P in medium caratterizzati da alte concentrazioni di fosforo (Su, et al., 2011). Uno squilibrio nel rapporto N/P dell'alimento infatti provoca fenomeni di accumulo preferenziale verso alcuni composti all'interno della cellula, in questo caso i rapporti di rimozione non possono più essere confrontati con quelli stechiometrici (Wang, et al., 2014).

Dal monitoraggio eseguito con il microscopio ottico è stata rilevata una contaminazione ad opera di alghe appartenenti al genere *Chlorella* in tutte e quattro le colonne a partire dal giorno 19 della prova, come già evidenziato in precedenza infatti all'interno del reattore non sussistono condizioni di sterilità. Al termine della Fase 1 è stato quindi utilizzato un nuovo inoculo puro di *E. gracilis* ed è stata avviata una nuova coltivazione con modalità analoghe a quelle utilizzate in questa prova con il solo scopo di verificare la possibilità di mantenere una coltura con prevalenza di *E. gracilis*. Avendo escluso una nuova contaminazione, è stato possibile procedere con la Fase 2, in caso contrario la specie *E. gracilis* sarebbe stata considerata non idonea alla crescita in reattori aperti.

## Fase 2

All'inizio della Fase 2 si instaurano condizioni anaerobiche, come si vede in Figura 4.33 C dove è riportato l'andamento dell'OD nelle prime 48 ore. Nel grafico si apprezza un primo ciclo della concentrazione di Ossigeno disciolto dovuto all'attività fotosintetica, successivamente però prevale il contributo della degradazione aerobica che consuma l'ossigeno presente nelle colonne durante l'intero corso della prova (Figura 4.33 D). Il maggior consumo di OD in questa Fase è dovuto al più alto rateo di rimozione del COD solubile (Figura 4.33 F).

Non è possibile stabilire se le concentrazioni di OD sempre inferiori a 0.5 g/l misurate dalla sonda nel corso della prova siano da attribuirsi all'attività fotosintetica, che produce una quantità di ossigeno immediatamente consumata, oppure se siano da attribuire ad una concentrazione di fondo presente nel reattore o ancora ad un errore di misura. L'instaurarsi di queste condizioni ha comunque permesso la crescita esponenziale della biomassa algale nella colonna C.M.4, la specie *E. gracilis* infatti è in grado di crescere anche in condizioni anaerobiche, come ben documentano Santiago-Martínez et al (Santiago-Martínez, et al., 2015).

Il reattore C.R.1 mostra un andamento del pH molto diverso dalle altre due colonne (Figura 4.33 A) con un iniziale acuto decremento del pH fino al valore di 5.8 misurato il giorno 2 della prova. Dopo il giorno 2 il pH ricresce fino a riportarsi sul valore di 7.1 e ad attivare dunque l'insufflazione della CO<sub>2</sub> per il controllo del pH.

Osservando i valori del pH in un intervallo di tempo più breve, tra il giorno 1 ed il giorno 4 della sperimentazione, è possibile osservare un trend nella crescita del pH, come è mostrato in Figura 4.37.

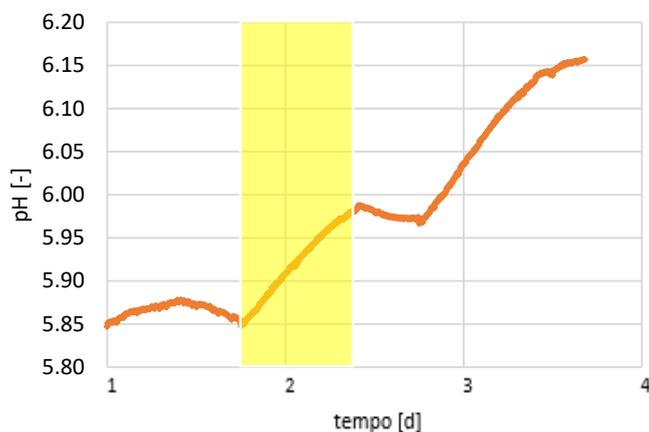


Figura 4.37: Andamento del pH nel colonne C.R.1 tra il giorno 2 ed il giorno 4

Durante la fase illuminata (evidenziata dal riquadro giallo in figura) si osserva un incremento del pH, seguito da un decremento nella fase di buio. È dunque possibile che tale decremento sia dovuto all'attività eterotrofa del consorzio alghe-batteri; l'instaurarsi di condizioni puramente eterotrofe infatti porta a notevoli decrementi del pH (Yamane, et al., 2001).

Osservando l'andamento dei parametri di crescita in Figura 4.34, si nota che la crescita nelle colonne C.R.1 e C.R.2 alimentate con refluo risulta estremamente rallentata: al giorno 15 i valori di assorbanza e le conte cellulari mostrano una crescita notevolmente ridotta, mentre nel reattore C.M.4 i valori ottenuti sono confrontabili con quelli misurati durante la Fase 1. Nel reattore C.R.2 l'entità di ammonio rilasciata è tale da non consentire un apprezzamento della rimozione di azoto dovuta alla sintesi cellulare. Il monitoraggio tra il giorno 15 ed il giorno 30 inoltre rivela che l'aggiunta di fosforo non ha portato nessun miglioramento all'interno delle colonne alimentate con refluo. L'alto valore di OD 680 misurato nella colonna C.R.2 il giorno 30 è da attribuirsi ad un'interferenza dovuta alla colorazione assunta dall'alimento, mentre la torbidità subisce un incremento per via del gran numero di detriti prodotti dalla morte cellulare. In questa fase di decadimento cellulare le conte sono risultate l'unico parametro di crescita affidabile e nelle colonne C.R.1 e C.R.2 queste denotano un netto decremento del numero di cellule integre (Figura 4.34 A, B, C). Inoltre da osservazioni qualitative eseguite con il microscopio è stata osservata una scarsa mobilità delle cellule che è stata associata a condizioni di sofferenza cellulare. Tra il giorno 22 ed il giorno 29 della prova è stata osservata la formazione di un biofilm sulla superficie delle colonne C.R.1 e C.R.2, che è stato prelevato ed osservato al microscopio. Da questa osservazione è emersa una proliferazione batterica in atto, ragion per cui i decrementi osservati nei valori di fosfati, ammonio e COD solubile nella fase finale della sperimentazione non possono essere attribuiti all'assimilazione da parte della biomassa algale.

Fino al giorno 15 la crescita nelle colonne alimentate con refluo è risultata pressoché stazionaria, l'OD 680 infatti risulta compreso tra 0.3-0.4 (Figura 4.34 C) che corrisponde ad una concentrazione stimata di solidi sospesi volatili pari a  $0.18 \text{ gSSV} \cdot \text{L}^{-1}$  contro una concentrazione stimata nel reattore C.M.4 pari a  $0.5 \text{ gSSV} \cdot \text{L}^{-1}$ . Tuttavia non è possibile associare il successivo decadimento cellulare alle

sole caratteristiche del refluo. Prolungare così a lungo una prova in batch infatti comporta l'accumulo all'interno dei reattori di metaboliti di reazione, che costituiscono prodotti di scarto e possono risultare inibenti, il prolungamento della prova aumenta inoltre il rischio di una proliferazione della comunità batterica. A dimostrazione di quanto detto si noti che anche il reattore C.M.4 a partire dal giorno 22 subisce un decremento sia dell'OD 680 sia della densità cellulare (Figura 4.34 A, C). Per valutare la crescita di *E. gracilis* sul refluo utilizzato nella Fase 1 è dunque raccomandabile pianificare una sperimentazione che preveda delle prove in continuo, con HRT inferiore a 10 giorni per mantenere la coltura vitale.

Dal confronto dei risultati ottenuti nella colonna C.M.4 con i dati delle colonne C1 e C4 nella Fase 1, non si rilevano differenze nelle cinetiche di crescita, che dunque non subiscono alcun effetto dovuto alla concentrazione di nutrienti nel medium. La produttività misurata tra il tempo 0 ed il termine della fase esponenziale risulta leggermente superiore nella colonna C.M.4 (Tabella 4.21), mentre la produttività calcolata tra l'inizio e la fine della sola fase esponenziale rimane invariata (pari a  $0.037 \text{ gSSV} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ).

La cinetica di rimozione dell'azoto risulta confrontabile tra le due prove, mentre si rileva una differenza nella cinetica di rimozione del fosforo, che nella Fase 2 risulta nettamente inferiore rispetto a quella misurata nella Fase 1. Come conseguenza di ciò il rapporto N/P di rimozione della colonna C.M.4 è molto maggiore rispetto a quello misurato nelle colonne C1 e C2 (Tabella 4.20 e Tabella 4.22). La differenza nel rapporto N/P è probabilmente legata ai meccanismi di assimilazione del fosforo nonché alle condizioni ambientali di cui si è discusso in precedenza. Bisogna inoltre considerare che la concentrazione di fosforo e il rapporto N/P dell'alimento possono influire in maniera significativa sul rapporto di rimozione dei nutrienti stessi (Su, et al., 2011). Viste le differenze tra l'alimento della Fase 1 e quello della Fase 2 non è dunque possibile operare un confronto attendibile tra i rapporti di rimozione misurati.

## 5 CONCLUSIONI

---

L'integrazione della coltivazione della biomassa algale all'interno dei processi di depurazione delle acque reflue consente la rimozione di nutrienti e altri inquinanti dalle acque e al contempo produce biomassa che può essere utilizzata per la produzione di bioenergia.

Questo processo dunque è in grado di migliorare la qualità delle acque che vengono restituite all'ambiente e allo stesso tempo di rispondere alle istanze di riduzione delle emissioni di gas serra. La digestione anaerobica è considerata la via più diretta ed efficace per la produzione di bioenergia dalla biomassa algale, tuttavia le microalghe sono caratterizzate da una parete cellulare molto resistente e da una grande varietà interspecifica, ragion per cui le rese di metano si attestano su valori generalmente bassi ed i pretrattamenti applicati per aumentarne la biodegradabilità portano a risultati variabili e spesso imprevedibili.

Per questo motivo lo scopo del presente elaborato è stato (1) quello di ricercare quali sono gli effetti di un pretrattamento applicato sulla biomassa algale che lo rendono efficace a prescindere dalle caratteristiche specifiche del substrato e (2) valutare la crescita su refluo della specie *E. gracilis* che, per via delle caratteristiche della sua parete cellulare, si presenta come un substrato più facilmente biodegradabile rispetto alle alghe verdi comunemente utilizzate nei processi di depurazione.

La valutazione dell'effetto dei pretrattamenti è stata svolta utilizzando quattro diversi campioni composti rispettivamente da: popolazione mista, *Chlorella sorokiniana*, *Scenedesmus obliquus* ed *Euglena gracilis* a cui sono stati applicati pretrattamenti termici, chimici e biologici. È stato sviluppato un ampio protocollo analitico composto da valutazioni sull'integrità delle singole cellule, sulla solubilizzazione di composti presenti, sullo stato dei pigmenti clorofilliani e infine da una misura della biodegradabilità tramite prove di digestione anaerobica in batch.

L'ampio ventaglio di misure utilizzate ha permesso di ottenere una visione globale sugli effetti dei pretrattamenti e, grazie all'analisi integrata di tutte queste misure, è stato possibile esplorare le modalità di azione di ogni pretrattamento e avanzare delle ipotesi su quali siano gli effetti dei pretrattamenti che producono un impatto positivo sulla resa metanigena del campione algale. In un'ottica di alleggerimento del protocollo è stato inoltre proposto un set di indicatori che possono essere costruiti a partire da misure di facile esecuzione dalle quali estrarre le stesse informazioni ottenute in questa sperimentazione.

Come ci si aspettava, dalle prove di digestione anaerobica eseguite è emersa una grande variabilità nelle produzioni di metano ottenute; la resa di metano dei campioni non trattati è infatti oscillata tra 150-300 mL CH<sub>4</sub>/gSSV ed i pretrattamenti hanno portato incrementi compresi tra -20% e + 75%.

I pretrattamenti effettuati hanno mostrato delle modalità di azione in parte indipendenti dal substrato utilizzato.

I pretrattamenti termici agiscono solubilizzando i detriti di fondo del campione, le temperature applicate non consentono la solubilizzazione della biomassa algale ma la parete cellulare risulta più scabra. L'aumento della scabrezza è inoltre legata ad una maggiore permeabilità della parete che consente la fuoriuscita di materiale cellulare e metaboliti interni, soprattutto di natura proteica. Questi pretrattamenti inoltre mostrano un effetto denaturante nei confronti dei pigmenti clorofilliani ancora presenti nella cellula o rilasciati in fase solubile. Tuttavia tutti questi effetti appena descritti non comportano incrementi significativi nella resa finale di metano delle prove di

digestione, si nota piuttosto una tendenza all'incremento della cinetica di produzione. Ciò significa che i pretrattamenti termici non rendono biodisponibile ai batteri anaerobici nuovo materiale organico, bensì rendono parte del materiale già biodisponibile più rapidamente biodegradabile poiché ne solubilizzano una parte. L'unica prova di pretrattamento enzimatico eseguita ha provocato una forte solubilizzazione del campione, l'aumento delle permeabilità della parete e il conseguente rilascio di materiale organico.

Il pretrattamento acido solubilizza il materiale di fondo e provoca idrolisi parziale della parete con conseguente rilascio di metaboliti e pigmenti proporzionale alla resistenza della parete cellulare delle alghe. L'entità di questi fenomeni tuttavia non è paragonabile a quella conseguita con i pretrattamenti termici. Gli incrementi conseguiti variano da +4% a + 29% ed anche in questo caso non risultano correlati al grado di idrolisi conseguito.

Il pretrattamento basico non mostra mai variazioni a livello di conformazione della parete cellulare, né provoca rilascio di metaboliti interni. Si osserva invece un netto effetto di riduzione della dimensione delle alghe che produce un incremento nei valori di assorbanza della clorofilla A. Lo stesso effetto più marcato è visibile nei campioni pretrattati tramite sonicazione, a seguito di cui si ottiene anche un effetto di disgregazione della biomassa. Questi pretrattamenti sono quelli che hanno comportato gli incrementi maggiori, variabili tra -2% e +77%, nonostante non agiscano solubilizzando il contenuto interno della cellula né di altro materiale. Ad essi infatti non è mai associato un incremento nelle cinetiche di degradazione anaerobica.

Le prove di pretrattamento eseguite nell'ambito del presente elaborato fanno presumere che la solubilizzazione del campione e il rilascio di metaboliti interni non aumenti la biodegradabilità finale del campione, al contrario i risultati mostrano che la frammentazione e la riduzione delle dimensioni della biomassa sono correlati ad una minore resistenza all'idrolisi enzimatica da parte dei batteri anaerobici. I pretrattamenti più efficaci dunque agiscono in modo tale da favorire la successiva idrolisi enzimatica del materiale particolato da parte dei batteri anaerobici, ma non si sostituiscono a questa, come dimostrano chiaramente le cinetiche di produzione di metano della specie *Chlorella sorokiniana*.

Bisogna sottolineare a questo punto che gli incrementi maggiori si sono verificati nei campioni in cui la degradabilità del campione di partenza è risultata particolarmente bassa, mentre nei campioni caratterizzati da una biodegradabilità maggiore del 50% gli incrementi non hanno mai superato il 20%. L'applicazione dei pretrattamenti è dunque una via conveniente da percorrere solo per i substrati particolarmente refrattari.

I risultati ottenuti dalle prove di valorizzazione mostrano che la specie *E. gracilis* è caratterizzata dalla più alta biodegradabilità del campione non trattato (58%) che raggiunge valori intorno al 70% a seguito di pretrattamenti chimici, la durata della prova inoltre è risultata decisamente inferiore alle altre, caratteristica particolarmente utile per un successivo scale-up. La digestione anaerobica di questo substrato si configura dunque come un'opzione particolarmente interessante sia non pretrattando il campione sia studiando le condizioni ottimali per eseguire un pretrattamento chimico.

Partendo dagli incoraggianti risultati ottenuti in fase di valorizzazione si è deciso dunque di valutare le potenzialità della specie algale per quanto riguarda la crescita su refluo, secondo obiettivo della sperimentazione.

Dalle due prove eseguite in batch è stato possibile valutare il rateo di crescita dell'alga, la sua produttività e la cinetica di rimozione dell'ammonio su medium sintetico. È emersa una buona capacità della specie di adattarsi a condizioni aerobiche e a condizioni di carenza di ossigeno disciolto, nonché una buona produttività. La crescita su refluo proveniente da macellazione invece è risultata fortemente inibita, questa si è mantenuta stazionaria senza mostrare mai una fase esponenziale finché non è occorso il decadimento cellulare per via di una proliferazione di batteri che è stata osservata al microscopio. È necessario dunque variare le modalità operative ed eseguire prove di coltivazione su reflui differenti per poter individuare le condizioni di crescita ottimali della specie.

In prospettiva di sviluppi futuri potrebbe essere interessante applicare il protocollo validato nel presente elaborato su altri campioni algali composti da specie pure e da campioni misti al fine di validarlo e di verificare la correlazione tra riduzione delle dimensioni della biomassa algale e aumento della biodegradabilità ipotizzata nel corso di questa sperimentazione.

Risultano inoltre particolarmente incoraggianti i risultati ottenuti dalla digestione di *E. gracilis*, motivo per cui è fortemente auspicabile individuare le condizioni ottimali di crescita di questa specie su refluo per poter successivamente verificarne la competitività in colonne aperte, poiché la sua integrazione nei processi di trattamento delle acque reflue sembra estremamente favorevole.

## APPENDICE

---

Si riportano di seguito i risultati ottenuti dalle analisi con il citofluorimetro dei campioni CHL, SC ed EU sui piani FSC-SSC, APC-FITC e FSC-autofluorescenza (APC o PerCP).

Sul piano APC-FITC è stata stabilita una soglia minima di APC compresa tra  $10^3$  e  $10^4$  per identificare la popolazione algale presente. Tutti i solidi con APC inferiore al valore soglia sono stati giudicati privi di pigmenti clorofilliani e dunque appartenenti ad una popolazione batterica o a detriti di varia natura presenti nel campione.

Una volta individuate le popolazioni presenti si possono osservare le variazioni che queste subiscono in termini dimensionali (FSC), di forma e complessità (SSC) e fluorescenza (APC e PerCP).

Nell'ambito del presente elaborato queste differenze sono state valutate in funzione del parametro dimensionale FSC, motivo per cui tutti i grafici mostrati di seguito presentano come asse x il parametro FSC. Solo per il campione non trattato di ogni set è mostrato il grafico APC-FITC e le aree che individuano le varie popolazioni.

Per ogni campione sono mostrati i grafici FSC-SSC e APC-FSC, nei quali sono state mantenute le aree di delimitazione della popolazione algale del campione non trattato, per evidenziare eventuali differenze. In questa sede sono anche riportati gli istogrammi relativi ai tre parametri sopra citati, nei grafici sono stati mantenuti i valori delle mediane del corrispondente campione non trattato per facilitare il confronto.

Set CHL (*Chlorella sorokiniana*)

CHL.NT

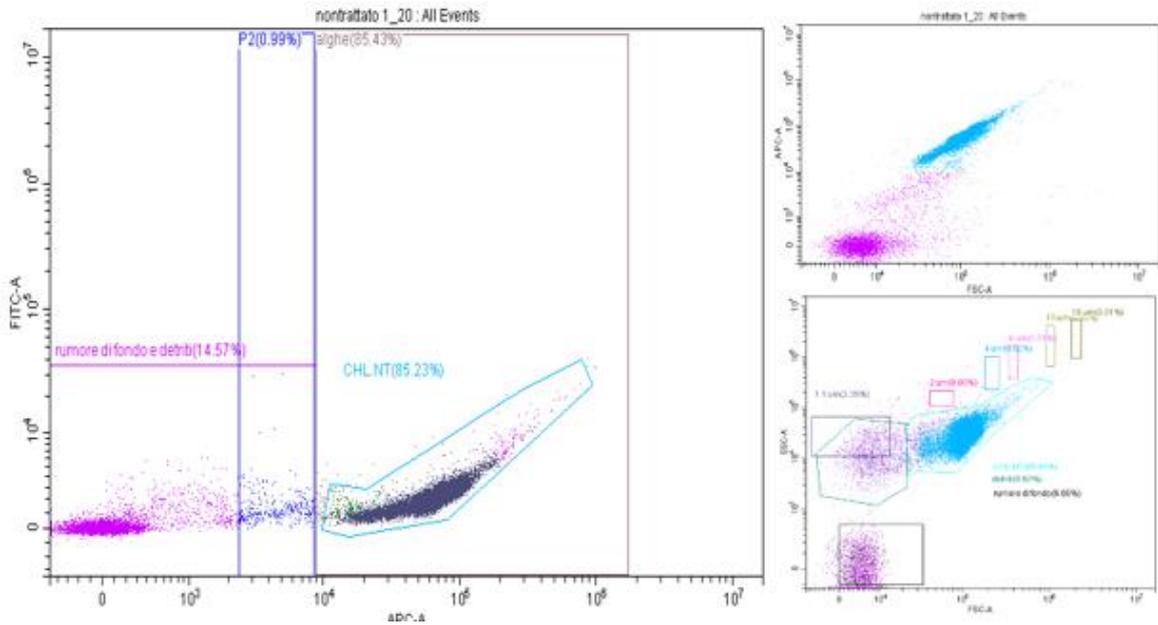


Figura 0.1: Rappresentazione del campione CHL.NT. A sx: APC-FITC. In alto a dx: FSC-SSC. In basso a dx: FSC-SSC.

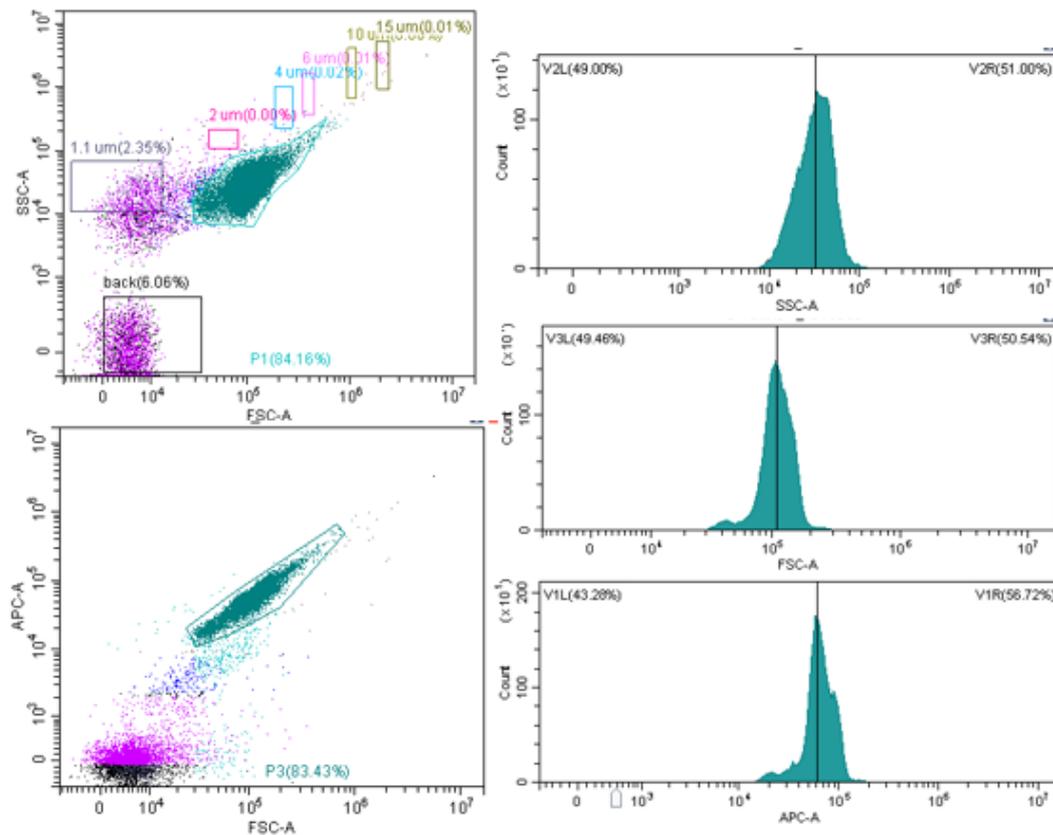


Figura 0.2: rappresentazione del campione CHL.NT sui piani FSC-SSC e FSC-APC con relativi istogrammi



Set SC (*Scendesmus obliquus*)

SC.NT

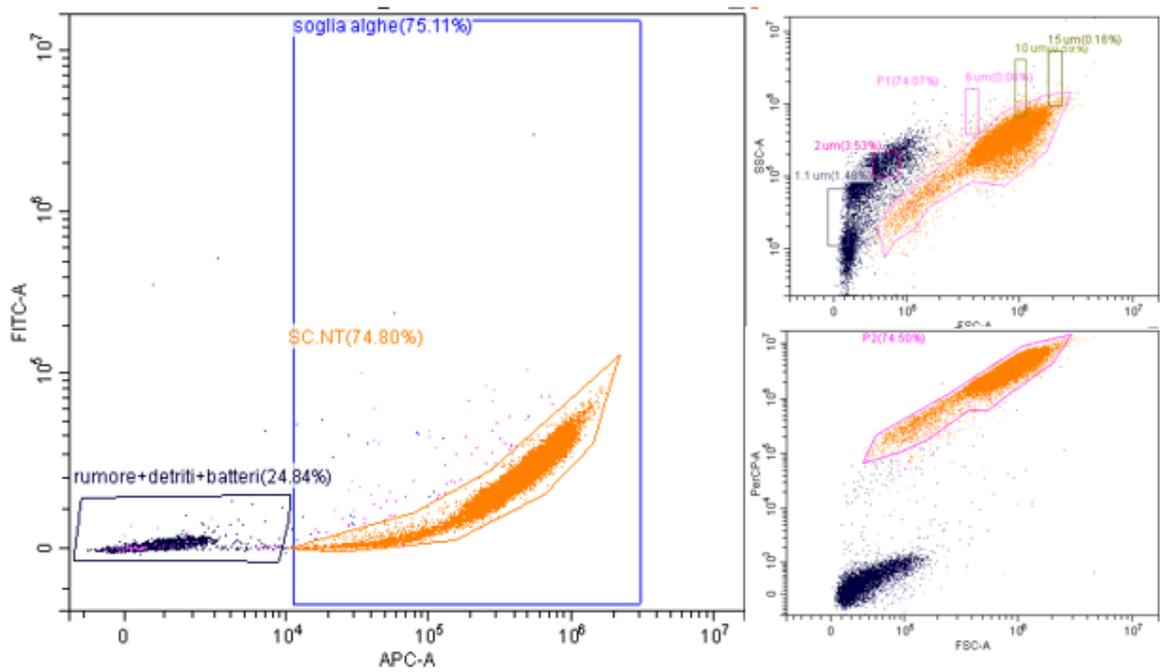


Figura 0.4: Rappresentazione del campione SC.NT. A sx: APC-FITC. In alto a dx: FSC-SSC. In basso a dx: FSC-SSC

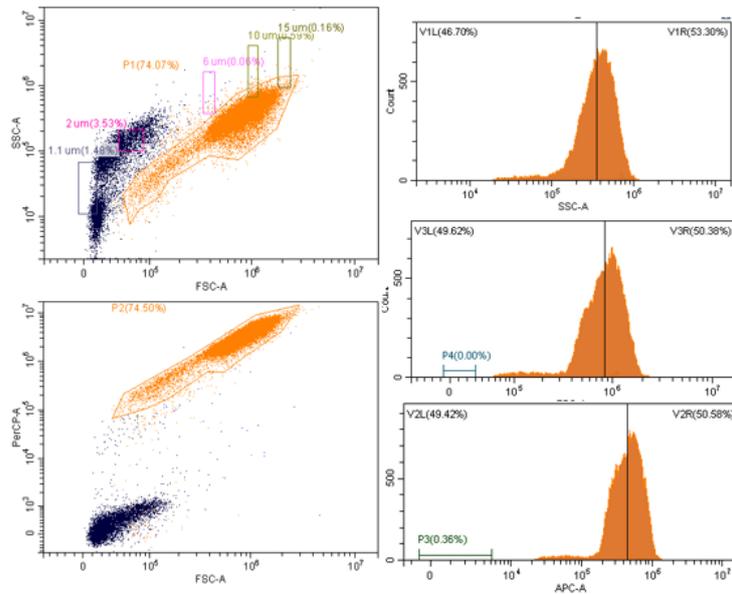


Figura 0.5: rappresentazione del campione SC.NT sui piani FSC-SSC e FSC-PerCP con relativi istogrammi

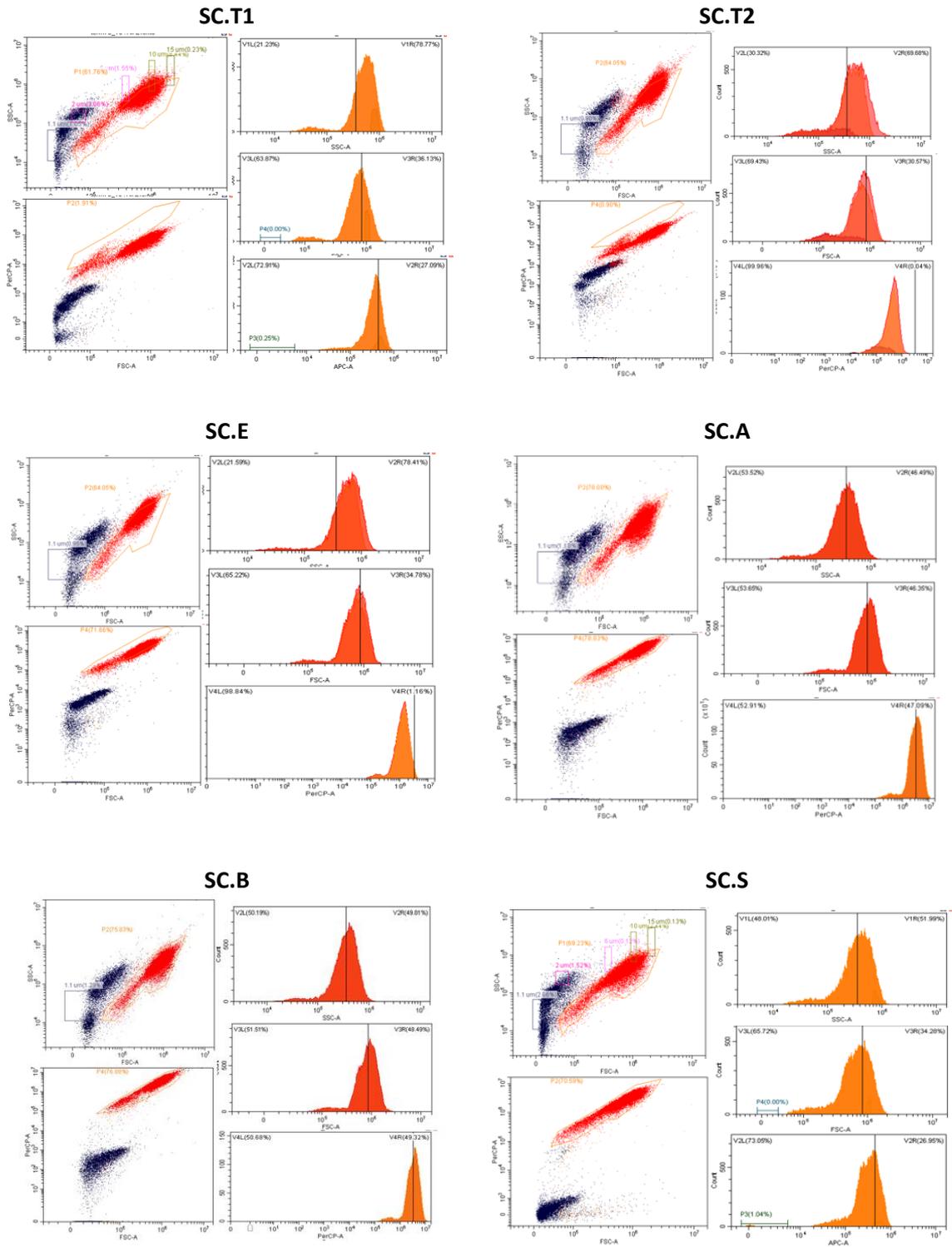


Figura 0.6: Rappresentazione del set SC sui piani FSC-SSC e FSC-PerCP e relativi istogrammi.

Set EU (*Euglena gracilis*)

EU.NT

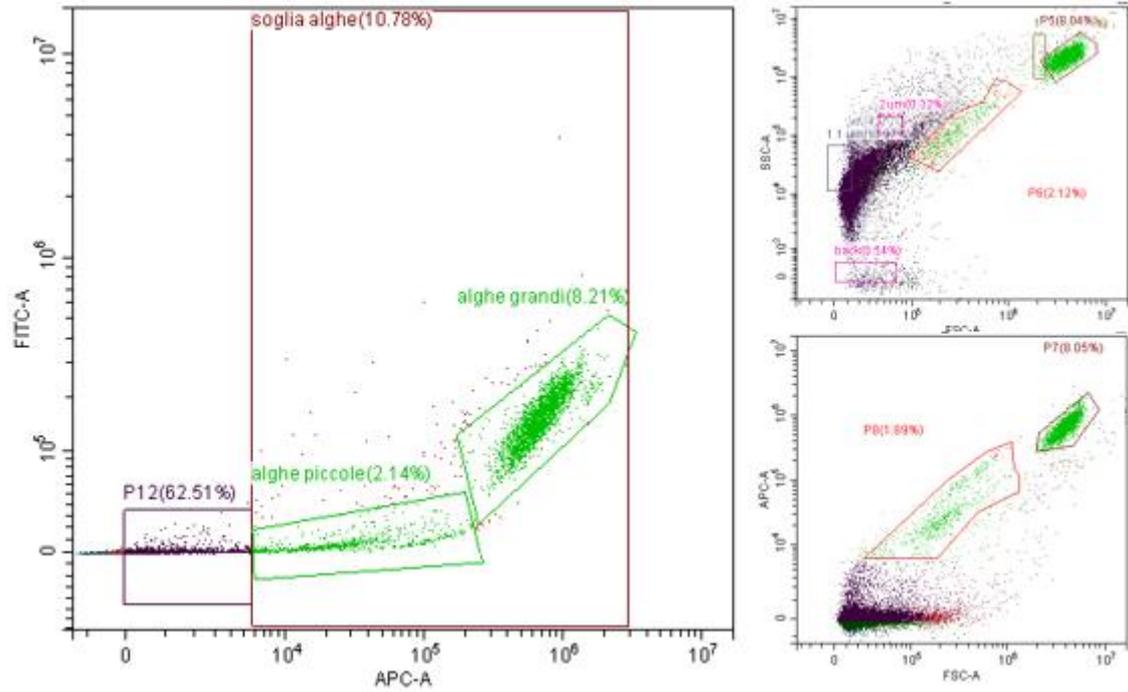


Figura 0.7: Rappresentazione del campione EU.NT. A sx: APC-FITC. In alto a dx: FSC-SSC. In basso a dx: FSC-APC

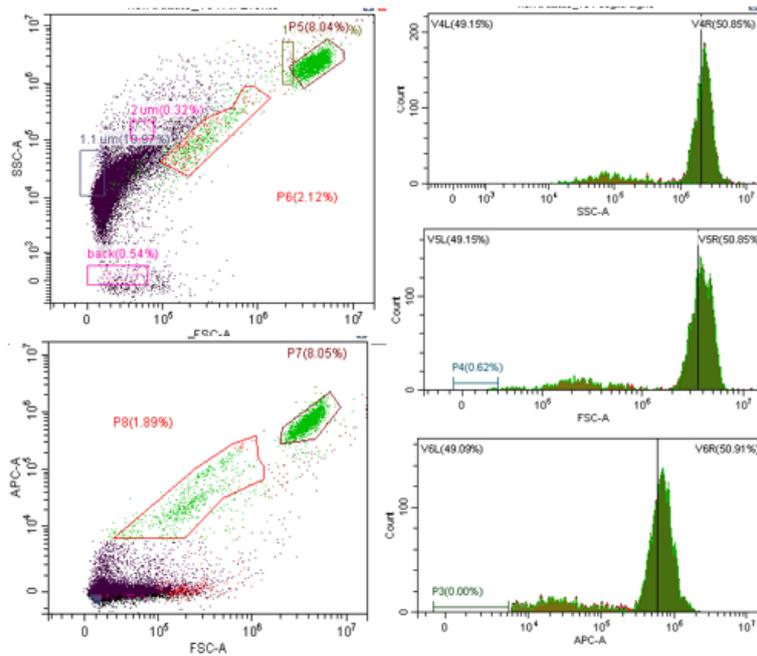


Figura 0.8: Rappresentazione del campione EU.NT sui piani FSC-SSC e FSC-APC con relativi istogrammi

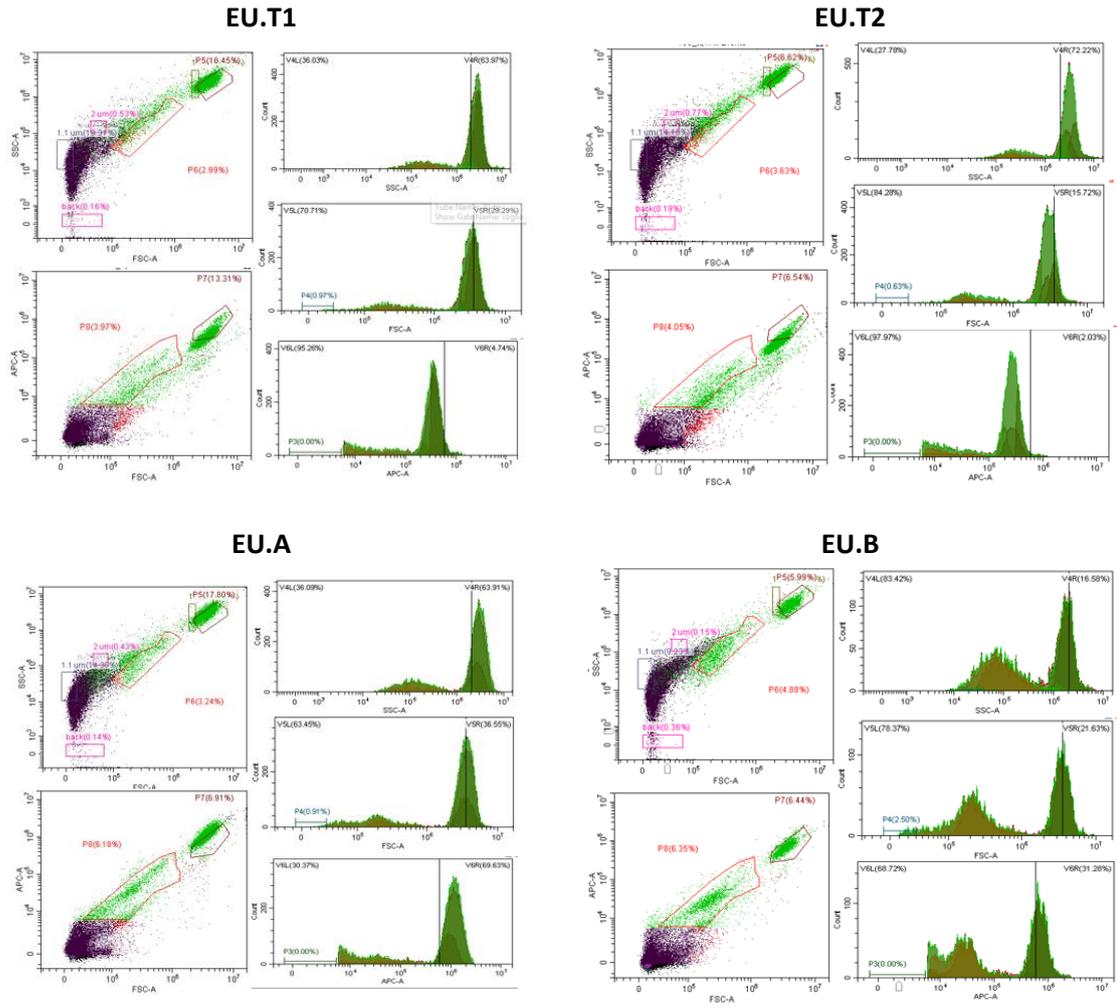


Figura 0.9: Rappresentazione del set EU sui piani FSC-SSC e FSC-APC e relativi istogrammi.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Abo-Shady , A. M., Mohamed, Y. A. & Lasheen, T., 1993. Chemical composition of the cell wall in some green algae species. *Biologia plantarum*, Vol 35, pp. 629-632.
- Allard, B. & Templier, J., 2000. Comparison of neutral lipid profile of various trilaminar outer cell wall (TLS)-containing microalgae with emphasis on algaenan occurrence. *Phytochemistry*, pp. 369-380.
- Alzate, M. E. et al., 2012. Biochemical methane potential of microalgae: Influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. *Bioresource Technology*, Vol 123, pp. 488-494.
- Angelidaki, I. & Sanders, W., 2004. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, Vol 3, pp. 117-129.
- Aoyama, K., Uemura, Y., Miyake, Y. & Asada, Y., 1997. Fermentative Metabolism to Produce Hydrogen Gas and Organic Compounds in a Cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol 83, pp. 17-20.
- AQUASTAT, 2014. *Municipal Wastewater* , s.l.: FAO.
- Arnold, A. A. et al., 2015. Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by <sup>13</sup>C solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Vol 1848, pp. 369-377.
- Asami, S. & Akazawa, T., 1978. Photooxidative Damage in Photosynthetic Activities of *Chromatium vinosum*. *Plant Physiol.*, Vol 62, pp. 981-986.
- Aslan, S. & Kapdan, I. K., 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, Vol 28, pp. 64-70.
- Atasoy, M., Owusu-Agyeman, I., Plaza, E. & Cetecioglu, Z., 2018. Bio-based volatile fatty acid production and recovery from waste streams: Current status and future challenges. *Bioresource Technology*, Vol 268, pp. 773-786.
- Bai, S. J. et al., 2011. Algicidal Effects of a Novel Marine Actinomycete on the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Current Microbiology*, Vol 62, pp. 1774-1781.
- Baudelet, P.-H., Ricochon, G., Linder, M. & Muniglia, L., 2017. A new insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Research*, Vol 25, pp. 333-371.
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M. & Das, K., 2010. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewater. *Appl. Energy.*, Vol 80, pp. 3425-3431.
- Blumreisinger, M., Meindl, D. & Loos, E., 1983. Cell wall composition of Chlorococcal algae. *Phytochemistry*, Vol 22, pp. 1603-1604.

- Bohutskyi, P., Betenbaugh, M. J. & Bouwer, E. J., 2014. The effects of alternative pretreatment strategies on anaerobic digestion and methane production from different algal strains. *Bioresource Technology*, Vol 155, pp. 366-372.
- Bold, H. C., 1949. The Morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, Sp. Nov.. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, Vol 76, pp. 101-108.
- Bonomo, L., 2008. *Trattamento delle Acque Reflue*. s.l.:McGraw-Hill Education.
- Brennan, L. & Owende, P., 2010. Biofuel from microalgae- A review of technologies from production, processing and extraction of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol 14, pp. 557-577.
- Brown, J. & French, S., 1959. Absorption spectra and relative photostability of the different forms of chlorophyll in *Chlorella*. *Plant Physiology*.
- Brunner, U. & Honegger, R., 1985. Chemical and ultrastructural studies on the distribution of sporopolleninlike biopolymers in six genera of lichen phycobionts. *Canadian Journal of Botany*, Vol 63, pp. 2221-2230.
- Buswell, A. M. & Boruff, C. S., 1932. The relation between the chemical composition of organic matter and the quality and quantity of gas produced during sludge digestion. *Sewage Works Journal*, pp. 454-460.
- Cai, T., Park, S. Y. & Li, Y., 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol 19, pp. 360-369.
- Carminati, P. et al., 2018. Biogas from mono- and co-digestion of microalgal biomass grown on piggery wastewater. *Water Science and Technology*, Vol 78, pp. 103-113.
- Chandra, R., Takeuchi, H. & Hasegawa, T., 2012. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol 16, pp. 1462-1472.
- Cheah, W. Y. et al., 2016. Cultivation in wastewaters for energy: A microalgae platform. *Applied Energy*, Vol 179, pp. 609-625.
- Cheng, M. et al., 2011. Effects of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, Vol 102, pp. 1649-1655.
- Chen, P. H. & Oswald, W. J., 1998. Thermochemical treatment for algal fermentation. *Environmental International*, Vol 24, pp. 889-897.
- Chiew, Y. L., Spångberg, J. & Baky, A., 2015. 2015. Environmental impact of recycling digested food waste as a fertilizer in agriculture – A case study. *Resources, Conservation and Recycling*, Vol 95, pp. 1-14.
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, Vol 25, pp. 294-306.
- Cho, H. U. et al., 2015. Influence of temperature on volatile fatty acid production and microbial community structure during anaerobic fermentation of microalgae. *Bioresource Technology*, Vol 191, pp. 475-480.
- Choi, H. J. & Lee, S. M., 2015. Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater. *Bioprocess Biosyst Eng*, Vol 38, pp. 761-766.

- Choi, S. P., Nguyen, M. T. & Sim, S. J., 2010. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass. *Bioresource Technology*, Vol 101, pp. 5330-5336.
- Chojnacka, K. & Marquez-Rocha, F.-J., 2004. Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. *Biotechnology*, Vol 3, pp. 21-34.
- Chojnacka, K. & Noworyta, A., 2004. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol 34, pp. 461-465.
- Cho, S. et al., 2013. Evaluation of thermal, ultrasonic and alkali pretreatment on mixed microalgal biomass to enhance anaerobic methane production. *Bioresource Technology*, Vol 143, pp. 330-336.
- Church, J. et al., 2017. Effect of salt type and concentration on the growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* in synthetic saline wastewater for biofuel production. *Bioresource Technology*, Vol 243, pp. 147-153.
- Córdova, O. et al., 2018. Microalgae digestive pretreatment for increasing biogas production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol 82, pp. 2806-2813.
- Cramer, M. & Myers, J., 1952. Growth and Photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*. *Archiv fiir Mikrobiologi*, Vol 17, pp. 384-402.
- de-Bashan, L. E. & Bashan, Y., 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, Vol 101, pp. 1611-1627.
- Delgadillo-Mirquez, L., Lopes, F., Taidi, B. & Pareau, D., 2016. Nitrogen and phosphate removal with a mixed microalgal and bacterial culture. *Biotechnology Reports*, Vol 11, pp. 18-26.
- Diaz, R. J. & Rosenberg, R., 2008. Spreading Dead Zones and Consequences for Marine Ecosystems. *Science*, Vol 321, pp. 926-929.
- Divya, D., Gopinath, L. R. & Merlin Christy, P., 2015. A review on current aspects and diverse prospects for enhancing biogas production in sustainable means. *Renewable and Sustainable Energy Sources Reviews*, Vol 42, pp. 690-699.
- Eickenscheidt, T. et al., 2014. Short-term effects of biogas digestate and cattle slurry application on greenhouse gas emissions affected by N availability from grasslands on drained fen peatlands and associated organic soils. *Biogeosciences*, Vol 11, pp. 6187-6207.
- European Biogas Association, 2014. *Biogas report 2014*, s.l.: s.n.
- European Renewable Energy Council, 2011. *Mapping Renewable Energy Pathways toward 2020*, s.l.: s.n.
- Falkowski, P. G., 2013. *Aquatic Photosynthesis*. s.l.:Princeton Univeristy Press.
- Gelin, F. et al., 1999. Distribution of aliphatic, nonhydrolyzable biopolymers in marine microalgae. *Organic Geochemistry*, Vol 30, pp. 147-159.
- Gerardi, M. H., 2003. *The microbiology of anaerobic digesters*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc..
- Gerde, J. A. et al., 2012. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresource Technology*, Vol 125, pp. 175-181.

- Gerken, H. G., Donohoe, B. & Knoshaug, E. P., 2013. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*, pp. 239-253.
- Gieskes, W. & Elbrächter, M., 1986. Abundance of nanoplankton-size chlorophyll-containing particles caused by diatom disruption in surface waters of the Southern Ocean (Antarctic Peninsula region). *Netherlands Journal of Sea Research*, pp. 291-303.
- Golueke, C. G. & Oswald, J. W., 1959. Biological conversion of light energy to the chemical energy of methane. *Applied Microbiology*, Vol 7, pp. 219-227.
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C. & Simões, M., 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Research*, Vol 24, pp. 403-415.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Benret, N. & Steyer, J., 2012a. Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Bioresource Technology*, Vol 110, pp. 610-616.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N. & Steyer, J., 2012. Thermal pretreatment to improve methane production of *Scenedesmus* biomass. *Biomass and Bioenergy*, Vol 40, pp. 105-111.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N. & Steyer, J. P., 2012. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, Vol 6, pp. 205-218.
- Grimm, P. et al., 2015. Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of  $\alpha$ -tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion. *Journal of Biotechnology*, Vol 215, pp. 72-79.
- Gunnison, D. & Alexander, M., 1975. Basis for the Resistance of Several Algae to Microbial Decomposition. *Applied Microbiology*, Vol 29, pp. 729-738.
- Harun, R., Jason, W. S. Y., Cherrington, T. & Danquah, M. K., 2011. Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. *Applied Energy*, Vol 88, pp. 3464-3467.
- Hata, J.-i. et al., 2000. Characterization of energy conversion based on metabolic flux analysis in mixotrophic liverwort cells, *Marchantia polymorpha*. *Biochemical Engineering Journal*, Vol 6, pp. 65-74.
- Heaven, S., Milledge, J. & Yue, Z., 2011. Comments on 'Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable'. *Biotechnology Advances*, Vol 29, pp. 164-167.
- Hellwig, R., 2014. *Process optimization on the chemostat system for continuous photobiological hydrogen production using Rhodospirillum rubrum*. HOCHSCHULE MITTWEIDA University of Applied Sciences: s.n.
- Hena, S., Fatimah, S. & Tabassum, S., 2015. Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. *Water Resources and Industry*, Vol 10, pp. 1-14.
- Hendriks, A. & Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, Vol 100, pp. 10-18.

- Hernández, D., Riano, B., Coca, M. & García-González, M. C., 2015. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*, Vol 262, pp. 939-945.
- Hijazi, O., Munro, S., Zerhusen, B. & Effenberger, M., 2016. Review of life cycle assessment for biogas production in Europe. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol 54, pp. 1291-1300.
- Ho, S.-H. et al., 2013. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*, Vol 135, pp. 191-198.
- Hsueh, H. T., Li, W. J., Chen, H. H. & Chu, H., 2009. Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Vol 95, pp. 33-39.
- Hu, W., 2014. *Dry Weight and Cell Density of Individual Algal and Cyanobacterial Cells for Algae Research and Development*. s.l.: University of Missouri-Columbia .
- Illman, A., Scragg, A. H. & Shales, S. W., 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb Tech*, Vol 27, pp. 631-635.
- Iluz, D., Alexandrovich, I. & Dubinsky, Z., 2014. The Enhancement of Photosynthesis by Fluctuating Light. *Artificial Photosynthesis*, pp. 115-134.
- International Lake Environment Committee, 1994. *Survey of the State of the World Lake*, s.l.: s.n.
- Jankowska, E., Chwialkowska, J., Stodolny, M. & Oleskiewicz-Popiel, P., 2017. Volatile fatty acids production during mixed culture fermentation – The impact of substrate complexity and pH. *Chemical Engineering Journal*, Vol 326, pp. 901-910.
- Jankowska, E., Sahu, A. K. & Oleskiewicz-Popiel, P., 2017. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol 75, pp. 692-709.
- Jonathan R. McMillan, I. A. W. M. A. W. J., 2013. Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment,. *Applied Energy*, Vol 103, pp. 128-134.
- Jones, C. S. & Mayfield, S. P., 2012. Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy. *Algae Biofuels*, Vol 23, pp. 346-351.
- Kaatze, U., 1995. Microwave dielectric properties of liquids. *Radiation Physics and Chemistry*, Vol 45, pp. 549-566.
- Kafle, G. K., Kim, S. H. & Sung, K. I., 2013. Ensiling of fish industry waste for biogas production: A lab scale evaluation of biochemical methane potential (BMP) and kinetics. *Bioresource Technology*, Vol 127, pp. 326-336.
- Kelemen, M. V. & Sharpe, J. E., 1979. Controlled cell disruption: a comparison of the forces required to disrupt different micro-organisms. *Journal of Cell Science*, pp. 431-441.
- Keymer, P., Ruffel, I., Pratt, S. & Lant, P., 2013. High pressure thermal hydrolysis as pre-treatment to increase the methane yield during anaerobic digestion of microalgae. *Bioresource Technology*, Vol 131, pp. 128-133.

- Khalid, A. et al., 2011. The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management, Vol 31*, pp. 1737-1744.
- Kim, B.-H. et al., 2014. Nutrient Removal and Biofuel Production in High Rate Algal Pond Using Real Municipal Wastewater. *J. Microbiol. Biotechnol, Vol 24*, pp. 1123-1132.
- Kim, S., Park, J.-e., Cho, Y.-B. & Hwang, S.-J., 2013. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology, Bioresource Technology, Vol 144*, pp. 8-13.
- Kinnumen, V. & Rintala, J., 2016. The effect of low temperature pretreatments on the solubilization and biomethane potential of microalgae biomass grown in synthetic and wastewater media. *Bioresource Technology, Vol 221*, pp. 78-84.
- Kodner, R. B., Summons, R. E. & Knoll, A. H., 2009. Phylogenetic investigation of the aliphatic, non-hydrolyzable biopolymer algaenan, with a focus on green algae. *Organic Geochemistry, Vol 40*, pp. 854-862.
- Koller, M. et al., 2012. Characteristics and potential of micro algal cultivation strategies: a review. *Journal of Cleaner Production, Vol 37*, pp. 377-388.
- Koszal, M. & Lorencowicz, E., 2015. Agricultural use of biogas digestate as a replacement fertilizers. *Agriculture and Agricultural Science Procedia, Vol 7*, pp. 119-124.
- Kouřimská, L., Poustková, I. & Babička, L., 2012. The use of digestate as a replacement of mineral fertilizers for vegetables growing. *Scientia Agriculturae Bohemica, Vol 43*, pp. 121-126.
- Krich, K. et al., 2005. *Biomethane from Dairy Waste: A Sourcebook for the Production and Use of Renewable Natural Gas in California*. s.l.:USDA Rural Development.
- Kröger, M. & Müller-Langer, F., 2012. Review on possible algal-biofuel production processes. *Biofuels, Vol 3*, pp. 333-349.
- Lakaniemi, A.-M. et al., 2011. Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass. *Biotechnology for Biofuels, Vol 4*, pp. 2-12.
- Larsdotter, K., 2006. Wastewater treatment with microalgae – a literature review. *Vatten, Vol 62*, pp. 31-38.
- Lawrence, A. W. & McCarty, P. L., 1970. A unified basis for biological treatment design and operation. *J. Sanit. Eng. Div., ASCE, 96*, pp. 757-778.
- Lazár, D. & Ilik, P., 1997. High-temperature induced chlorophyll fluorescence changes in barley leaves Comparison of the critical temperatures determined from fluorescence induction and from fluorescence temperature curve. *Plant Science, Vol 124*, pp. 159-164.
- Lee, R. E., 2008. *Phycology*. s.l.:CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS..
- Lee, Y.-K., 2001. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology, Vol 13*, pp. 307-315.
- Lenihan, P. et al., 2010. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal, Vol 156*, pp. 395-403.
- Levine, A. & Asano, T., 2004. Recovering Sustainable Water from Wastewater. *Environmental Science and Technology, Vol 201*, pp. 202-208.

- Liang, Y., Sarkany, S. & Cui, Y., 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett*, Vol 31, pp. 1043-1049.
- Lichtenthaler, H. K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, Academic Press, Vol 148, pp. 350-382.
- Loos, E. & Meindl, D., 1982. Composition of the cell wall of *Chlorella fusca*. *Planta*, pp. 270-273.
- Lv, L. et al., 2007. Treatment of high fluoride concentration water by MgAl-CO<sub>3</sub> layered double hydroxides: Kinetic and equilibrium studies. *Water Research*, Vol 47, pp. 1534-1542.
- Mahapatra, D. M., Chanakya, . H. N. & Ramachandra, T. V., 2013. Euglena sp. as a suitable source of lipids for potential use as biofuel and sustainable wastewater treatment. *J Appl Phycol*, Vol 25, pp. 855-865.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M. & González-Fernández, C., 2014. Autohydrolysis and alkaline pretreatment effect on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. methane production. *Energy*, Vol 78, pp. 48-52.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M. & González-Fernández, C., 2015a. Protease pretreated *Chlorella vulgaris* biomass bioconversion to methane. *Fuel*, Vol 158, pp. 35-41.
- Mahdy, A. et al., 2014. Protease cell wall degradation of *Chlorella vulgaris*: Effect on methane production. *Bioresource Technology*, Vol 171, pp. 421-427.
- Mahdy, M. & Ballesteros, M., 2016. Enzymatic pretreatment of *Chlorella vulgaris* for biogas production: influence of urban wastewater as a sole nutrient source on macromolecular profile and biocatalyst efficiency. *Bioresource Technology*, Vol 199, pp. 319-325.
- Marazzi, F. et al., 2019. Outdoor pilot trial integrating a sidestream microalgae process for the treatment of centrate under non optimal climate conditions. *Algal Research*, Vol 39.
- Markou, G. & Georgakakis, D., 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, Vol 88, pp. 3389-3401.
- Marsolek, M., Kendall, E., Thompson, P. & Shuman, T., 2014. Thermal pretreatment of algae for anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, Vol 151, pp. 373-377.
- Mata, T. M., Martins, A. A. & Caetano, N. S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol 14, pp. 217-232.
- McGinn, P. J. et al., 2011. Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: opportunities and limitations. *Photosynthesis Research*, Vol 109, pp. 231-247.
- Mendez, L. et al., 2013. Effect of high pressure thermal pretreatment on *Chlorella vulgaris* biomass: Organic matter solubilisation and biochemical methane potential. *Fuel*, Vol 117, pp. 674-679.
- Mendez, L. et al., 2013. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. *Bioresource Technology*, Vol 149, pp. 136-141.

- Merzlyak, M. N. & Gitelson, A., 1995. Why and What for the Leaves Are Yellow in Autumn? On the Interpretation of Optical Spectra of Senescing Leaves. *Journal of Plant Physiology*, Vol 145, pp. 315-320.
- Metcalf & Eddy, 2014. *Wastewater engineering*. s.l.:McGraw-Hill Education.
- Mhady, A., Mendez, L., Ballesteros, M. & González-Fernández, C., 2014. Autohydrolysis and alkaline pretreatment effect on *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. methane production. *Energy*, Vol 78, pp. 48-52.
- Michelini, G. et al., 2017. From linear to circular economy: PSS conducting the transition. *Procedia CIRP* 64, Vol 64, pp. 6-2.
- Monod, J., 1949. The growth of bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.*, pp. 371-394.
- Montigelli, M. E., Tedesco, S. & Olabi, A. G., 2015. Biogas production from algal biomass: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol 43, pp. 961-972.
- Mulbry, W., Kondrar, S. & Pizarro, C., 2006. Biofertilizer for algal treatment of dairy and swine manure effluents: characterization of algal biomass as a slow release fertilizer. *Journal of vegetable science*, Vol 12, pp. 107-125.
- Muñoz, C. et al., 2014. Use of Cellulolytic Marine Bacteria for Enzymatic Pretreatment in Microalgal Biogas Production. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 80, pp. 4199-4206.
- Muñoz, R. & Guieysse, B., 2006. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*, Vol 40, pp. 2799-2815.
- Mussnug, J. H., Klassen, V., Schluter, A. & Kruse, O., 2010. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*, Vol 150, pp. 51-56.
- Mutanda, T. et al., 2011. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource technology*, Vol 102, pp. 57-70.
- Myklestad, S. M., 1995. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Science of The Total Environment*, Vol 165, pp. 155-164.
- Nakano, Y., Urade, Y., Urade, R. & Kitaoka, S., 1987. Isolation, purification and characterization of the pellicle of *Euglena gracilis*. *J Biochem*, Vol 102, pp. 1053-1063.
- Nalin Samarasinghe, S. F. R. L. W. B. F., 2012. Algal cell rupture using high pressure homogenization as a prelude to oil extraction. *Renewable Energy*, Vol 48, pp. 300-308.
- Nelson, D. & Cox, M., 2014. *I principi di biochimica di Lehninger, sesta edizione*. s.l.:Zanichelli.
- Nizami, A. et al., 2017. Waste biorefineries: Enabling circular economies in developing countries. *Bioresource Technology*, Vol 241, pp. 1101-1117.
- Northcote, D. H. & Goulding, K. J., 1958. The Chemical Composition and Structure of the Cell Wall of *Chlorella Pyrroneidosa*. *Biochemical Journal*, Vol 70, pp. 391-397.
- Ogbonda, K. H., Aminigo, R. E. & Abu, G. O., 2007. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp.. *Bioresource Technology*, Vol 98, pp. 2207-2211.

- Ogbonna, J. C., Ichige, E. & Tanaka, H., 2002. Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol 58, pp. 532-538.
- Ogbonna, J., Masui, H. & Tanaka, H., 1997. Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation – An efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. *Journal of Applied Phycology*, Vol 9, pp. 359-366.
- Okuda, K., 2002. Structure and phylogeny of cell coverings. *J Plant Res*, Vol 115, pp. 283-288.
- Olaitan, S. A. & Northcote, D. H., 1961. Polysaccharides of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochemistry Journal*, Vol 82, pp. 509-519.
- Ometto, F. et al., 2014. Impacts of microalgae pre-treatments for improved anaerobic digestion: Thermal treatment, thermal hydrolysis, ultrasound and enzymatic hydrolysis. *Water Research*, Vol 65, pp. 350-361.
- Ota, M. et al., 2015. Effects of light intensity and temperature on photoautotrophic growth of a green microalga, *Chlorococcum littorale*. *Biotechnology Reports*, Vol 7, pp. 24-29.
- Pahl, . S. L. et al., 2012. Harvesting, Thickening and Dewatering Microalgae Biomass. In: *Algae for Biofuels and Energy*. s.l.:s.n., p. Cap. 10.
- Park, J., Vraggs, R. & Shilton, A., 2011. Wastewater high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, Vol 102, pp. 35-42.
- Park, K. Y. et al., 2013. Anaerobic digestion of microalgal biomass with ultrasonic disintegration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol 85, pp. 598-692.
- Passos, F., Carretero, J. & Ferrer, I., 2015. Comparing pretreatment methods for improving microalgae anaerobic digestion: Thermal, hydrothermal, microwave and ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, Vol 279, pp. 667-672.
- Passos, F. & Ferrer, I., 2014. Microalgae Conversion to Biogas: Thermal Pretreatment Contribution on Net Energy Production. *Environmental Science and Technology*, Vol 48, pp. 7171-7178.
- Passos, F. & Ferrer, I., 2015. Influence of hydrothermal pretreatment on microalgal biomass anaerobic digestion and bioenergy production. *Water Research*, Vol 68, pp. 364-373.
- Passos, F., García, J. & Ferrer, I., 2013. Impact of low temperature pretreatment on the anaerobic digestion of microalgal biomass. *Bioresource Technology*, pp. 79-86.
- Passos, F. et al., 2015. Improving biogas production from microalgae by enzymatic pretreatment.. *Bioresource Technol*, Vol 199.
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H. & Ferrer, I., 2014. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. *Bioresource Technology*, pp. 172, pp 403-412.
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H. & Ivet, F., 2014. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review. *Bioresource Technology*, Vol 172, pp. 403-412.
- Pavlostathis, S. G. & Giraldo-Gomez, E., 1991. Kinetics of anaerobic treatments. *Water Science Technologies*, Vol 24, pp. 35-59.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., de-Bashan, L. E. & Bashan, Y., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential product. *Water Research*, Vol 45, pp. 11-36.

- Pinnekamp, J., 1983. Effects of thermal pretreatment of sewage sludge on anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, Vol 21, pp. 97-108.
- Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., Martins, F. G. & Simoes, M., 2013. Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. *Environ Sci Pollut Res*, Vol 20, pp. 5096-5105.
- Pittman, J. K., Dean, A. & Osundeko, O., 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, Vol 102, pp. 17-25.
- Pizzera, A. et al., 2019. Digestate treatment with algae-bacteria consortia: A field pilot-scale experimentation in a sub-optimal climate area. *Bioresource Technology*, Vol 274, pp. 232-243.
- Polakovičová, G., Kušnír, P., Nagyová, S. & Mikulec, J., 2012. Process Integration of Algae Production and Anaerobic Digestion. *Chemical Engineering Transaction*, Vol 29, pp. 1129-1134.
- Prajapati, S. K., Bhattacharya, A., Malik, A. & Vijay, V., 2015. Pretreatment of algal biomass using fungal crude enzymes. *Algal Research*, Vol 8, pp. 8-14.
- Pretolani, R., 2008. I vincoli delle direttiva nitrati e le nuove strategie produttive. *Agriregionieuropa*, Vol 13.
- Priyadarshani, I. & Rath, B., 2012. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*, pp. 89-100.
- Raheem, A. et al., 2018. A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. *Journal of Cleaner Production*, Vol 181, pp. 42-59.
- Rajagopal, R., Massé, D. I. & Singh, G., 2013. A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresource Technology*, Vol 143, pp. 632-641.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T. & Bux, F., 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, Vol 88, pp. 3411-3424.
- Razzak, S. A. et al., 2013. Integrated CO<sub>2</sub> capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol 27, pp. 622-653.
- Regione Lombardia, 2018. *Bollettino ufficiale, Serie ordinaria n. 47*, s.l.: s.n.
- Renaud, S. M., Thinh, L.-V., Lambrinidis, G. & Parry, D. L., 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, Vol 211, pp. 195-214.
- Renuka, N. et al., 2016. Exploring the efficacy of wastewater-grown microalgal biomass as a biofertilizer for wheat. *Environ Sci Pollut Res*, Vol 23, pp. 6608-6620.
- Reynolds, C. S., 2006. *The Ecology of Phytoplankton*. s.l.:Cambridge University Press.
- Richmond, A., 2013. *Handbook of Microalgal culture*. s.l.:WILEY Blackwell.
- Roberts, K., Heaven, S. & Banks, C. J., 2016. Comparative testing of energy yields from micro-algal biomass cultures processed via anaerobic digestion. *Renewable Energy*, Vol 87, pp. 744-753.

- Roberts, K. P., Heaven, S. & Banks, C. J., 2016. Comparative testing of energy yields from microalgal biomass cultures processed via anaerobic digestion. *Renewable Energy*, Vol 87, pp. 744-753.
- Rodriguez, C. et al., 2015. Pre-treatment techniques used for anaerobic digestion of algae. *Fuel Processing Technology*, Vol 138, pp. 765-779.
- Safi, C. et al., 2015. Understanding the effect of cell disruption methods on the diffusion of *Chlorella vulgaris* proteins and pigments in the aqueous phase. *Algal Research*, Vol 8, pp. 61-68.
- Saharan, B. S. et al., 2013. TOWARDS ALGAL BIOFUEL PRODUCTION: A CONCEPT OF GREEN BIOENERGY DEVELOPMENT. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, Vol 12, pp. 1-21.
- Sam Q.K. Law, S. M. M. A. P. J. S. G. J. M., 2018. Emulsifying properties of ruptured microalgae cells: Barriers to lipid extraction or promising biosurfactants?. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol 170, pp. 438-446.
- Samson, R. & Leduy, A., 1983. Influence of mechanical and thermochemical pretreatments on anaerobic digestion of *Spirulinamaxima* algal biomass. *Biotechnology Letters*, Vol 5, pp. 671-676.
- Santiago-Martínez, G. et al., 2015. Cadmium removal by *Euglena gracilis* is enhanced under anaerobic growth conditions. *Journal of Hazardous Materials*, Vol 288, pp. 104-112.
- Saratale, R. G., Gopalakrishnan, K., Banu, R. & Xia, A., 2018. A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. *Bioresource Technology*, Vol 262, pp. 319-322.
- Scarlat, N., Dallemand, J.-F. & Fernando, F., 2018. Biogas: developments and perspective in Europe. *Renewable Energy*, Vol 129, pp. 457-472.
- Schwede, S. et al., 2013. Effects of thermal pretreatment on anaerobic digestion of *Nannochloropsis salina* biomass. *Bioresource Technology*, Vol 143, pp. 505-511.
- Seiichi Morita, H. U. R. K., 1999. Characterization and on-line monitoring of cell disruption and lysis using dielectric measurement. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol 88, pp. 78-84.
- Se-Kwon, K., 2015. *Handbook of marine microalgae*. s.l.:Se-Kwon Kim.
- Shan, J. et al., 2001. Changes of absorption spectra during heat-induced denaturation of Photosystem II core antenna complexes CP43 and CP47: revealing the binding states of chlorophyll molecules in these two complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Vol 1504, pp. 396-408.
- Shapiro, H., 1995. *Practical Flow Cytometry*. 3rd ed. a cura di New York.: Alan R. Liss.
- Shirvani, T. et al., 2011. Life cycle Energy and Greenhouse gas analysis for algae derived biodiesel. *Energy and Environmental Science*, Vol 4, pp. 3773-3778.
- Shokrkar, H., Ebrahimi, S. & Zamani, M., 2017. Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture,. *Fuel*, Vol 200, pp. 380-386.
- Shuba, E. S. & Kifle, D., 2018. Microalgae to biofuels: 'Promising' alternative and renewable energy, review. *Renewable and Sustainable Energy REviews*, Vol 88, pp. 743-755.
- Sialve, B., Bernet, N. & Bernard, O., 2009. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, Elsevier, pp. 27(4), pp.409-416.

- Singh, S. P. & Singh, P., 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol 50, pp. 431-444.
- Solé-Bundó, M., Carrere, H., Garfí, A. & Ferrer, I., 2017. Enhancement of microalgae anaerobic digestion by thermo-alkaline pretreatment with lime (CaO). *Algal Research*, Vol 24, pp. 199-206.
- Spiden, E. M., Scales, P. J., Kentish, S. E. & Martin, G. J., 2013. Critical analysis of quantitative indicators of cell disruption applied to *Saccharomyces cerevisiae* processed with an industrial high pressure homogenizer. *Biochemical Engineering Journal*, Vol 70, pp. 120-126.
- Spiden, E. M. et al., 2015. The effects of acidic and thermal pretreatment on the mechanical rupture of two industrially relevant microalgae: *Chlorella* sp. and *Navicula* sp.. *Algal Research*, Vol 7, pp. 5-10.
- Spiden, E. M. et al., 2013. Quantitative evaluation of the ease of rupture of industrially promising microalgae by high pressure homogenization. *Bioresource Technology*, Vol 140, pp. 165-171.
- Spiden, E. et al., 2014. The effects of acidic and thermal pretreatment on the mechanical rupture of two industrially relevant microalgae: *Chlorella* sp. and *Navicula* sp. *Algal Research*, pp. 7-10.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol 101, pp. 87-96.
- Staehelein, A. L. & Pickett-Heaps, J. D., 1975. The ultrastructure of *Scenedesmus* (Chlorophyceae). Species with the "reticulate" or "warty" type of ornamental layer. *Phycology*, Vol 11, pp. 163-185.
- Sunjin, K., Park, J.-e., Cho, Y.-B. & Hwang, S.-J., 2013. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*, Vol 144, pp. 8-13.
- Su, Y., Mennerich, A. & Urban, B., 2011. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water Research*, Vol 45, pp. 3351-3358.
- Takeda, H., 1996. Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. *Phytochemistry*, Vol 42, pp. 673-675.
- Tambone, F. et al., 2010. Assessing amendment and fertilizing properties of digestates from anaerobic. *Chemosphere*, Vol 81, pp. 577-583.
- Thomas, L. H. et al., 2013. Structure of Cellulose Microfibrils in Primary Cell Walls from Collenchyma. *Plant Physiology*, Vol 161, pp. 465-476.
- Thorin, E., Olsson, J., Schwede, S. & Nehrenheim, E., 2017. Biogas from Co-digestion of Sewage Sludge and Microalgae. *Energy Procedia*, Vol 105, pp. 1037-1042.
- Tjørve, K. M. C. & Tjørve, E., 2017. The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLoS ONE*, Vol 12, pp. 1-17.
- Tomita, Y. et al., 2016. Succinate and Lactate Production from *Euglena gracilis* during Dark, Anaerobic Conditions. *Microbiology Journal*, Vol 7, pp. 1-8.

- Torihara, K. & Kishimoto, N., 2015. Evaluation of Growth Characteristics of *Euglena gracilis* for Microalgal Biomass Production Using Wastewater. *Journal of Water and Environment Technology*, Vol 13, pp. 195-205.
- Torres, Á. et al., 2013. Challenges for Cost-Effective Microalgae Anaerobic Digestion. *Biodegradation - Engineering and Technol*, pp. 139-159.
- Torrijos, M., 2016. State of Development of Biogas Production in Europe. *Procedia Environmental Sciences*, Vol 35, pp. 881-889.
- Valero, D., Montes, J. A., Rico, J. L. & Rico, C., 2016. Influence of headspace pressure on methane production in Biochemical Methane Potential (BMP) tests. *Waste Management*, Vol 48, pp. 193-198.
- van der Hoek, J. P., de Fooij, H. & Struker, A., 2016. Wastewater as a resource: Strategies to recover resources from Amsterdam's wastewater. *Resources, Conservation and Recycling*, Vol 113, pp. 53-64.
- Van Donk, E., Lurling, M., Hessen, D. O. & Lokhorst, G. M., 1997. Altered cell wall morphology in nutrient-deficient phytoplankton and its impact on grazers. *Limnol. Oceanogr.*, Vol 4, pp. 357-364.
- Vanegas, C. & Bartlett, J., 2013. Green energy from marine algae: biogas production and composition from the anaerobic digestion of Irish seaweed species.. *Environmental Technology*, Vol 34, pp. 13-16.
- Vavilin, V. A., Fernandez, B., Palatsi, J. & Flotats, X., 2008. Hydrolysis kinetics in anaerobic degradation of particulate organic material: An overview. *Waste Management*, Vol 28, pp. 939-951.
- Wang, M., Kuo-Dahab, W. C., Dolan, S. & Park, C., 2014. Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp., in wastewater treatment. *Bioresource Technology*, Vol 154, pp. 131-137.
- Wang, M., Sahu, A., Rusten, B. & Paek, C., 2013. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. and waste activated sludge. *Bioresource Technology*, Vol 142, pp. 585-590.
- Wang, M. & Yuan, W., 2015. Microalgal cell disruption in a high-power ultrasonic flow system. *Bioresource Technology*, Vol 193, pp. 171-177.
- Wang, M. et al., 2014. Disruption of microalgal cells using high-frequency focused ultrasound. *Bioresource Technology*, Vol 153, pp. 315-321.
- Ward, A. J., Lewis, D. M. & Green, F. B., 2014. Anaerobic digestion of algae biomass: a review. *Algal Research*, Vol 5, pp. 204-214.
- Weiland, P., 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol 85, pp. 849-860.
- Wieczorek, N., Kucuker, M. A. & Kuchta, K., 2014. Fermentative hydrogen and methane production from microalgal. *Applied Energy*, Vol 132, pp. 108-117.
- Williams, P. J., Thomas, D. N. & Reynolds, C. S., 2008. *Phytoplankton Productivity*. s.l.:John Wiley & Sons.

- Wojciech, M., Budzianowski & Brodacka, M., 2017. Biomethane storage: Evaluation of technologies, end uses, business models, and sustainability. *Energy Conversion and Management*, Vol 141, pp. 254-273.
- Wong, H. O. B. M. A., 1997. Cumulative sedimentation analysis of Escherichia coli debris size. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol 55, pp. 556-564.
- Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G. & Ying-xue, S., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga Scenedesmus sp.. *Bioresource Technology*, Vol 101, pp. 5494-5500.
- Yamada, T. & Sakaguchi, K., 1982. Comparative Studies on Chlorella Cell Walls: Induction of Protoplast Formation. *Archives of Microbiology*, Vol 132, pp. 10-13.
- Yamane, Y., Utsunomiya, T., Watanabe, M. & Sasaki, K., 2001. Biomass production in mixotrophic culture of Euglena gracilis under acidic condition and its growth energetics. *Biotechnology Letters*, Vol 23, pp. 1223-1228.
- Yang, J. et al., 2011. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrient balance. *Bioresource Technology*, Vol 102, pp. 159-165.
- Yap, B. H. J. et al., 2014. A mechanistic study of algal cell disruption and its effect on lipid recovery by solvent extraction. *Algal Research*, Vol 5, pp. 112-120.
- Yokota, A., Harada, A. & Kitaoka, S., 1989. Characterization of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase-Oxygenase from Euglena gracilis Z. *Journal of Biochemistry*, Vol 105, pp. 400-405.
- Zaslavskaja, L. A. et al., 2001. Trophic Conversion of an Obligate Photoautotrophic Organism Through Metabolic Engineering. *Science*, Vol 292, pp. 2073-2075.
- Zhou, N. et al., 2011. Hydrolysis of Chlorella biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl<sub>2</sub>. *Bioresource Technology*, Vol 102, pp. 10158-10161.