

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E
NATURALI

Corso di laurea magistrale in SCIENZE PER L'AMBIENTE

Utilizzo di *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae)
nel trattamento delle acque reflue municipali
in vista di una futura applicazione nel campo
delle energie rinnovabili

Tesi di laurea in Botanica marina applicata

Relatore

Prof. Rossella Pistocchi

Presentata da

Ilaria Sedda

Correlatore

Dott.ssa Giulia Samorì

(III sessione)

Anno Accademico 2010-2011

<u>INTRODUZIONE</u>	<u>1</u>
<u>CAPITOLO 1: METODI DI COLTIVAZIONE DELLE MICROALGHE</u>	<u>5</u>
1-1 SISTEMI ALL'APERTO	7
1-2 SISTEMI CHIUSI	9
<u>CAPITOLO 2: UTILIZZO DI MICROALGHE PER LA PRODUZIONE DI BIOCARBURANTI</u>	<u>13</u>
2-1 BIODIESEL	16
2-2 BIOETANOLO	16
2-3 BIOCARBURANTI DA MICROALGHE	17
<u>CAPITOLO 3: DEPURAZIONE ACQUE DI SCARICO</u>	<u>21</u>
3-1 NORMATIVA ITALIANA IN RIFERIMENTO AI TRATTAMENTI DELLE ACQUE REFLUE	26
3-2 UTILIZZO DI MICROALGHE PER LA DEPURAZIONE DEI REFLUI URBANI	29
<u>CAPITOLO 4: SCENEDESMUS SP.</u>	<u>31</u>
<u>SCOPO DELLO STUDIO</u>	<u>35</u>
<u>CAPITOLO 5: MATERIALI E METODI</u>	<u>39</u>
5-1 MANTENIMENTO DEI CEPPI ALGALI E TECNICHE DI COLTURA (SEMICONTINUO E BATCH)	41
5-1.1 STUDIO IN SEMI-CONTINUO	42
5-1.2 STUDIO CON COLTURA BATCH	42
5-2 VALUTAZIONE DELLA CRESCITA ALGALE	44
5-2.1 SOLIDI	44
5-2.2 SOLIDI SOSPESI TOTALI SECCATI A 103-105°C (TSS)	45
5-2.3 SOLIDI VOLATILI E RESIDUO FISSO A 550°C	46
5-3 PRODUTTIVITÀ BIOMASSA	47
5-4 TORBIDITÀ	47
5-5 MISURA DELL'ATTIVITÀ FOTOSINTETICA	48
5-6 DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE CON IL METODO DEL LOWRY	49
5-7 ESTRAZIONE DEI POLISACCARIDI CON IL METODO DI MYKLESTAD E DETERMINAZIONE DEI POLISACCARIDI CON IL METODO DI DUBOIS	51
5-8 ANALISI NUTRIENTI	53
5-8.1 METODO DEI NITRATI-METODO DELLA RIDUZIONE CON CADMIO-	53
5-8.2 METODO DELL'AMMONIO-METODO DELLA RIDUZIONE CON CADMIO-	54
5-8.3 METODO DEI NITRITI	54
5-8.4 DETERMINAZIONE DEL FOSFORO REATTIVO	55
5-9 ESTRAZIONE DEGLI ACIDI GRASSI	57

<u>CAPITOLO 6: RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	<u>59</u>
6-1 EFFETTO DEL TEMPO DI RESIDENZA IDRAULICA SUL PROCESSO DI FITODEPURAZIONE EFFETTUATO CON LA MICROALGA <i>SCENEDESMUS</i> SP.	61
6-2 EFFETTO DELLE CONDIZIONI DI COLTURA SULLA COMPOSIZIONE DELLA BIOMASSA	75
<u>CONCLUSIONI</u>	<u>87</u>
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>93</u>

Introduzione

Gli ambiente acquatici come gli stagni, i laghi, i fiumi, gli oceani ospitano una grandissima varietà di forme di vita microscopiche. L'esistenza dei microorganismi è nota fin dalla prima metà del 1600, in seguito all'invenzione dei primi microscopi, da lì in poi un susseguirsi di scienziati ha collaborato alla creazione della moderna microbiologia.

Tra i microorganismi studiati dalla società attuale stanno avendo ampio spazio le microalghe, organismi autotrofi, fotosintetici e generalmente unicellulari, che hanno ormai un ruolo estremamente importante nel campo delle biotecnologie.

Per biotecnologia si intende: "ogni tecnica che usa microorganismi, cellule, tessuti o loro parti per ottenere prodotti e/o processi utili". (US office of Technology Transfer 1991).

I primi studi sulle colture algali in laboratorio, svolti per una miglior comprensione dei meccanismi alla base della fotosintesi ossigenica, risalgono agli inizi dello scorso secolo; questo fu il punto di partenza per le prime ricerche di carattere applicativo sulle microalghe, in particolare sulle colture massive di *Chlorella* e *Scenedesmus*, in Giappone, Germania e Stati Uniti. In Italia, gli studi sulle colture algali massive sono iniziati nel 1956 presso l'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università degli Studi di Firenze.

L'obiettivo dei primi "micro-algologi applicati" era quello di ottenere proteine a basso costo da fonti inesauribili (acqua, sali minerali, luce solare) mediante la fotosintesi algale. Ben presto questo intento è stato abbandonato ed ha in qualche modo rallentato lo sviluppo della biotecnologia delle microalghe per tutta la seconda metà del XX secolo.

Oggi si assiste ad una rinascita di interesse per questo gruppo microbico, grazie alle sue innumerevoli applicazioni: produzione di integratori alimentari, mangimi, *chemicals* e farmaci, estrazione di carotenoidi e acidi grassi polinsaturi e in particolare vi è una forte attenzione per il suo enorme potenziale nel campo delle energie rinnovabili e per la depurazione delle acque reflue.

CAPITOLO 1:

Metodi di coltivazione delle
microalghe

La coltivazione di biomassa algale su larga scala, per la produzione commerciale, può essere effettuata in sistemi aperti, quali grandi vasche, stagni, canali, o in sistemi chiusi, quali fotobioreattori.

Nella scelta del sistema di coltura si tiene conto delle esigenze di coltivazione dell'alga, della qualità del prodotto che si vuole ottenere e nello stesso tempo della sua convenienza economica.

1-1 Sistemi all'aperto

I **sistemi all'aperto**, o open ponds, sono quelli che oggi hanno un maggior successo; questo si deve alla possibilità di abbattimento dei costi utilizzando la luce solare come fonte di energia e ad una semplice operatività del sistema, che richiede un minor dispendio di risorse per il mantenimento delle proprie caratteristiche.

I principali limiti sono le condizioni climatiche non costanti, i processi di evaporazione, la diffusione di CO₂ in atmosfera, la difficoltà di propagazione della luce all'interno della colonna d'acqua e la facile contaminazione delle vasche sia da parte di altre specie algali, più adattabili a quelle condizioni ma non utili per lo scopo della coltivazione, sia da parte di organismi predatori.

E' possibile suddividere i sistemi aperti in naturali (laghi, lagune e stagni) e in artificiali (vasche).

Le microalghie per crescere in un ambiente naturale devono trovare adeguate condizioni ambientali, sufficienti nutrienti e caratteristiche chimiche dell'acqua selettive per ogni specie.

Un esempio di sistemi naturali si può osservare lungo il confine nord est del lago Chad, qui si possono trovare numerosi laghi permanenti o temporanei, dove la composizione chimica dell'acquifero e la forte evaporazione crea le condizioni adatte per la crescita di *Arthrospira*, in una cultura quasi monospecifica. Questi laghi sono sistemi naturali altamente produttivi e alcuni di essi sfruttati per la produzione di biomassa per uso alimentare (Abdulquer et al. 2000).

Nei sistemi artificiali spesso la costruzione della struttura è essenzialmente dettata dalle condizioni locali e dalla disponibilità dei materiali (Becker, 1994); infatti si possono differenziare per misura, forma, materiale utilizzato, tipo di agitazione e inclinazione.

Nonostante esistano vari tipi di sistemi solo tre sono quelli utilizzati a larga scala:

- Sistemi inclinati.
- Sistemi circolari.
- Sistemi raceway.

Solo gli ultimi due, insieme ai sistemi naturali sono usati per la produzione commerciale di microalghe.

Il primo è un sistema dove la miscelazione è ottenuta attraverso il flusso di gravità; questa tecnica risente di diversi limiti tra cui la sedimentazione delle cellule nei punti di minima turbolenza, l'elevato tasso di evaporazione, la perdita di CO₂ e l'eccessivo consumo di energia per pompare la coltura all'apice della superficie inclinata.

I sistemi circolari sono costituiti da vasche rotonde fino a 45m di diametro e profondità compresa tra 30 e 70 cm. La loro creazione è molto costosa e necessitano di molta energia per l'agitazione dell'acqua che avviene tramite un braccio rotante; ciò nonostante sono molto usati in Giappone, Taiwan e in Indonesia per la produzione di biomassa di *Chlorella* (Lee, 2001).

Il raceway è un sistema di vasche con flusso continuo di acqua generato da pale rotanti che permettono anche di mantenere la coltura in circolo. È il sistema più sfruttato per la coltivazione su larga scala di specie come *Spirulina platensis*, *Dunaliella salina* ed *Haematococcus pluvialis*.

Per concludere, i sistemi all'aperto sono sicuramente i più economici ma d'altra parte anche i meno idonei per un'ampia gamma di alghe in quanto più difficili da controllare e gestire.



Open ponds

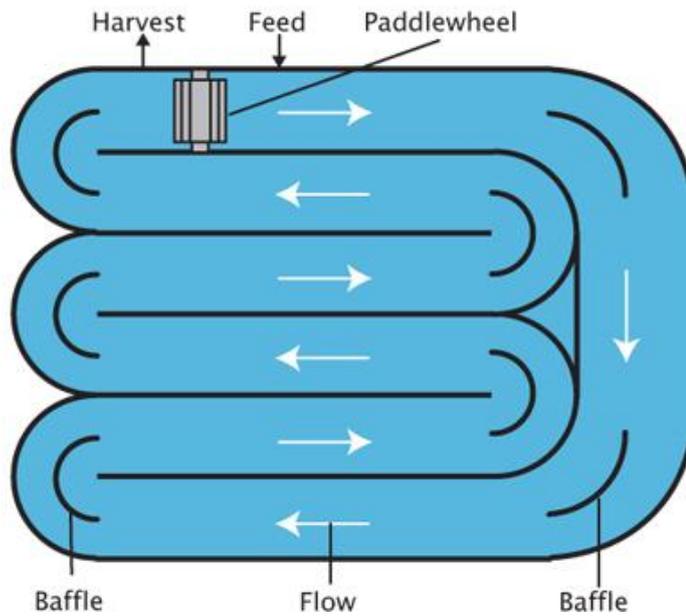


Figura 1: Sistemi all'aperto: vasche raceway (Wen Z., "2009")

1-2 Sistemi chiusi

I **sistemi chiusi** sono costituiti dai fotobioreattori.

I **fotobioreattori** sono sistemi colturali ottimali per la crescita di microrganismi fotosintetici non esposti all'atmosfera. Si differenziano per materiale costruttivo (vetro, lastre di plastica rigida, film plastici flessibili), orientamento, inclinazione (verticali, orizzontali o inclinati), sistema di agitazione.

Si suddividono in base alla forma in:

- Fotobioreattori tubolari
- Fotobioreattori piatti

I fotobioreattori sono comunemente usati nella coltivazione di alghe commerciali grazie alla loro semplicità di costruzione, alla possibilità di avere un miglior controllo del trasferimento di gas, dei parametri di coltivazione (ad es pH del mezzo) e dell'intensità luminosa.

Nella scelta del sistema di coltura si tiene conto delle esigenze di coltivazione dell'alga, della qualità del prodotto che si vuole ottenere e nello stesso tempo della sua convenienza economica.

Si è osservato come, ad esempio, per la produzione di biodisel sia preferibile l'utilizzo di un fotobioreattore tubolare piuttosto che un sistema raceway, in quanto a parità di produzione di biomassa (kg) annua e a parità di consumo di CO₂, i fotobioreattori forniscono una maggior resa di olio per ettaro; perché la produttività volumetrica nei fotobioreattori è tredici volte superiore a quella nei raceway. Inoltre il recupero della biomassa algale necessaria per l'estrazione dell'olio è meno costoso nel fotobioreattore in quanto la biomassa prodotta è trenta volte più concentrata che in una vasca raceway (Yusuf Chisti, 2007).

Una volta avviato il sistema di coltura più idoneo è necessario mantenere sotto controllo alcuni parametri fondamentali quali:

- carbonio inorganico; tutte le microalghe che hanno una crescita chemo- o fotoautotrofica utilizzano la CO₂ dissolta in acqua per sintetizzare carbonio organico (processo fotosintetico). La concentrazione relativa di carbonio inorganico influenza il valore di pH delle acque. In un sistema di coltura è necessario mantenere i valori di pH ottimali per la crescita delle microalghe in modo da prevenire un eventuale impoverimento nelle concentrazioni di carbonio utilizzabili. Per ovviare a questo problema spesso si arricchiscono i terreni di coltura con CO₂ o NaHCO₃ anche se questa integrazione di carbonio rappresenta una delle operazioni più costose necessarie.

- carbonio organico; alcune specie di microalghe sono sia autotrofe che eterotrofe, sono quindi in grado di sfruttare composti inorganici durante il giorno e composti organici durante la notte, massimizzando la produttività e la crescita.

- temperatura; questo parametro influisce sul fabbisogno nutrizionale, sulla velocità e sulla natura dei processi metabolici cellulari ed infine anche sulla composizione cellulare stessa. La temperatura ideale varia in un ampio

intervallo a seconda delle specie di microalghe. In una produzione a larga scala outdoors è fondamentale per la crescita cellulare che i valori di temperatura non decrescano più di 15-20° al di sotto del valore ottimale per la specie. La temperatura ha effetti maggiormente significativi sui processi di respirazione e fotorespirazione rispetto a quelli di fotosintesi; ad un aumento di temperatura è associato un aumento della velocità del processo di respirazione mentre è marginale l'aumento della velocità delle reazioni all'interno del ciclo di Calvin. Ad elevate temperature si può notare una diminuzione dell'efficienza del processo di fotosintesi correlata ad una diminuzione della solubilità di CO₂ e O₂ nelle colture in sospensione. La temperatura in sistemi aperti è determinata da quella dell'ambiente, dall'intensità e dalla durata dell'irradiazione solare, dall'umidità relativa che regola i processi evaporativi, dalla profondità e dall'estensione della superficie acqua/aria e anche dal tipo di materiale che costituisce la vasca o bacino di coltura.

- intensità luminosa; la luce, fonte di energia per la vita di organismi fotoautotrofici, è il principale fattore limitante nei processi fotobiologici. La velocità della fotosintesi e la sua efficienza è direttamente proporzionale all'intensità luminosa. In un sistema di coltura entra in gioco anche la densità cellulare, infatti maggiore sarà quest'ultima, minore sarà la capacità di penetrazione della luce a profondità maggiori; si vengono così a delineare due zone distinte, quella luminosa e quella buia. In colture outdoors i valori di intensità luminosa spaziano in un largo range che va da un minimo, durante le prime ore del giorno, fino ad un massimo a mezzogiorno soprattutto nel periodo estivo. Al mattino la coltura è limitata dalla bassa intensità luminosa, non appena questa aumenta la crescita cellulare subisce un'accelerazione; la coltura assorbe la luce finché non arriva ad un punto di saturazione oltre il quale l'effetto luminoso sullo sviluppo cellulare diventa di inibizione, inizialmente con un rallentamento della crescita ed in seguito con il fotodanneggiamento fino alla morte delle cellule.

Un aspetto fondamentale dei sistemi di coltura è la necessità di mescolamento; questo induce un flusso turbolento delle alghe in sospensione in modo da facilitare l'assorbimento di nutrienti ed

eventualmente l'espulsione di alcuni elementi da parte di quest'ultime, inoltre questo movimento consente una maggiore distribuzione della luce nella colonna d'acqua in modo tale da massimizzare la produzione.



Figura 2: sistemi chiusi: fotobioreattore (*Wen Z., "2009"*)

CAPITOLO 2:

Utilizzo di microalghe per la
produzione di biocarburanti

A partire dalla crisi petrolifera degli anni Settanta e, più in generale ,in conseguenza dell'instabilità dei prezzi intrinseca al mercato del petrolio, nonché alle rilevanti problematiche ambientali connesse al consumo dei combustibili fossili , molti paesi hanno guardato con crescente interesse alle fonti energetiche rinnovabili, come risposta, ancora parziale, al problema energetico.

Infatti, se i combustibili fossili hanno a lungo rappresentato una fonte energetica disponibile in grande quantità, con costi di estrazione relativamente bassi e di facile impiego dal punto di vista tecnologico; presentano anche elevati svantaggi legati alla sicurezza dell'estrazione e all'inquinamento generato dalle emissioni, per questo negli anni più recenti sono stati attivati strumenti di politica energetica volti ad incentivare l'utilizzo di fonti energetiche alternative.

I biocarburanti rappresentano una valida soluzione da contrapporre allo sfruttamento di combustibili di origine fossile.

Si definisce biocarburante “un carburante liquido o gassoso per i trasporti ricavato dalla biomassa”, definita a sua volta come “una qualsiasi sostanza di matrice organica, vegetale o animale, destinata a fini energetici o alla produzione di ammendante agricolo e che rappresenta una possibile forma di accumulo dell'energia solare”.

Un notevole impulso all'utilizzo dei biocarburanti è stato dato dal Consiglio dell'Unione Europea tenutosi l'8 ed il 9 marzo del 2007 a Bruxelles. In tale occasione è stata approvata la cosiddetta Politica Energetica per l'Europa (PEE), con la quale sono stati previsti i seguenti obiettivi entro il 2020:

- il 20% dell'energia consumata nell'Unione Europea dovrà provenire da fonti energetiche rinnovabili;
- riduzione del 20% della produzione di gas serra e del 20% il consumo di energia in edilizia, industria e trasporti;
- i biocarburanti dovranno rappresentare almeno il 10% del totale dei consumi di benzina e gasolio per l'autotrazione all'interno della UE.

Nel 2005 sono state prodotte a livello mondiale oltre 32 milioni di tonnellate di biocombustibili, Oli Vegetali (detti bioli) ed Alcool etilico; i primi vengono impiegati per realizzare un sostituto del carburante diesel e vengono catalogati come biodiesel, i secondi invece possono essere

miscelati alle benzine tradizionali in diverse quantità e possono essere rappresentati da bioetanolo o biometanolo, a seconda del prodotto da cui vengono distillati in origine.

Mentre a livello mondiale la produzione complessiva di biocombustibili è altamente sbilanciata verso la produzione di bioetanolo, corrispondente al 90% del totale di biocombustibili prodotti (dati contenuti nel rapporto dell'IEA, Biofuels for transport 2004), in Europa la situazione risulta capovolta, con il biodiesel a coprire l'81,5% della produzione europea di biocarburanti.

2-1 Biodiesel

Il biodiesel è un combustibile ottenuto da fonti rinnovabili quali oli vegetali e grassi animali, analogo al gasolio derivato dal petrolio.

L'uso di oli vegetali, come quelli di palma, soia, girasole, arachidi, oliva, come combustibili alternativi per motori diesel risale a quasi nove decenni, ma a causa del rapido calo delle riserve di petrolio greggio, è di nuovo promosso in molti paesi.

Basandosi sulle caratteristiche del suolo e sulle condizioni climatiche, molti paesi sono alla ricerca di diversi tipi di oli vegetali come sostituti dei combustibili fossili. Negli Stati Uniti, ad esempio, l'olio di soia, in Europa l'olio di colza e girasole, nel sud-est asiatico (soprattutto Malesia e Indonesia) l'olio di palma, infine nelle Filippine si sta iniziando a considerare l'olio di cocco (Barnwal, 2004).

2-2 Bioetanolo

Il bioetanolo è un alcool ottenuto mediante un processo di fermentazione alcolica dei glucidi contenuti in diversi prodotti ricchi di carboidrati e zuccheri; può essere ricavato a partire da:

- materiali ad elevato contenuto di saccarosio come la canna da zucchero e la barbabietola da zucchero;
- materiali amidacei come il mais ed il frumento;
- materiali lignocellulosici, biomasse complesse composte da diversi polisaccaridi.

2-3 Biocarbutanti da microalghe

Uno dei principali svantaggi della produzione di biocarburanti da biomassa costituita da seminativi è la necessità di destinare una parte consistente della produzione agricola del globo alla produzione di energia anziché all'alimentazione umana. Problema che viene ulteriormente aggravato se si considera che, secondo il "Rapporto FAO 2005", circa 852 milioni di persone nel mondo soffrono di malnutrizione ed ogni anno circa 6 milioni di bambini perdono la vita a causa della scarsa alimentazione. A questo problema, si aggiungono la possibilità che l'intera produzione mondiale di seminativi non sia comunque in grado di soddisfare la domanda di carburante del parco macchine mondiale, la difficoltà nel trovare terreni agricoli adatti a queste tipologie di coltivazioni ed infine il conseguente aumento del costo dei beni primari alimentari.

Il biodiesel ricavato dalle microalghe potrebbe rappresentare quindi un'ottima alternativa in grado di sostituire in termini quantitativi e qualitativi i carburanti derivanti dal petrolio senza sottrarre terreno alle colture destinate all'alimentazione umana. Le microalghe sono microrganismi fotosintetici che convertono la luce solare e l'anidride carbonica in biomassa algale; diverse specie sono in grado di produrre biolio che può essere trasformato in biodiesel. Altri vantaggi nell'utilizzo delle microalghe sono la crescita rapida di questi microrganismi rispetto alle piante terrestri, con un tempo di duplicazione che può arrivare a 3,5 ore in fase di crescita esponenziale e la necessità di occupare uno spazio più limitato a parità di resa. Per esempio, si è stimato che se un paese come gli Stati Uniti utilizzasse unicamente biodiesel come carburante per autoveicoli

e mezzi di trasporto, sarebbe necessario produrne una quantità pari a 0,53 miliardi di metri cubi l'anno (Chisti, 2007). Considerando che l'olio di palma ha una produzione di circa 5,95 metri cubi l'ettaro (Chisti, 2007), per soddisfare la domanda di biodiesel statunitense è necessario dedicare circa 111 milioni di ettari del terreno agricolo alla coltivazione di questa specie coprendo il 61% del terreno coltivabile totale. Ipotesi alquanto irrealistica poiché la restante porzione di terreno non sarebbe sufficiente a soddisfare i bisogni alimentari della popolazione. Se invece si pensasse di utilizzare una microalga fatta crescere in un sistema controllato e situato in una regione tropicale, così da ottenere una produzione giornaliera di biomassa pari a 1,535 chili al metro cubo e un contenuto di biolio pari al 30% del peso secco (Sánchez Mirón, 1999), si raggiungerebbe una produzione di biodiesel di circa 123 metri cubi per circa tutto l'anno. In queste condizioni è necessaria un'area di 5,4 milioni di ettari, ossia solo il 3% dell'area coltivabile negli Stati Uniti, per soddisfare la domanda di biodiesel statunitense (Chisti,2007).

Paragonando la produzione di biodiesel da microalghe con quella di bioetanolo da canna da zucchero emerge, come per il caso dell'olio di palma, la necessità di grandi spazi per la coltivazione di queste specie. In Brasile la produzione massima di bioetanolo da canna da zucchero ammonta a 7,5 metri cubi per ettaro (Bourne, 2007); considerando che l'energia associata al bioetanolo corrisponde a circa il 64% dell'energia associata al biodiesel è necessario produrre circa 828 milioni di metri cubi di bioetanolo, corrispondenti ad una superficie di 111 milioni di ettari, per ottenere un'energia pari a quella associata a 0,53 miliardi di metri cubi di biodiesel (Chisti, 2007).

Anche dal punto di vista del bilancio energetico è stato stimato che per una coltura algale con una produttività di 0,025 chili al metro quadro al giorno per una concentrazione di 1 chilo per metro cubo del bacino e un contenuto di olio pari al 20% del peso secco, l'energia netta ricavata annualmente è pari a 928 GJ per ettaro; mentre per una coltura da canna da zucchero la cui produttività è di circa 75 tonnellate l'anno l'energia netta ricavata annualmente è pari a 143 GJ per ettaro (Chisti, 2008).

Un ipotetico sistema di coltivazione di microalghe per la produzione di biolio prevede quattro fasi essenziali:

- coltivazione della microalga in open ponds o fotobioreattori, con apporto di acqua, nutrienti, luce e anidride carbonica;
- raccolta della biomassa tramite sedimentazione e/o centrifugazione ed eventuale riciclo di acqua e nutrienti;
- estrazione del biolio con solventi immiscibili con l'acqua, recuperabili e riciclabili; quindi trasformazione del biolio in biodiesel;
- utilizzo della restante biomassa algale in parte come mangime per gli animali e in parte sottoposta ad un processo di digestione anaerobica per la produzione di biogas che viene a sua volta utilizzato per la produzione di energia elettrica.

L'anidride carbonica prodotta dalla combustione del biogas può essere a sua volta convogliata al sistema di coltivazione della microalga rendendo quindi il processo di produzione di biodiesel pulito, senza immissioni in atmosfera di inquinanti e sostenibile in quanto l'energia richiesta per produrre e trattare la biomassa deriva dal possibile utilizzo del biodiesel stesso e dal metano che viene prodotto dalla digestione anaerobica della biomassa restante.

CAPITOLO 3:

Depurazione acque di scarico

Ogni comunità produce residui liquidi, solidi e gassosi; questi sono indicati comunemente come acque di rifiuto o acque reflue; derivano dai diversi utilizzi delle acque che vengono fornite e distribuite alla collettività. Secondo la definizione stabilita nell'Articolo 74 del Decreto Legislativo 152/2006, per liquami urbani o acque reflue urbane si intendono “acque reflue domestiche o il miscuglio di acque reflue domestiche, di acque reflue industriali ovvero meteoriche di dilavamento convogliate in reti fognarie, anche separate, e provenienti da agglomerato”.

Queste acque, dopo essere state utilizzate in diversi processi o attività di varia natura, hanno perduto le caratteristiche qualitative originarie, divenendo inadatte per un uso diretto o per un diretto sversamento in un corpo idrico.

Le acque reflue urbane presentano caratteristiche estremamente variabili, che dipendono da diversi fattori, tra cui il numero di abitanti serviti, la localizzazione geografica del nucleo urbano servito, gli usi e i costumi degli abitanti della zona e l'eventuale presenza di acque di scarico industriali.

I reflui urbani devono, pertanto, le loro caratteristiche non solo ai contributi dell'attività metabolica umana (che rappresenta comunque il maggior contributo), ma anche al fatto che nella pratica domestica si faccia uso di prodotti chimici quali detersivi, solventi, oli e acidi. E' inoltre da considerare il contributo fornito dalle acque di drenaggio delle aree urbane (strade, piazzali), e la presenza nei centri urbani di utenze come lavanderie, stazioni di servizio, laboratori artigianali e garages che scaricano nelle fognature reflui di carattere industriale.

Le numerose sostanze presenti nelle acque di scarico urbane possono essere raggruppate grossolanamente in otto categorie, come riportato in Tabella 1

<i>Categoria</i>	<i>Sostanze comprese</i>	<i>Effetti sull'ambiente</i>
Solidi sospesi	Sostanze in sospensione di natura organica e inorganica che possono depositarsi come fanghi nei corpi idrici recettori	Alterano il normale equilibrio dell'ecosistema in conseguenza dell'aumento della torbidità (limitazione della quantità di luce che penetra nell'acqua con effetti dannosi sugli organismi fotoautotrofi; riduzione e morte degli organismi bentonici sessili per eccessivo deposito di sedimenti.
Sostanze organiche Biodegradabili	Comprende tutte quelle sostanze che possono essere degradate biologicamente dagli organismi decompositori presenti in ambiente acquatico (proteine (40-60%), carboidrati (25-50%), grassi (circa 10%). La totalità delle sostanze organiche biodegradabili presenti nei liquami urbani viene comunemente espressa in termini di BOD5 (domanda biologica di ossigeno) o di COD (domanda chimica di ossigeno)	L'incremento dei normali processi di decomposizione biologica aerobica può determinare condizione di anossia.
Nutrienti	Elementi indispensabili per l'accrescimento della vita acquatica come il fosforo e l'azoto	Provocano fenomeni di eutrofizzazione (eccezionale sviluppo di fitoplacton in superficie stimolato dall'eccesso di nutrienti, con conseguente anossia dovuta al materiale biodegradabile derivante dalle alghe morte)
Microrganismi patogeni	Comprendono tutti quegli organismi che	Possibile trasmissione di infezioni, soprattutto

	sono causa di malattie infettive a trasmissione oro-fecale	se i corpi idrici ricettori dei liquami trattati possono essere utilizzati come fonti di approvvigionamento idrico, come acque adibite alla balneazione o per l'allevamento di molluschi
Sostanze prioritarie	Elenco di 33 classi di sostanze prioritarie e prioritarie pericolose adottato dalla Comunità Europea, per le quali deve essere bandito o limitato l'uso	Sostanze di cui si sospetta o si conosce l'alta tossicità, la cancerogenità, la mutagenicità e la capacità di alterare il normale funzionamento del sistema endocrino (modificatori endocrini)
Sostanze organiche refrattarie	Sostanze che non vengono degradate con i naturali processi biologici (fenoli,coloranti, pesticidi, diserbanti)	
Metalli pesanti	Elementi chimici metallici che hanno una densità relativamente alta e sono tossici in basse concentrazioni (mercurio, piombo, cromo, arsenico, cadmio, zinco)	
Solidi inorganici disciolti	Composti inorganici disciolti la cui concentrazione aumenta durante il ciclo di utilizzo dell'acqua stessa	

Tabella 1 Classificazione delle sostanze potenzialmente presenti nelle acque di scarico urbane secondo Metcalf and Eddy (1991).

Le varie classi di sostanze inquinanti possono essere presenti sia in forma solubile che associate al materiale particolato.

Al fine di salvaguardare la salute dell'uomo e proteggere l'ambiente è necessario convogliare le acque reflue in un depuratore, trattarle e infine immetterle in un corpo idrico recettore.

Il trattamento è un processo fondamentale, in quanto l'accumulo di rifiuti liquidi determinerebbe condizioni di setticizia, causati dai processi di trasformazione delle sostanze organiche contenute nelle acque di scarico, ciò determinerebbe l'insorgere di condizioni sgradevoli in seguito alla produzione di gas di odore spiacevole. Inoltre non si può sottovalutare anche l'alto contenuto di microrganismi patogeni provenienti dalle defezioni umane e l'alta concentrazione di nutrienti in grado di stimolare la crescita di piante acquatiche e sostanze tossiche, potenzialmente mutagene o cancerogene.

3-1 Normativa italiana in riferimento ai trattamenti delle acque reflue

In Italia la prima norma emanata nel settore della tutela delle acque dall'inquinamento fu la Legge n. 319/76 (cosiddetta Legge Merli), provvedimento che dettava una serie di criteri in materia di depurazione delle acque reflue. A partire dal 1980, in Italia e in altri Paesi, l'interesse si è gradualmente spostato sulla rimozione di costituenti con possibili impatti a lungo termine sulla salute umana e sull'ambiente. Gli obiettivi del trattamento devono procedere di pari passo con gli obiettivi o gli standard di qualità dell'acqua fissati dalle autorità competenti.

Per la protezione dei corpi idrici ricettori il decreto legislativo 152 del 2006 (Norme in materia ambientale) prevede dei limiti di emissione degli scarichi idrici che ricalcano essenzialmente quelli del DLgs n.152 del 11 maggio 1999, che a suo tempo aveva recepito una lunga serie di direttive comunitarie in materia di acque tra cui la direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e la direttiva 91/626/CEE sulla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole. Per quanto concerne il comparto acqua, il testo unico

sull'ambiente (DLgs 152/2006) traspone a livello nazionale la Direttiva Quadro dell'Unione Europea sulle risorse idriche (2000/60/EC).

Lo scarico di acque reflue urbane in acque superficiali è disciplinato in base all'Allegato 5 alla parte terza del testo unico. I limiti di emissione degli scarichi vengono differenziati a seconda della collocazione dei bacini idrici recettori. Per bacini idrici non ricadenti in aree sensibili ai fenomeni di eutrofizzazione o di inquinamento da nitrati, la Tabella 1 dell'Allegato 5, riportata di seguito, richiede che il trattamento dell'acqua di scarico raggiunga almeno una prefissata efficienza minima di abbattimento dei solidi sospesi e delle sostanze organiche misurate sia in termini di COD che di BOD5. In alcuni casi questi limiti variano in funzione della potenzialità dell'impianto (inferiore o superiore ai 10.000 abitanti equivalenti).

Potenzialità impianto in A.E (abitanti equivalenti)	2.000 - 10.000		> 10.000	
Parametri (media giornaliera)	Concentrazione	% Riduzione	Concentrazione	% Riduzione
BOD5 (senza nitrificazione) [mg/L]	≤ 25	70 - 90	≤ 25	80
COD [mg/L]	≤ 125	75	≤ 125	75
Solidi sospesi [mg/L]	≤ 35	90	≤ 35	90

Tabella 2. Limiti di emissione per gli impianti di trattamento di acque reflue urbane (da Tabella 1, allegato 5, parte terza, DLgs 152/2006)

Oltre a ciò, le acque reflue urbane scaricate in aree sensibili devono essere sottoposte ad un trattamento più spinto di quello richiesto per soddisfare i limiti previsti in termini di BOD5, COD e solidi sospesi. In questo caso il trattamento deve poter raggiungere elevate efficienze di rimozione anche dei nutrienti azoto e fosforo secondo quanto riportato in tabella 3.

Potenzialità impianto in A.E (abitanti equivalenti)	10.000 - 100.000		> 100.000	
Parametri (media giornaliera)	Concentrazione	% Riduzione	Concentrazione	% Riduzione
Fosforo totale [mg/L]	≤ 2	80	≤ 1	80
Azoto totale [mg/L]	≤ 15	70 - 80	≤ 10	70 - 80

Tabella 3. Limiti di emissione per gli impianti di trattamento di acque reflue urbane recapitanti in aree sensibili (da Tabella 2, allegato 5, parte terza, DLgs 152/2006).

Perché i parametri chimici, fisici e biologici dei reflui urbani rientrino nei limiti di emissione stabiliti dalle norme vigenti, prima di essere sversati nei corpi idrici recettori essi devono subire una serie di trattamenti fisici, chimici e biologici per diminuire la concentrazione del carico inquinante. I tipi di processi adottati dipendono dalle caratteristiche del liquame in entrata e dagli obiettivi di qualità perseguiti. In generale, tuttavia, un impianto di depurazione di liquami urbani prevede: trattamenti preliminari, primari, primari avanzati, secondari (con o senza rimozione di nutrienti) e avanzati (o terziari) (Metcalf e Eddy,2006), approfonditi di seguito:

PRELIMINARE: Rimozione di costituenti delle acque reflue quali stracci, bastoncini, materiali galleggianti, sabbia e grassi che possono causare problemi di manutenzione o conduzione nelle operazioni di trattamento, nei processi o nei sistemi ausiliari.

PRIMARIO: Rimozione di una porzione di solidi sospesi e materiale organico dalle acque di rifiuto.

PRIMARIO AVANZATO: Rimozione ulteriore dei solidi sospesi e della sostanza organica dalle acque reflue. Solitamente ottenuta mediante l'aggiunta di reattivi chimici o filtrazione.

SECONDARIO: Rimozione del materiale organico biodegradabile(sospeso o disciolto) e dei solidi sospesi. Anche la disinfezione viene solitamente inclusa nella definizione di trattamento secondario convenzionale.

SECONDARIO CON RIMOZIONE DEI NUTRIENTI: Rimozione della sostanza organica biodegradabile, dei solidi sospesi e dei nutrienti (azoto, fosforo o entrambi)

TERZIARIO: Rimozione dei solidi sospesi residui (dopo il trattamento secondario), solitamente mediante filtrazione su mezzo granulare o microstacciatura. Anche la disinfezione fa solitamente parte dei trattamenti terziari spesso anche la rimozione dei nutrienti è inclusa in questa definizione.

AVANZATO: Rimozione del materiale sospeso e disciolto residuo da un normale trattamento biologico, richiesta per varie applicazioni di riutilizzo dell'acqua.

3-2 Utilizzo di microalghe per la depurazione dei reflui urbani

Sistemi di coltura di microalghe mostrano una elevata versatilità che permette loro di partecipare a diversi processi, come ad esempio il trattamento delle acque reflue; che è molto vantaggioso, in quanto non genera inquinamento aggiuntivo quando la biomassa è raccolta e permette un efficiente riciclo di nutrienti (De la noie et al.,1992).

Le microalghe sono organismi che necessitano di nutrienti per la crescita, le acque reflue sono ricche di queste sostanze ed è per questo che la coltivazione di esse in un mezzo ricco di nutrienti è una soluzione vincente. Nei trattamenti secondari vengono usati processi biologici e chimici per la rimozione dei nutrienti (azoto e fosforo).

I processi chimici richiedono l'aggiunta di sostanze chimiche per consentire la rimozione dal refluo di determinati inquinanti; ciò porta a un incremento netto dei costituenti disciolti all'interno del refluo stesso.

I trattamenti biologici sono consigliati in quanto non utilizzano sostanze chimiche ma organismi quali batteri, protozoi, funghi, rotiferi e talvolta vengono utilizzate anche microalghe in quanto oltre alla depurazione la composizione della biomassa algale è interessante per la possibile produzione di biolio.

Sono ormai molti anni che si indaga sulla capacità depurativa di questi microrganismi, ma non tutti sono adatti, quelli più idonei devono avere le seguenti caratteristiche:

- _ Velocità di crescita elevata
- _ Resistenza alla tossicità dell'ammonio
- _ Tolleranza alle variazioni climatiche diurne e stagionali
- _ Formare aggregati per facilitare la raccolta

CAPITOLO 4:

Scenedesmus sp.

Tra le microalghe studiate è stata riservata molta attenzione a *Scenedesmus sp.*, sicuramente per la sua buona adattabilità a molteplici condizioni ambientali, alla sua elevata velocità di crescita e anche per le sue caratteristiche composizionali della biomassa.

Scenedesmus sp. è una microalga di acqua dolce, appartenente alla classe delle Chlorophyceae o alghe verdi.

Può presentarsi in forma singola, ma solitamente è strutturata in piccole colonie, che sono composte da 2 a 8 cellule, tenute insieme da una sostanza gelatinosa; agli estremi, di questi piccoli raggruppamenti, si trovano due coppie di spine, che sono diritte o arcuate e molto resistenti. La morfologia della colonia potrebbe mutare al variare del mezzo in cui crescono le cellule (Egan, 1989); è stato notato che in un ambiente con bassa concentrazione di fosforo o di sali, *Scenedesmus* si presenta in forma unicellulare, come il genere *Chodatella* e *Franceia* (Trainor, 1992).

Inoltre la carenza di nitrogeno induce le cellule alla formazione di zoospore (Trainor, 1963).

Il grazer è un altro fattore limitante per la morfologia della colonia, infatti molte specie di *Scenedesmus* si presentano in forma unicellulare in assenza di esso. Quando invece sono presenti organismi come *Daphnia*, è evidente la creazione di una struttura coloniale che rende le alghe meno appetibili ai predatori; questa risposta è dovuta alla produzione di infochemicals, originato dal tratto digestivo, del grazer.

Tuttavia lo stato unicellulare è vantaggioso in quanto presenta una bassa velocità di sprofondamento e un rapporto superficie-volume favorevole in termini di uptake di nutrienti e assorbimento della luce (Lurling, 1998).

La parete è di natura cellulosica ed è generalmente fornita di due, quattro o otto flagelli, deputati con la loro azione sincronica a determinare il movimento lento e a zig-zag.

Scenedesmus sp. ha alti contenuti di clorofilla e pigmenti, tra cui spiccano α e β -carotene e alcune xantofille. Inoltre sono tipicamente organismi fotosintetici, ma in assenza di luce possono comportarsi da chemioautotrofi.

Per questo si è osservato in diversi studi come *Chlorella* e *Scenedesmus* siano due buone candidate per questa applicazione.

Testando *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus dimorphus* si è osservato come entrambe dimostrino una elevata capacità di rimozione dell'ammoniaca, paragonabile a quella ottenuta in altri studi con cianobatteri come *Phormidium* e *Spirulina*, e una rimozione dei fosfati moderata (Gonzalez et al.,1997). Inoltre si è anche notato come *Scenedesmus Dimorphus* sia più efficiente per la rimozione di ammoniaca rispetto a *Chlorella vulgaris* e come entrambe siano in grado di rimuovere la stessa quantità di fosforo in un bioreattore cilindrico (Gonzalez et al.,1997).

La rimozione dei nutrienti può essere influenzata anche dal sistema di coltura, ad esempio la rimozione di ammoniaca da parte di *Chlorella vulgaris* è maggiore in un fotobioreattore triangolare piuttosto che in uno cilindrico che invece permette una maggiore rimozione di fosforo (Gonzalez et al.,1997).

Un altro fattore che può interessare la depurazione è la CO₂ ; infatti si è osservato come in un sistema Hrap (bacini a bassa profondità usati per la depurazione) contenente acque reflue urbane l'utilizzo di questa molecola velocizzi la crescita algale e renda più efficiente la rimozione dei nutrienti. Questo perché le acque reflue urbane hanno un rapporto C:N:P che equivale a 20:8:1, mentre la richiesta algale è di 50:8:1, quindi la mancanza di carbonio nel rapporto può essere compensata con l'apporto di CO₂ dall'esterno (Woertz.,2009).

Anche la residenza idraulica ha un ruolo importante,infatti si è osservato come la rimozione di ammonio e ortofosfati sia del 99% dopo 12 giorni, con un tempo di residenza idraulica di 3 e 4 giorni (Woertz.,2009).

Scopo dello studio

In vista di una sempre maggiore richiesta di energia e di un sempre più elevato inquinamento ambientale, la società attuale si sta indirizzando verso l'utilizzo di energie rinnovabili, che permettono la produzione di energia "pulita" e quindi un maggior rispetto dell'ambiente.

L'utilizzo di microalghe per la produzione di biocarburanti sembra essere una buona soluzione alternativa all'utilizzo di seminativi che sottraggono terreno alla coltivazione per uso alimentare, inoltre tale applicazione appare particolarmente interessante se integrata con l'impiego delle microalghe nel campo della depurazione, sia per gli aspetti ambientali legati al riutilizzo degli effluenti sia per il fatto di poter ottenere nutrienti per la crescita delle alghe senza costi aggiuntivi per il processo.

L'intento ultimo di questo studio è proprio l'unione di queste due applicazioni.

Si è scelto di utilizzare la microalga *Scenedesmus* sp che, in seguito ad altri studi (Samorì G.,2012), aveva mostrato caratteristiche di elevata velocità di crescita, capacità di rimozione dei nutrienti in tempi brevi, buona tolleranza ad alte concentrazioni di ammonio.

In questa tesi si è voluta indagare la capacità depurativa, in particolare, mediante l'utilizzo di tre tempi di residenza idraulica differenti, andando così a valutare quale sia il metodo di coltivazione più vantaggioso per la depurazione delle acque reflue urbane. Nello stesso tempo ci si è proposti, attraverso la caratterizzazione biochimica della biomassa, di stabilire quale condizione di crescita permettesse di ottenere una biomassa di composizione più idonea ad un possibile utilizzo nella produzione di energie rinnovabili.

Il secondo studio invece è stato fatto con l'intento di verificare la possibilità di ottenere una biomassa di composizione biochimica ancora più idonea per usi energetici. In particolare si è posta l'attenzione sulla possibilità di incrementare la percentuale di acidi grassi contenuta nelle cellule, facendo crescere le alghe prima in un terreno ricco di nutrienti e in seguito in un terreno carente di nutrienti, costituito dall'effluente secondario dell'impianto di depurazione cittadina, per un tempo prolungato. Inoltre le colture sono state sottoposte a un cambiamento di intensità luminosa e differenziate da una diversa diluizione (50% e 82%) con l'effluente secondario.

CAPITOLO 5:

Materiali e metodi

5-1 Mantenimento dei ceppi algali e tecniche di coltura (semicontinuo e batch)

Per gli esperimenti sono state adottate due tecniche di coltura in cui le alghe sono state mantenute in un ambiente chiuso non termostato con un range di temperatura di per tutta la durata degli esperimenti; per la crescita viene utilizzato un terreno di coltura che in questo studio è rappresentato dall'acqua della vasca di sedimentazione del trattamento primario del depuratore di Cesena. Il sistema di illuminazione è regolato da un temporizzatore che crea un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

Entrambi i metodi di coltivazione prevedono, se necessario, l'utilizzo di oscillatori per agitare le cellule, in modo da aumentare l'assimilazione di nutrienti, lo scambio gassoso all'interfaccia cellula-acqua e l'esposizione alla luce; è inoltre stato insufflato nel sistema un volume di 51L/h, costituito da 50 L/h di aria e 1 L/h di CO₂

Il metodo in semicontinuo consiste nel mantenere attiva la coltura per lunghi periodi di tempo, prelevando una percentuale prestabilita di volume di coltura che verrà sostituita con il terreno di crescita; in questo modo si avrà un continuo apporto di nutrienti che permetterà alle alghe di continuare a dividersi evitando la fase di senescenza.

Il metodo delle colture batch, invece non prevede l'aggiunta di ulteriore terreno di coltura, quindi esaurendo i nutrienti disponibili, le cellule non si duplicheranno più e raggiungeranno una fase di senescenza. Nelle colture batch infatti è possibile delineare diverse fasi di accrescimento, una fase iniziale in cui si osserva l'adattamento delle cellule alle nuove condizioni, una fase esponenziale in cui si misura la velocità massima di crescita delle alghe ed una fase stazionaria in cui la crescita algale si arresta a causa dell'esaurimento di nutrienti o per effetto della densità delle cellule che limita il loro ulteriore aumento, questa fase ha una durata variabile dopodiché si ha la morte degli organismi.

Affinché le colture non vengano contaminate da batteri, protozoi ed eventualmente da altre specie algali si sterilizzano i materiali che andranno a contatto con la coltura in autoclave ad una pressione di 1atm a 120°C per 20 minuti.

5-1.1 Studio in semi-continuo

In data 3-05-2011 sono stati campionati 60 litri di acqua dal sedimentatore primario dell'impianto di depurazione di Cesena, l'acqua è stata filtrata con un filtro a maglia di 200 μm e conservata in bottiglie a -20° . L'esperimento ha avuto inizio il giorno successivo (giorno zero) in cui è stato effettuato l'inoculo: utilizzando 70 ml di una cultura, pari a circa 1482,5 g/L di biomassa, e 980 ml di acqua della vasca di sedimentazione del trattamento primario, si è ottenuto un volume finale di 1050 ml per bottiglia con una concentrazione di biomassa di 0,1 g/L. Sono state preparate 6 bottiglie di coltura.

Per tutta la durata dello studio (14 giorni) è stata valutata giornalmente la biomassa, la torbidità, l'efficienza fotosintetica, i nutrienti e la temperatura. Il giorno 7 vengono differenziate, attraverso diverse diluizioni, le bottiglie per poter così testare tre tempi di residenza idraulica, in doppio:

1. In una condizione sono stati rimossi 600 ml e sostituiti con 600 ml di acqua del primario; è stato scelto questo volume perché si è calcolato che è quello necessario per far sì che l'acqua sia rinnovata completamente in un giorno e mezzo (HRT 1,5).
2. Nella seconda condizione sono stati rimossi 300 ml e sostituiti con 300 ml di acqua del primario; questo per testare la capacità depurativa di *Scenedesmus* sp in 3 giorni di residenza (HRT 3).
3. Nell'ultima condizione sono stati rimossi 180 ml di coltura e sostituiti con 180 ml di acqua del primario, così che l'acqua possa essere cambiata completamente in 5 giorni (HRT 5).

Inoltre dal giorno 7 fino alla fine dell'esperimento sono stati raccolti i campioni per le analisi delle proteine, degli acidi grassi e dei polisaccaridi.

5-1.2 Studio con coltura batch

La durata di questo esperimento è di circa un mese, è stato suddiviso in due fasi entrambe di quattordici giorni. Nella prima si è cercato di massimizzare la biomassa utilizzando come terreno di coltura l'acqua dell'effluente

primario; nella seconda, invece, si è cercato di aumentare il contenuto di carbonio della coltura, sottoponendola a carenza di nutrienti e stress luminoso.

La crescita di *Scenedesmus* sp. è stata divisa in due fasi.

PRIMA FASE:

Il giorno zero è stato effettuato l'inoculo: In 1020 ml di effluente primario sono stati aggiunti 80 ml di una coltura di *Scenedesmus* sp.; si è ottenuto un volume finale di 1100 ml per bottiglia con x g/L di biomassa. Sono state preparate 2 bottiglie di coltura. Lo stesso giorno è stata regolata la luce a cui è sottoposta la coltura a circa $88,2 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e svolte le analisi di biomassa e dei nutrienti.

Questa prima fase è stata eseguita con la modalità batch, è durata 14 giorni e tutti i giorni sono state effettuate analisi di torbidità, è stata controllata la capacità fotosintetica ed è stata misurata sempre, circa alla stessa ora, la temperatura a cui si trovavano le colture.

L'ultimo giorno della prima fase (14) sono stati raccolti dei campioni per le analisi dei polisaccaridi totali ed extracellulari, per le analisi delle proteine, degli acidi grassi e dei lipidi totali.

Lo stesso giorno ha inizio la seconda fase.

SECONDA FASE:

Anche la seconda fase ha durata 14 giorni e ha inizio con il giorno zero, dove si passa da 2 a 4 bottiglie diluendo con l'acqua della vasca del trattamento secondario (scarsa di nutrienti) . Due bottiglie contenenti 500 ml di coltura della prima fase e altri 500 ml di acqua del secondario e le altre due bottiglie con 180 ml di coltura e 820 ml di acqua dell'effluente secondario.

Lo stesso giorno è stata calcolata la biomassa in replica, sono state fatte le analisi dei nutrienti ed è stata aumentata l'intensità luminosa a circa $140 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Per tutti i giorni, fino al quattordicesimo è stata controllata la torbidità e verificata la capacità fotosintetica.

Nei giorni 3, 8 e 14 inoltre si è stimata la biomassa in replica e sono stati raccolti campioni per le analisi degli acidi grassi.

L'ultimo giorno sono stati raccolti campioni per le analisi dei polisaccaridi totali, per le analisi delle proteine e quelle dei lipidi totali.

5-2 Valutazione della crescita algale

La valutazione della crescita algale è stata effettuata utilizzando la metodica APHA (1995), che prevede la stima dei solidi sospesi totali (TSS) , mediante peso secco e dei solidi sospesi volatili (VSS).

5-2.1 Solidi

Con il termine “Solidi” si fa riferimento alla materia in sospensione o disciolta nell'acqua o nelle acque reflue. “Solidi totali” è un termine che si riferisce al materiale residuo che rimane in un recipiente dopo l'evaporazione di un campione e la sua successiva essiccazione in forno a una temperatura prestabilita. I solidi totali includono i ”solidi sospesi totali”, porzione di solidi totali che se il campione viene filtrato rimane trattenuta dal filtro, e “solidi totali disciolti” , rappresentati dalla porzione che passa attraverso il filtro.

Il tipo di supporto del filtro, la dimensione dei pori, la porosità, l'area, lo spessore del filtro, la dimensione della particelle e la quantità di materiale depositato sul filtro sono i principali fattori che incidono sulla separazione dei solidi sospesi da quelli disciolti.

I solidi disciolti sono quella porzione di solidi che passa attraverso un filtro di 2.0 μm (o più piccolo), i solidi sospesi sono la parte trattenuta dal filtro.

Con il termine “residuo fisso” si fa riferimento al residuo dei solidi totali sospesi o disciolti dopo un riscaldamento a secco per il tempo e la temperatura stabiliti; la perdita di peso è dovuta alla perdita dei solidi volatili.

In questo studio sono stati stimati i solidi sospesi totali, i solidi sospesi volatili e il residuo fisso, in quanto la sottrazione del residuo fisso da quello totale fornisce una stima della biomassa algale.

5-2.2 Solidi sospesi totali seccati a 103-105° C (TSS)

Principio del metodo : un campione ben miscelato è filtrato attraverso un filtro standard in fibra di vetro precedentemente pesato, il residuo trattenuto sul filtro viene essiccato a 103-105° C; l'aumento di peso del filtro rappresenta i solidi sospesi totali.

Procedura: La prima parte dell'analisi prevede la preparazione dei filtri, sono stati utilizzati filtri GF/F Whatman in microfibra di vetro del diametro di 47 mm; è necessario lavare il filtro con acqua distillata, utilizzando l'apparato di filtrazione e il vuoto e seccare in stufa per almeno un'ora a 103-105° C; se i filtri verranno usati per il calcolo dei solidi volatili, come nel nostro caso, è necessario, prima di riporlo in stufa, metterlo in un forno muffola a 550° C per 15 minuti. Dopo il raffreddamento del filtro in un essiccatore bisogna pesarlo, è importante ripetere il ciclo di essiccazione, raffreddamento e pesatura del filtro fino a che la variazione di peso sarà inferiore al 4% rispetto al peso precedente.

La scelta del volume da campionare dipende dal rendimento del peso secco che deve essere compreso tra 2.5 e 200 mg; se il volume filtrato non riesce a soddisfare il rendimento minimo bisogna aumentare il volume di campionamento, fino a un massimo di 1 litro.

Il calcolo vero e proprio dei solidi sospesi totali ha inizio filtrando un volume noto di coltura (compreso tra 20 e 50 ml) utilizzando un apparato di filtrazione attaccato al vuoto; la coltura deve essere omogenea, per questo è importante mantenere in continua agitazione il campione. Alla fine della filtrazione è necessario sciacquare il filtro per tre volte con 10 ml di acqua distillata. Il filtro deve asciugare per almeno un ora a 103-105° C, dopo che si è raffreddato bisogna pesarlo, ripetere il ciclo di seccatura, raffreddamento e pesatura fino a che la variazione di peso sarà inferiore al 4% del peso precedente.

Le analisi devono essere svolte per almeno il 10% dei campioni in duplicato e le repliche devono avere valori che non si discostano più del 5% tra loro.

Calcoli:

$$TSS = \frac{(A - B) * 1000}{V} \quad \frac{mg}{ml}$$

A= peso del filtro + peso secco

B= peso del filtro

V= volume filtrato di coltura.

Figura 1: Formula per il calcolo dei solidi sospesi totali.

5-2.3 Solidi volatili e residuo fisso a 550°C

Principio del metodo: il residuo ottenuto con il metodo precedente è posto a 550° C fino a peso costante; i solidi che rimangono sul filtro rappresentano il residuo fisso, mentre il peso perso rappresenta quello dei solidi volatili; questa determinazione è utile in quanto offre una stima approssimativa della materia organica presente nel campione.

Procedura: i filtri contenenti i solidi sospesi, ottenuti con il metodo precedentemente descritto, quando raggiungono un peso costante vengono posti in muffola a una temperatura di 550° C; è necessario lasciarlo un tempo compreso tra 15 e 20 minuti per un residuo di circa 200 mg.

L'ultima fase del metodo prevede la pesatura del filtro, una volta raffreddato in un essiccatore.

Le analisi devono essere svolte per almeno il 10% dei campioni in duplicato e le repliche devono avere valori che non si discostano più del 5% tra loro.

Calcoli:

$$VSS = \frac{(A - B) * 1000}{V} \quad \frac{mg}{ml}$$

Figura 2: Formula per il calcolo dei solidi sospesi volatili.

$$\text{Residuo fisso} = \frac{(B - C) * 1000}{V} \quad \frac{mg}{ml}$$

A = peso residuo prima della muffola

B = peso residuo dopo il trattamento in muffola

C = peso filtro.

Figura 3: Formula per il calcolo del residuo fisso.

5-3 Produttività biomassa

La produttività della biomassa ($g L^{-1} d^{-1}$) è stata calcolata nelle colture in semicontinuo, dalle variazioni delle concentrazioni di biomassa ($g L^{-1}$) in un tempo di coltivazione espresso in giorni (day) secondo l'equazione seguente:

$$P = [X_t * V_{in}] / V_{tot}$$

Figura 4: Formula per il calcolo della produttività della biomassa.

Dove X_t è la biomassa ($g L^{-1}$) in un tempo t , V_{in} è il volume (L) dell'effluente primario che entra nel sistema in 1 giorno e V_{tot} è il volume totale del sistema.

5-4 Torbidità

Un metodo più diretto per valutare la crescita algale è quello basato sulla lettura con lo spettrofotometro (UV/VIS Jasco 7800) della torbidità della coltura. Per questa procedura è necessario prelevare un campione di coltura, diluirlo, se necessario per non superare una assorbanza di 0.8.

Il metodo si basa sul fatto che l'aumentare della torbidità della coltura sia dovuto all'aumento delle cellule algali, ed è espressa in assorbanza, che è il valore restituito dallo spettrofotometro. Per questo tipo di analisi è opportuno impostare una lunghezza d'onda di 750 μm .

5-5 Misura dell'attività fotosintetica

L'energia assorbita dalla clorofilla può avere tre diversi destini:

- può essere usata per la fotosintesi (fotochimica);
- può essere dissipata come calore;
- può essere riemessa come fotoni di lunghezza d'onda più alta (fluorescenza).

Questi tre processi avvengono in competizione per cui l'aumento di uno porta alla diminuzione degli altri due, pertanto la fluorescenza, proveniente soprattutto dal PS II può dare informazioni sull'efficienza della fotochimica.

Il principio della misura della fluorescenza si basa sull'osservazione, fatta da Kautsky nel 1930, che le alghe, in seguito ad una leggera illuminazione, mostrano un aumento di fluorescenza da zero ad un livello basso costante, chiamato F_0 . Se l'illuminazione è abbastanza forte la fluorescenza aumenta da F_0 ad un livello massimo, chiamato F_m . La differenza tra F_m e F_0 è rappresentata dalla fluorescenza variabile, F_v .

Il fluorimetro PAM (PDA-100, Walz) ha la particolarità di emettere la luce necessaria per misurare la fluorescenza in maniera modulata, cioè accesa e spenta ad elevata frequenza ed il detector è in grado di ricevere solo la fluorescenza stimolata da tale luce. Questo permette di misurare la fluorescenza anche in ambienti con la luce di sfondo e di permettere misure anche in campo.

Con il metodo degli impulsi saturanti è necessario adattare il campione di 3 ml al buio per 20 minuti circa, trascorsi i quali la sospensione algale viene illuminata con un raggio di luce (MB) che non è sufficiente a stimolare la fotosintesi ma può promuovere un segnale di fluorescenza. Nel campione adattato al buio la fluorescenza che si ottiene è il livello minimo di

fluorescenza (F_o) che si ha quando tutti i centri di reazione sono “aperti”, quindi disponibili per la fotosintesi. In seguito viene dato un flash di luce ad alta intensità (luce saturante, SP di circa $8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); questo riduce tutti gli accettori del PSII (QA) e la fluorescenza raggiunge il valore massimo (F_m) che si ottiene in assenza di fotochimica. Da questa misura è possibile ottenere il rendimento quantico massimo ovvero $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$, che si ha quando tutti i centri di reazione sono aperti e disponibili per la fotosintesi.

Per valutare lo stato della coltura in esame si valuta il valore dello “yield” iniziale dato dal rapporto $(F_m - F_o)/F_m$; il valore ottenuto può variare a seconda dello stato fisiologico delle cellule. Un valore attorno a 0,600 – 0,700 indica che la coltura è in buone condizioni mentre una diminuzione indica uno stato di sofferenza.

5-6 Determinazione delle proteine con il metodo del Lowry

Questo metodo è basato su una reazione colorimetrica data dal reattivo di Folin (fosfomolibdato, fosfotungstato, sali rameici) con gli amminoacidi che contengono anelli aromatici.

La determinazione quantitativa viene effettuata attraverso la lettura del composto colorato allo spettrofotometro UV/VIS Jasco 7800, alla lunghezza d'onda di 750 nm, facendo riferimento ad una curva di taratura costituita utilizzando quantità note di albumina bovina come standard.

Per estrarre le proteine totali dalle cellule algali si centrifuga un aliquota pari a 10 ml di coltura a 9000 rpm per 20 minuti ad una temperatura di 4°C ; si elimina il sopranatante e si risospende il pellet aggiungendo 1 ml di NaOH 0,1M. Si procede quindi sonicando le provette per facilitare la rottura delle cellule.

Le soluzioni da utilizzare sono:

1. 10 gr Na_2CO_3 in 100 ml di NaOH 0.5M
2. 0,5 gr Na,K tartrato in 50 ml di H_2O

3. 250 mg CuSO₄ 5H₂O in 50 ml della soluzione 2

Utilizzando le soluzioni sopra riportate si preparano al momento dell'analisi le seguenti miscele:

A. 10 ml sol. 1 + 1 ml sol. 3

B. 3 ml Folin Ciocalteu + 27 ml H₂O

Per costruire la curva di taratura si prepara una soluzione di albumina bovina 1 mg ml⁻¹ e si utilizzano quantità da 20 a 150 µg ml⁻¹.

Si mette in ogni provetta un volume noto di campione e lo si porta a 1 ml con NaOH 0,1M; nell'analisi dei campioni si utilizzano volumi noti di 30 µl e 60 µl a cui vengono aggiunti rispettivamente 970 µl e 940 µl di NaOH 0,1M.

Si aggiunge 1 ml della soluzione A, si agita su vortex e si aspetta 10 minuti; si aggiungono quindi 3ml della soluzione B, si agita nuovamente su vortex e si aspetta 30 minuti. Una volta terminato l'ultimo passaggio si procede con le letture alla lunghezza d'onda _ di 750 nm mediante lo spettrofotometro UV/VIS Jasco 7800.

Il procedimento sopra descritto è applicato sia nella costruzione della retta di calibrazione sia nell'analisi dei campioni.

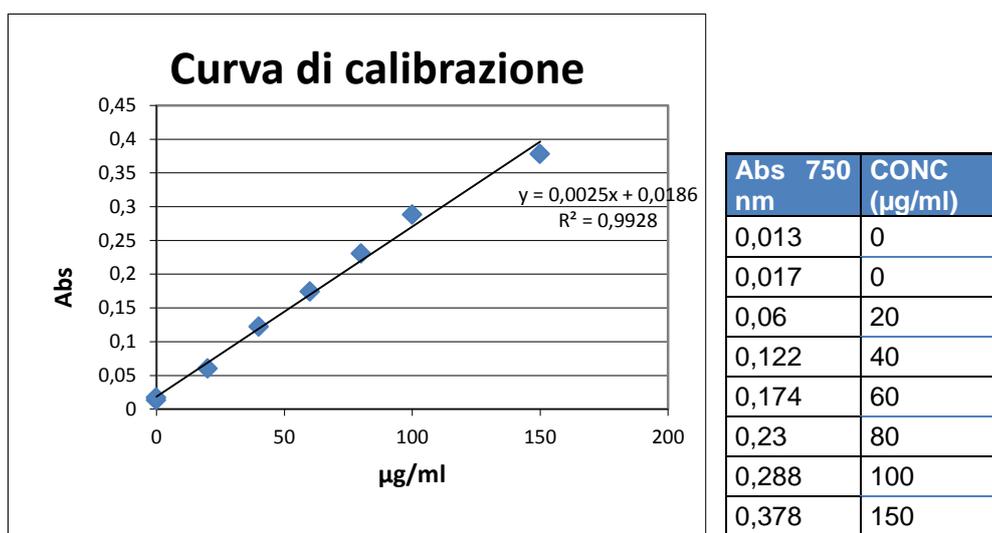


Figura 5: Curva di calibrazione per la determinazione delle proteine e tabella per costruzione curva di calibrazione.

In figura 4 è rappresentata la retta di calibrazione per l'analisi del contenuto proteico. Dopo aver ottenuto i microgrammi su millilitro di proteina per campione, per avere la quantità totale occorre moltiplicare per un fattore che tiene conto di tutte le diluizioni effettuate e del volume di estrazione secondo la seguente formula:

$$\mu\text{g (tot)} = \frac{\mu\text{g(camp)} \cdot 2000\mu\text{l}}{30 \text{ o } 60\mu\text{l}} * \frac{\text{vol. estr. (ml)}}{0.5\text{ml}}$$

Figura 6: Formula per il calcolo totale delle proteine.

Il valore ottenuto deve essere ulteriormente diviso per il numero di grammi (peso del pellet dopo centrifugazione) o per il numero di cellule algali presenti nella sospensione analizzata.

5-7 Estrazione dei polisaccaridi con il metodo di Myklestad e determinazione dei polisaccaridi con il metodo di Dubois

Si prelevano delle aliquote di 15 ml dalla coltura e si mettono nei tubi da centrifuga aggiungendo 30 ml di etanolo assoluto; si ripongono i tubi a -20°C per 24 ore.

Dopo aver bilanciato i tubi si centrifuga a 4°C a 12000 rpm per 15 minuti; terminata la centrifugazione si elimina il soprannatante e si aggiunge al pellet 1 ml di H₂SO₄ 80%. Si lascia per 20 ore a 20°C, dopodichè si diluisce il campione aggiungendo 6 ml di acqua distillata (Myklestad and Haug, 1972). La determinazione dei polisaccaridi con il metodo di Dubois (1956) si basa sul fatto che gli zuccheri in presenza di acidi concentrati formano dei composti ciclici detti furfurali che condensano con i fenoli dando prodotti colorati.

La determinazione quantitativa viene effettuata attraverso la lettura del composto colorato allo spettrofotometro UV/VIS Jasco 7800, ad una lunghezza d'onda di 485 nm, facendo riferimento ad una retta di

calibrazione costruita sulle seguenti concentrazioni di glucosio: 10 20, 40, 80, 100, 150 µg ml⁻¹.

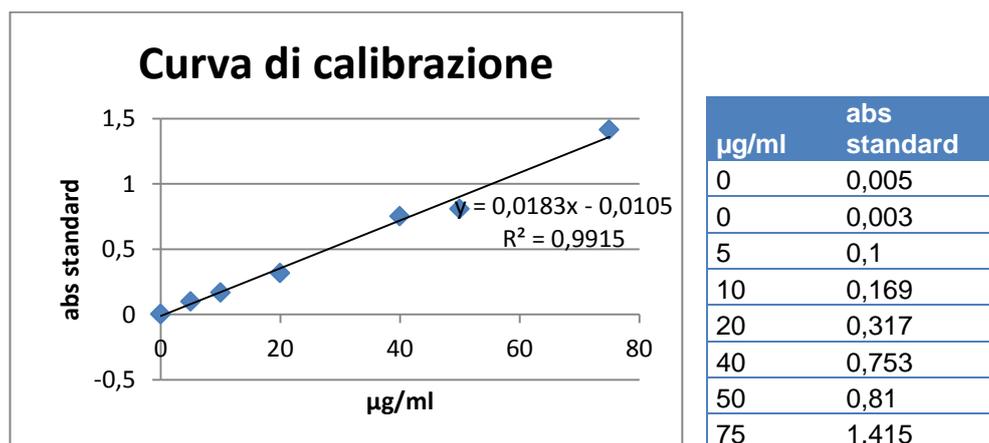


Figura 7: Curva di calibrazione per la determinazione dei polisaccaridi e tabella per costruzione curva di calibrazione.

In figura 7 è rappresentata retta di calibrazione per la determinazione dei polisaccaridi. La misura viene effettuata su un campione di 2 ml pertanto si prelevano 2ml dal campione precedentemente estratto, oppure nel caso in cui la coltura sia troppo concentrata, si prelevano volumi minori che verranno portati a 2 ml con acqua distillata.

Sotto cappa chimica si aggiungono in ogni tubo 50 µl di fenolo 80% e subito dopo 5 ml di H₂SO₄ concentrato. Si agita su vortex e si lascia riposare per 30 minuti a temperatura ambiente.

Si effettuano le letture allo spettrofotometro a lunghezza d'onda di 485nm.

Dopo aver ottenuto i microgrammi su millilitro di polisaccaridi per campione, per avere la quantità totale occorre moltiplicare per un fattore che tiene conto di tutte le diluizioni effettuate e del volume di estrazione secondo la seguente formula:

$$\mu\text{g (tot)} = \mu\text{g (camp)} * V1_{\mu\text{l}} \text{ ml } V2_{\mu\text{l}} * V3 \text{ (ml)}$$

Figura 8:Formula per il calcolo totale dei polisaccaridi.

V1 = volume raggiunto dopo aver aggiunto H₂O al pellet

V2 = volume prelevato dal campione estratto

V3 = volume campionato dalla coltura (15ml)

5-8 Analisi nutrienti

5-8.1 Metodo dei nitrati-*Metodo della riduzione con cadmio-*

Il metodo scelto per questa analisi è il *Metodo della riduzione con cadmio*; si basa sul principio della riduzione dell' NO₃⁻ in NO₂⁻ in presenza di cadmio. L' NO₂⁻ prodotto è determinato tramite una reazione colorimetrica.

Il range di applicabilità di questo metodo è tra 0 e 0,40 mg/L di NO₃⁻- N.

È stato utilizzato un kit Hach, contenente due reagenti, NitraVer6 (Nitrate Reagent Powder Pillow), NitriVer3 (Nitrite Reagent Powder Pillow) e uno spettrofotometro portatile.

In alcuni casi è necessario diluire il campione vista la restrizione del range di applicabilità.

L'analisi ha inizio aggiungendo 30 ml di campione in un cilindro graduato, viene versato il contenuto di una bustina NitraVer6 (Nitrate Reagent Powder Pillow) contenente Cadmio, tappato il cilindro e agitato continuamente per tre minuti; il Cadmio si deve depositare sul fondo del cilindro, dopo due minuti, tempo necessario perché il cadmio riduca NO₃⁻ in NO₂⁻, stando molto attenti a non smuoverlo dal fondo, bisogna travasare 25 ml del trattato nella cuvetta. A questi si aggiunge il contenuto di una bustina di NitriVer3 (Nitrite Reagent Powder Pillow), si chiude la cuvetta con il parafilm e si agita fino a quando il contenuto della bustina sia perfettamente sciolto; bisogna attendere dieci minuti in modo che il reagente possa colorare di rosa l' NO₂⁻ che si è formato con la reazione precedente.

In un'altra cuvetta intanto bisogna aggiungere 25 ml di campione che rapprendano il bianco.

La concentrazione di nitrati contenuta nel campione è della misurata con lo spettrofotometro impostato a una lunghezza d'onda di 507 nm.

Lo spettrofotometro esprime il risultato direttamente in termini di concentrazione.

5-8.2 Metodo dell'ammonio-*Metodo della riduzione con cadmio-*

Anche per questa analisi è stato scelto di utilizzare un kit Hach e lo spettrofotometro portatile, impostato alla lunghezza d'onda di 425 nm.

La prima fase prevede l'aggiunta di 25 ml di campione nella cuvetta, anche in questo caso se è necessario bisogna diluire il campione, in quanto il range di sensibilità del metodo è compreso tra 0 e 2,5 mg/L di $\text{NH}_3^+ -\text{N}$. L'azzeramento è effettuato con l'utilizzo di acqua distillata. L'analisi ha inizio con l'aggiunta di 3 gocce di Mineral Stabilizer a ciascuna cuvetta, bisogna agitare alcune volte per inversione; nella fase successiva bisogna aggiungere 3 gocce di Polivinil Alcohol e agitare alcune volte per inversione. L'ultima fase prevede l'aggiunta di 1 ml di reagente Nessler a entrambe le cuvette; bisogna attendere 1 minuto, ovvero il tempo necessario affinché la reazione avvenga e la soluzione assuma un colore giallo se l'ammonio è presente.

La lettura allo spettrofotometro restituisce direttamente un risultato espresso in concentrazione.

5-8.3 Metodo dei nitriti

Questa analisi è stata svolta utilizzando il “ Diazotization Method ”, che prevede l'uso di un kit Hach Dopo aver svolto le diluizioni (se necessarie, in quanto lo strumento può leggere una concentrazione compresa tra 0 e 0.300 mg/L $\text{NO}_2^- -\text{N}$), bisogna riporre 10 ml di campione all'interno della cuvetta,

e aggiungere una bustina di NitriVer 3 (Nitrite Reagent Powder Pillow), infine agitare fino a rendere il campione omogeneo; la reazione dura 20 minuti. Per il bianco si usano 10 ml di campione. Alla fine del tempo previsto per la reazione si procede con l'analisi allo spettrofotometro che restituisce direttamente un risultato espresso in concentrazione.

5-8.4 Determinazione del fosforo reattivo

Principio del metodo

L'acqua da campionare si fa reagire con un reattivo complesso contenente acido molibdico, acido ascorbico e antimonio trivalente. L'eteropoliacido risultante dalla reazione è ridotto dando una colorazione blu, la cui estinzione viene misurata a 885 nm con lo spettrofotometro (UV/VIS Jasco 7800).

Reattivi

1. Soluzione di molibdato ammonico : sciogliere 15 g del prodotto, preferibilmente in cristalli piccoli, in 500 ml di acqua distillata. Conservare in bottiglia di plastica evitando che sia posta a contatto diretto con la luce solare. La soluzione è stabile in definitivamente.
2. Soluzione di acido solforico: aggiungere 140 ml di acido solforico concentrato a 900 ml di acqua distillata conservare in bottiglia di vetro.
3. Soluzione di acido ascorbico: sciogliere 27 g di prodotto in 500 ml di acqua distillata .Conservare la soluzione in bottiglia di plastica. La soluzione è stabile per una settimana se conservata in frigorifero.
4. Soluzione di tartrato di potassio e antimonile: sciogliere 0,34 g di prodotto in 250 ml di acqua distillata, riscaldando se necessario. Conservare in bottiglia di plastica o vetro. La soluzione è stabile per molti mesi
5. Reattivo misto: mescolare 20 ml di soluzione 1, 50 ml di soluzione 2, 20 ml di soluzione 3 e 10 ml soluzione 4. Questa quantità è sufficiente per circa dieci campioni; scartare l'eccesso e preparare la

soluzione di volta in volta in quanto è stabile per un massimo di sei ore

Procedimento

Dopo la preparazione dei reattivi, bisogna aggiungere 50 ml di acqua in esame, precedentemente filtrata (filtro poroso di cellulosa da 0.45 μm), in bottigliette di polietilene, 5 ml di reattivo misto (5) e mescolare immediatamente. Dopo 10 minuti, tempo necessario per la reazione si procede con la lettura allo spettrofotometro, a $\lambda = 885 \text{ nm}$. Inoltre è importante correggere l'estinzione misurata sottraendo l'estinzione data dal bianco, ottenuto con lo stesso procedimento mettendo acqua distillata al posto dell'acqua in esame.

Questa analisi richiede la preparazione di una curva di calibrazione, è quindi necessario preparare una soluzione madre costituita 136,1 mg di KH_2PO_4 sciolti in 100ml di acqua distillata che verrà utilizzata per la preparazione degli standard.

Di seguito è riportata la curva di calibrazione utilizzata per questo metodo.

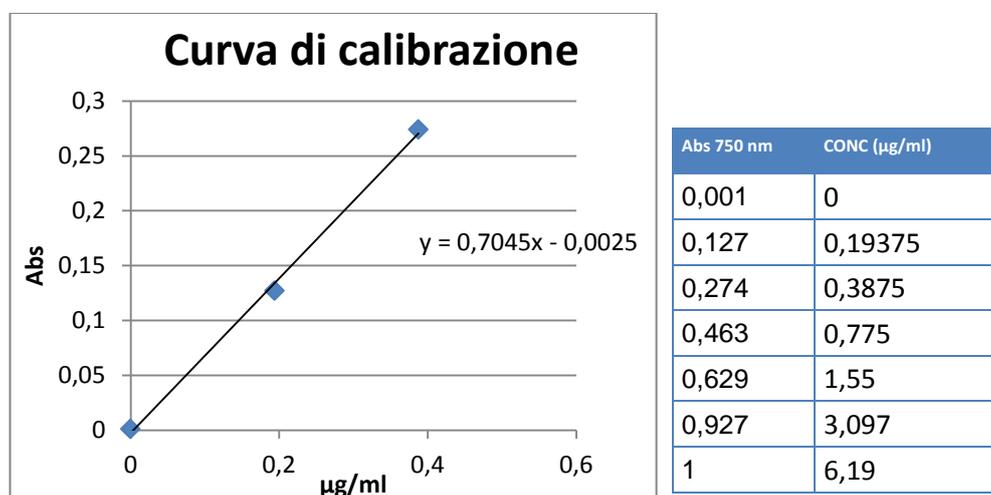


Figura 9: Curva di calibrazione per la determinazione del fosforo reattivo e tabella per costruzione curva di calibrazione.

5-9 Estrazione degli acidi grassi

La determinazione degli acidi grassi nei pellet algali è stata svolta attraverso una procedura leggermente modificata dalla letteratura (Griffiths et al, 2011) . L'estrazione degli acidi grassi è stata eseguita utilizzando un pellet liofilizzato, ricavato centrifugando un volume variabile a seconda della concentrazione di biomassa del campione per 20 minuti a 4° C , a una velocità di 5000 rpm. Prima dell'estrazione è necessario pesare il pellet.

I campioni (5 mg) sono stati sciolti in una soluzione di dimethylcarbonato (0.4 ml), contenente methyl nonadecanoate (0.02 mg), 2,2-Dimethoxypropane (0.07 ml) e potassio methoxide (0,2 ml); quindi i campioni sono stati incubati a 90° C per 30 minuti; per i cinque minuti successivi vengono fatti raffreddare a temperatura ambiente. La fase immediatamente successiva prevede l'aggiunta di BF₃-methanol reagente (0.2 ml) prima di ripetere l'incubazione per 30 minuti. Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente per 5 minuti sono state aggiunte una soluzione satura di NaCl (2 ml) e hexane (1 ml); i campioni sono stati centrifugati a 4000 rpm per 1 minuto. La centrifugazione crea due fasi, in quello superficiale di hexane-dimethylcarbonate, sono contenuti tutti gli acidi grassi (TFAs) ed è stato trasferito nei flaconi per GC-FID. L'analisi è stata eseguita tramite gas-cromatografo presso il Laboratorio di Chimica x del CIRSA. Ogni analisi è stata ripetuta in quattro repliche.

CAPITOLO 6:

Risultati e discussione

6-1 Effetto del tempo di residenza idraulica sul processo di fitodepurazione effettuato con la microalga *Scenedesmus* sp.

Il primo studio è stato eseguito con l'obiettivo di valutare la capacità depurativa e la resa in biomassa della microalga *Scenedesmus* sp., cresciuta utilizzando acque reflue di un depuratore cittadino e adottando tre tempi di residenza idraulica differenti:

- 1.5 giorni di residenza idraulica (HRT-1.5)
- 3 giorni di residenza idraulica (HRT-3)
- 5 giorni di residenza idraulica (HRT-5).

La prima fase di questo studio (dal giorno 0 al giorno 7) prevede la crescita della coltura con l'acqua prelevata dalla vasca del sedimentatore primario secondo una metodologia batch; nella seconda fase invece, è stato utilizzato un metodo di coltura in semi-continuo, sostituendo quotidianamente un volume noto (dipendente dal tempo di residenza idraulica) di coltura con nuovo effluente primario.

Si fa presente che a tempi di residenza idraulica più brevi corrisponde la sostituzione di un volume maggiore di coltura (e anche di biomassa algale) con acqua che contiene una maggiore quantità di nutrienti rispetto a quella eliminata.

In figura 1 è riportato il grafico rappresentante l'andamento della torbidità, utile per avere una stima immediata della crescita della coltura; sono rappresentate tutte e tre le condizioni studiate: sull'asse delle ascisse sono riportati i giorni e sull'asse delle ordinate i valori di assorbanza, la freccia indica che dal giorno 7 ha inizio la fase in semi-continuo con le diluizioni giornaliere.

Dal grafico si può osservare come nei primi sette giorni dell'esperimento tutte e tre le colture crescono e raggiungono la fase stazionaria in maniera simile, mentre con l'inizio delle diluizioni si nota una differenziazione delle

tre condizioni. La coltura con tempo di residenza idraulica più basso (HRT-1.5), ha un andamento che si allontana molto dalle altre due condizioni, ed è descritto da una pronunciata diminuzione iniziale di biomassa che arriva a un minimo nel giorno 10, mentre nei giorni successivi si ha un andamento più o meno stabile.

Per la condizione HRT-5 (coltura meno diluita) la biomassa raggiunta prima delle diluizioni viene mantenuta con andamento più o meno costante e i valori di assorbanza sono più elevati rispetto alle altre due condizioni.

La torbidità delle alghe nella condizione HRT-3 presenta valori intermedi rispetto alle altre due, anche se più simili alla condizione con tempo di residenza idraulica di 5 giorni.

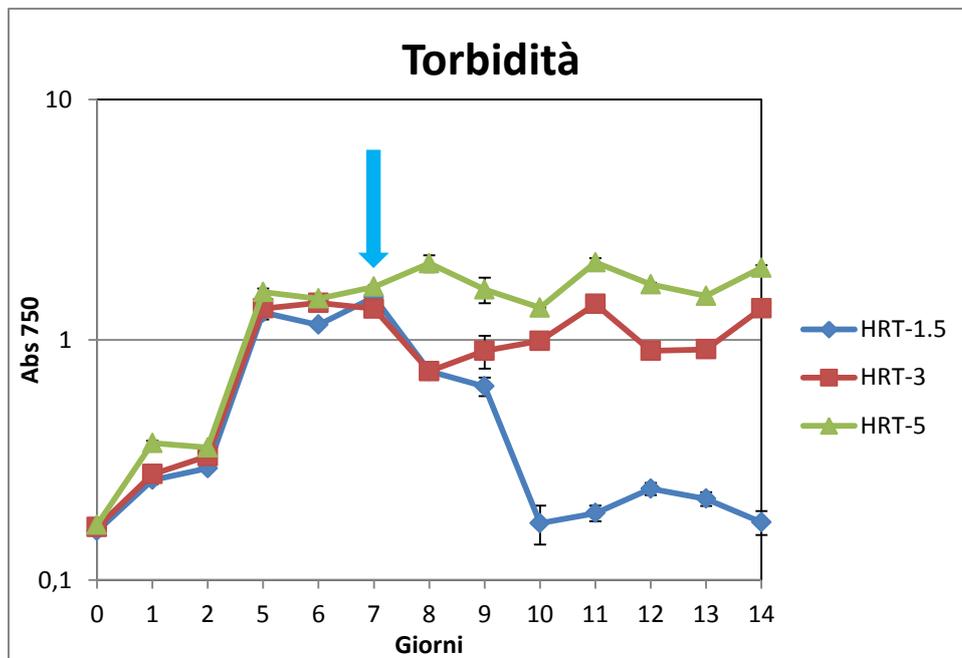


Figura 3: andamento della torbidità alle tre condizioni.

Poiché la torbidità rappresenta un valore indiretto di biomassa, il risultato sopra mostrato può essere confrontato con i valori di biomassa reali, rappresentati dai Solidi Totali Sospesi (TSS), ovvero il peso secco, e dai Solidi Volatili Sospesi (VSS) che rappresentano la frazione organica della biomassa.

La figura 2 rappresenta l'andamento dei solidi sospesi totali, in tutte e tre le condizioni di residenza idraulica, sull'asse delle ordinate sono riportate le

concentrazioni dei solidi sospesi totali, espresse in mg/l, in funzione del tempo (le analisi per il calcolo della TSS sono iniziate il giorno 7, ovvero subito prima delle diluizioni) L'andamento delle tre curve è simile, si osserva una decrescita, nei primi 3 giorni seguita da un andamento stazionario che permane fino alla conclusione dello studio. Nella coltura HRT-1.5 si può osservare una diminuzione della biomassa molto più rapida rispetto a quella con tempo di residenza idraulica di 5 giorni; la coltura HRT-3 invece descrive la condizione intermedia.

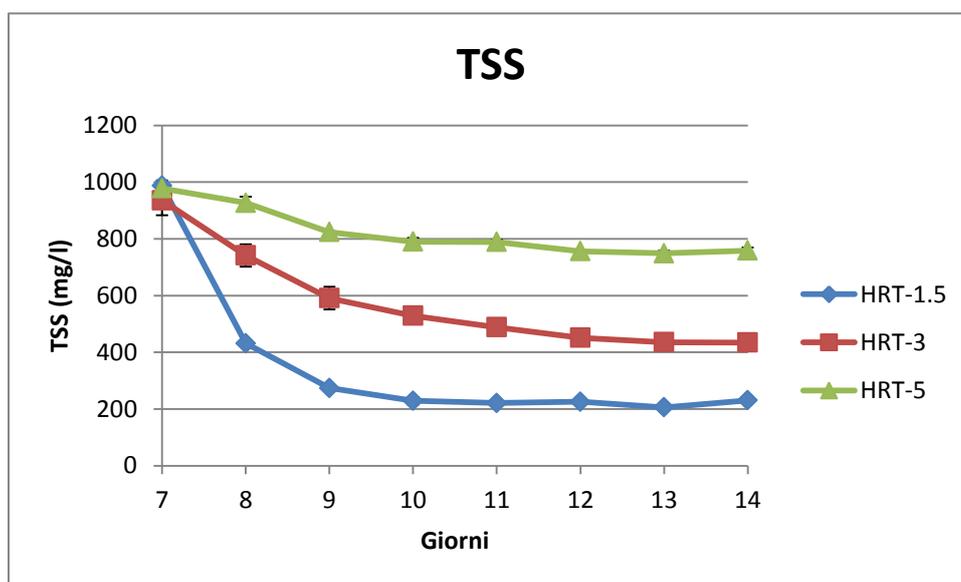


Figura 4: solidi sospesi totali alle tre condizioni.

Nella figura sottostante si osserva come l'andamento dei solidi sospesi volatili delle tre colture sia sovrapponibile a quello dei solidi sospesi totali, con quantità leggermente inferiori dovute al peso del residuo fisso a 550°C

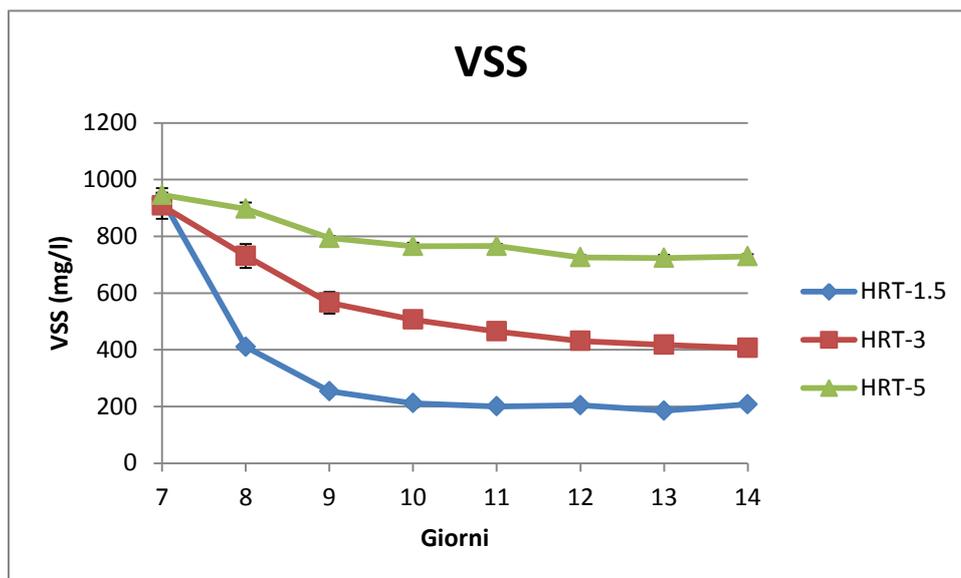


Figura 5: solidi sospesi volatili alle tre condizioni.

Rispetto alle misure della torbidità si osserva un andamento più regolare e la biomassa di tutte e tre le colture raggiunge un andamento stazionario a partire dal giorno 11 con un valore di VSS medio finale di : 200 ($\pm 0,01$) mg/l (HRT-1.5), 440 ($\pm 0,03$) mg/l (HRT-3), 740 ($\pm 0,02$) mg/l (HRT-5). Grazie a questi valori è stata calcolata una produttività media di 140 (± 10) mg/l /d.

I grafici riportati nelle figure di seguito evidenziano le concentrazioni dei nutrienti nelle colture con tempo di residenza idraulica di 1.5 giorni; è stata riportata la relazione tra le concentrazioni del nutriente nel tempo. Le concentrazioni dei nitrati non superano mai 0,068 mg/L ed è stata stimata a circa 0,08 (mg/L) la concentrazione di nitrati presente nell'influenza che quotidianamente entra nel sistema, è quindi evidente una rimozione di nitrati (grafico non mostrato) anche se presenti a basse concentrazioni.

In figura 4 è rappresentato l'andamento dei nitriti, nonostante le concentrazioni siano basse è stato notato un progressivo aumento nel tempo.

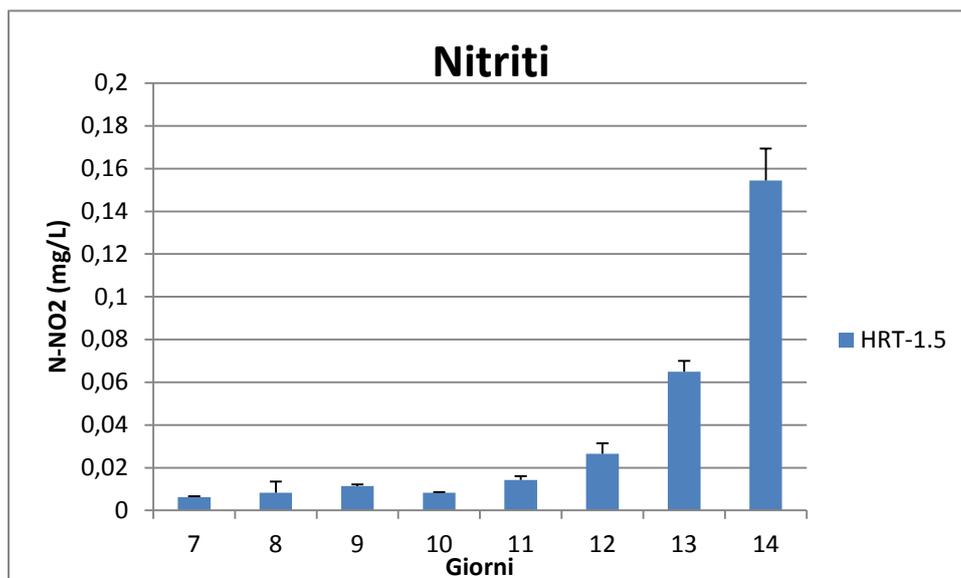


Figura 4: concentrazione di nitriti nella condizione HRT-1.5.

L'andamento dell'ammonio, che si può osservare in figura 5, evidenzia una efficiente depurazione solo nei primi due giorni, infatti dal giorno 9 in poi si può osservare un repentino aumento della concentrazione, fino a un picco nell'ultimo giorno di esperimento. Inoltre è importante osservare che le concentrazioni di ammonio sono due ordini di grandezza maggiore rispetto a quelle dei nitriti e nitrati.

Data l'elevata concentrazione di ammonio, l'aumento di nitriti negli ultimi giorni potrebbe essere indice della presenza di organismi nitrificanti che trasformano l'ammonio rimasto in nitriti.

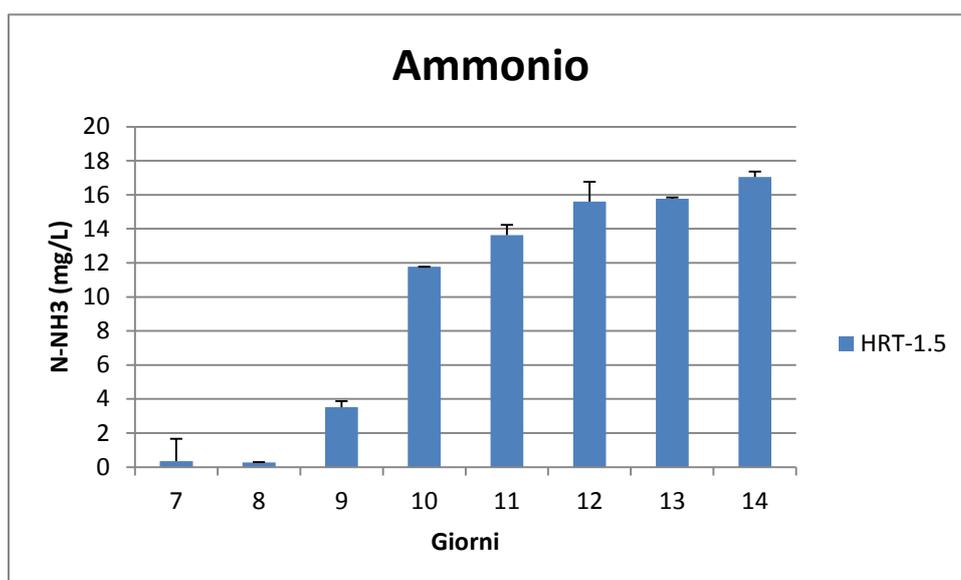


Figura.5: a concentrazione di ammonio alla condizione HRT-1.5.

Le analisi dei nitrati svolte nelle colture sottoposte a un tempo di residenza idraulica di 3 giorni, hanno restituito concentrazioni più elevate rispetto alla condizione HRT-1.5, ma comunque le concentrazioni non superano mai 0,1 mg/L (grafico non mostrato).

Le analisi dei nitriti, come si può osservare nel grafico in figura 6, restituiscono valori estremamente bassi durante tutti i giorni dello studio; è importante comunque notare che la concentrazione di questo nutriente nelle acque delle vasche del trattamento primario del depuratore è già molto bassa.

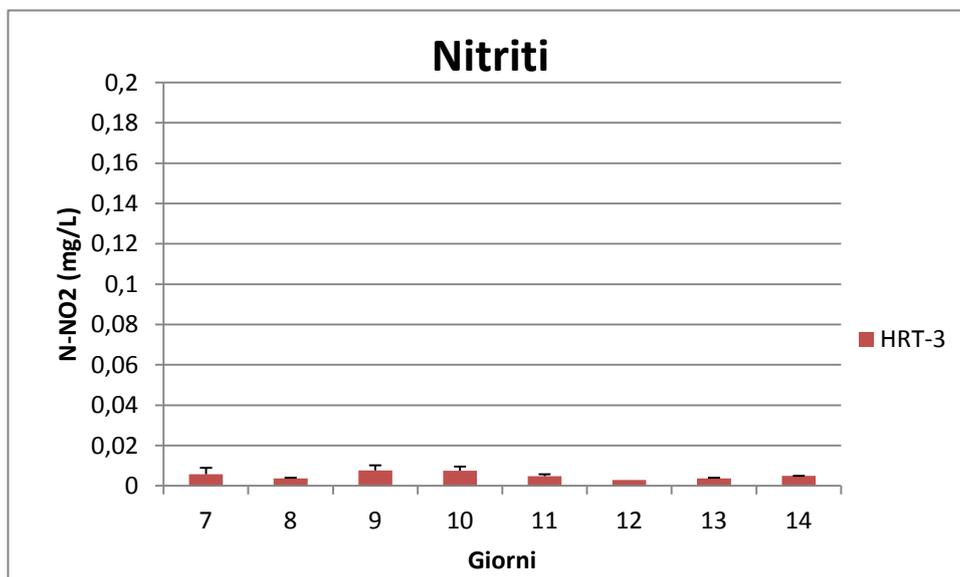


Figura 6: concentrazione di nitriti alla condizione HRT-3

Dalla figura 7 si nota che la rimozione dell'ammonio nelle colture relative alla condizione HRT-3 avviene in maniera efficiente; durante tutto lo studio le concentrazioni riscontrate non superano mai 0,5 mg/L anche se l'acqua aggiunta quotidianamente contiene una concentrazione di ammonio di 32,3 mg/L.

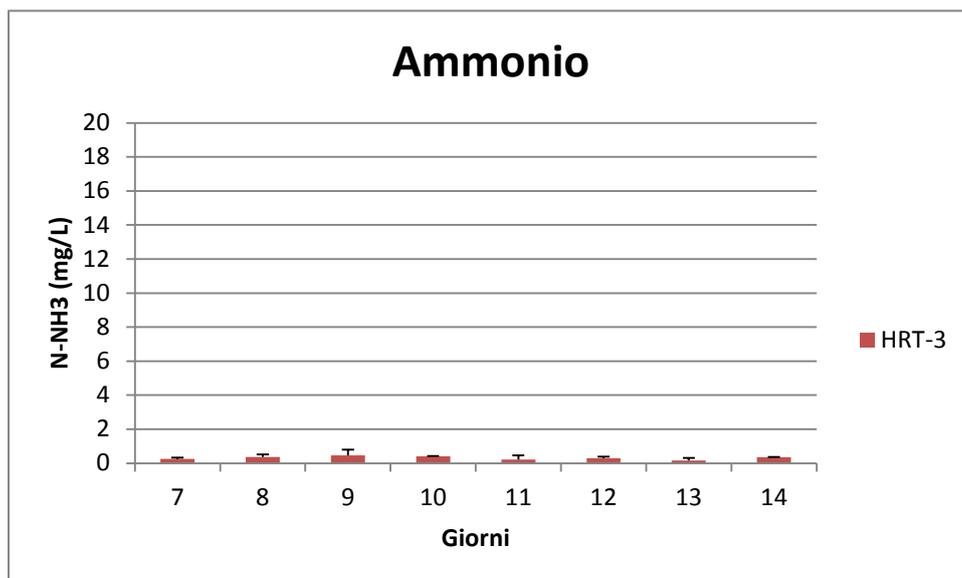


Figura 7: concentrazione di ammonio alla condizione HRT-3.

L'andamento dei nutrienti nelle colture con tempo di residenza idraulica di 5 giorni, è molto simile a quello della condizione HRT-3, come si può osservare dalla figura 8; anche per questa condizione le concentrazioni di nitriti hanno valori molto bassi, con risultati mai superiori a 0,008 mg/L.

Le concentrazioni di ammonio si mantengono su valori bassi, simili a quelle misurate nella condizione HRT-3, pertanto anche il tempo di residenza idraulica maggiore risulta essere una condizione efficiente nella depurazione.

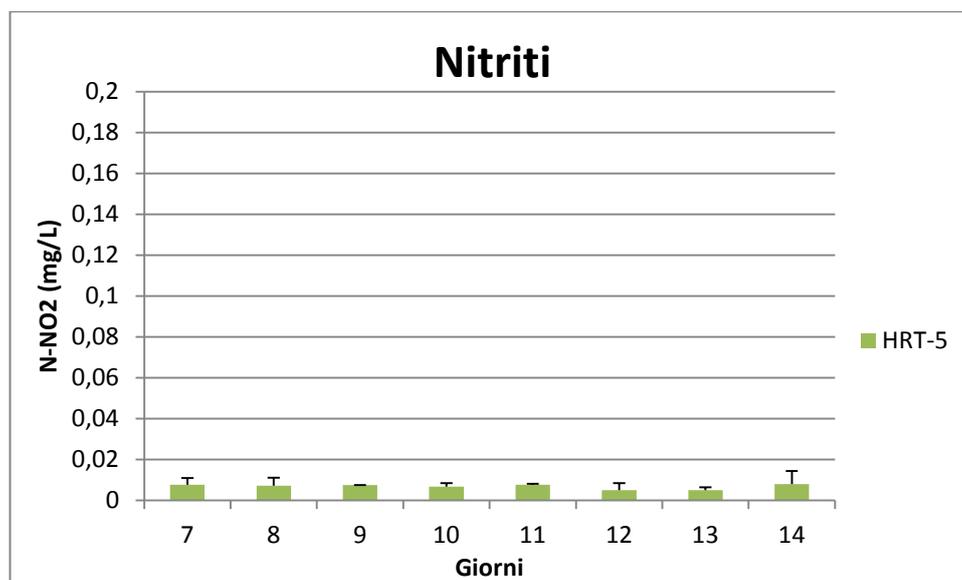


Figura 8: concentrazione di nitriti alla condizione HRT-5.

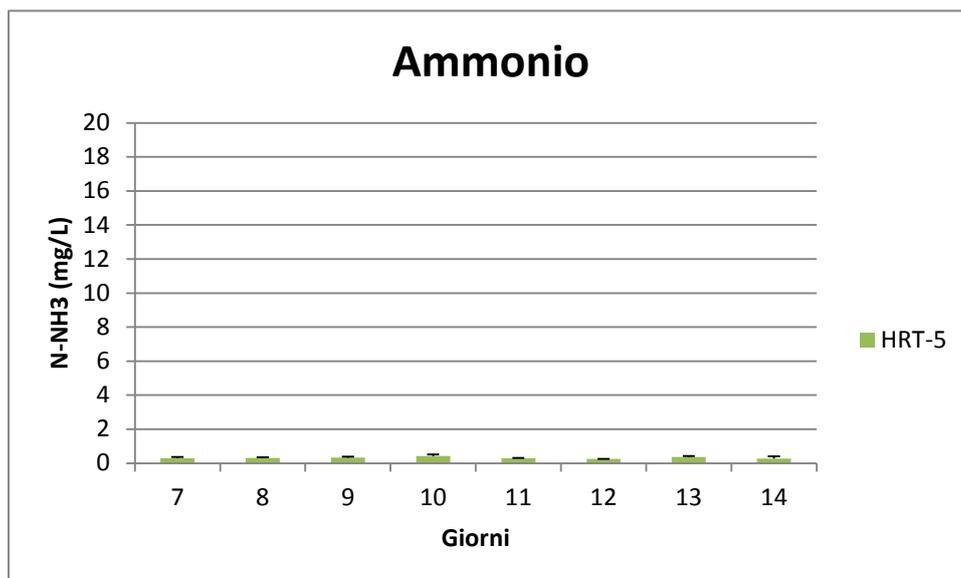


Figura 9: concentrazione di ammonio alla condizione HRT-5.

In figura 10 è riportato un grafico riassuntivo che mette a confronto l'andamento delle concentrazioni di ammonio per tutte e tre le condizioni; si è scelto di evidenziare questo nutriente in quanto è quello più abbondante nelle acque di scarico; dai valori riportati è estremamente evidente come i tempi di residenza idraulica 3 e 5 siano più efficienti per lo scopo prefissato. Inoltre in tutti e tre i tempi di residenza idraulica adottati, si osserva che la rimozione dell'ammonio è più efficace rispetto a quella degli altri nutrienti; questo fenomeno è stato osservato anche in altri studi (Samorì G.,2012)

In figura 11 è riportato un grafico che evidenzia l'efficienza di depurazione da ammonio, per le tre diverse condizioni di coltura. L'istogramma viola rappresenta la concentrazione di ammonio presente nell'acqua dell'influenza primaria, mentre le concentrazioni ai diversi tempi di residenza idraulica sono calcolati mediando le concentrazioni dal giorno 11 al 14 in quanto osservando l'andamento del VSS si osserva che le colture si stabilizzano dal giorno 11 in poi. Si può osservare come le alghe nella condizione HRT-1.5 hanno una concentrazione più elevata di ammonio rispetto alle altre condizioni. Inoltre come osservato dal grafico rappresentato in figura 5 questa condizione ha una capacità depurativa efficiente solo nei primi giorni. Questo andamento è stato osservato anche in altri studi: si è visto come utilizzando la specie algale *Scenedesmus obliquus*, cresciuta in acqua di scarico urbana e con un sistema in semi-continuo, con 35 ore di residenza

idraulica (quindi circa 1.5 giorni), la sua capacità depurativa rimane costante per circa quattro cicli, poi decresce drasticamente (Ruiz-Marin et al., 2010”).

Invece nelle altre due condizioni le alghe mantengono un’alta efficienza di rimozione dei nutrienti per tutta la durata dell’esperimento; anche questo andamento è in accordo con altri studi, infatti è stato osservato che utilizzando acque reflue municipali, una coltura mista di alghe verdi, un sistema in semi-continuo e tempi di residenza idraulica di 3 e 4 giorni, si può ottenere una rimozione di ammonio del 96%,(± 8,7%), valore ottenuto mediando i risultati delle quattro analisi effettuate in un periodo di 18 giorni (Woertz et al. “2009”). Calcolando la media delle percentuali di rimozione nei giorni di analisi si ottiene che la capacità di rimozione alla condizione HRT-3 è di 98,9% (± 0,07), valore molto simile allo studio di Woertz et al.(“2009”).

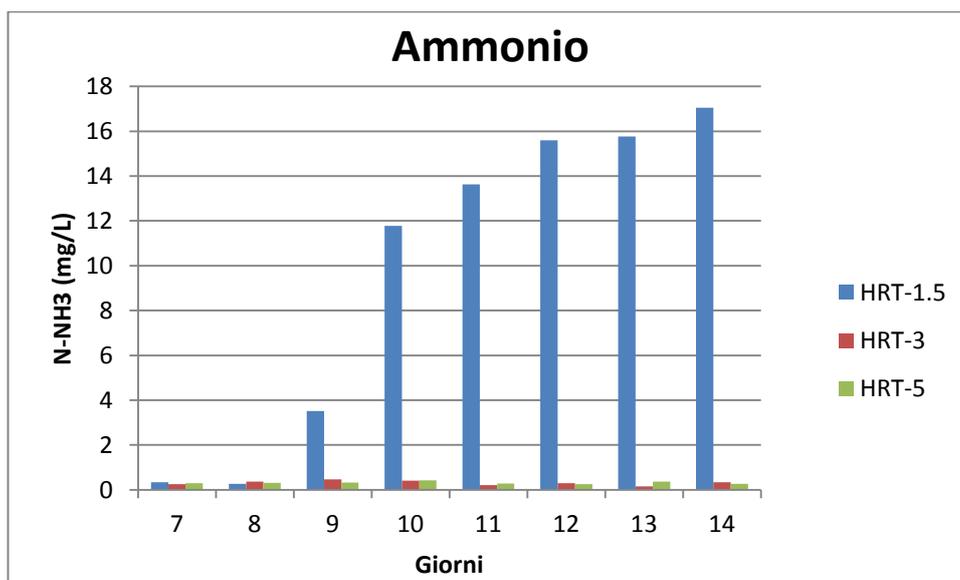


Figura 10: concentrazione di ammonio nelle tre condizioni.

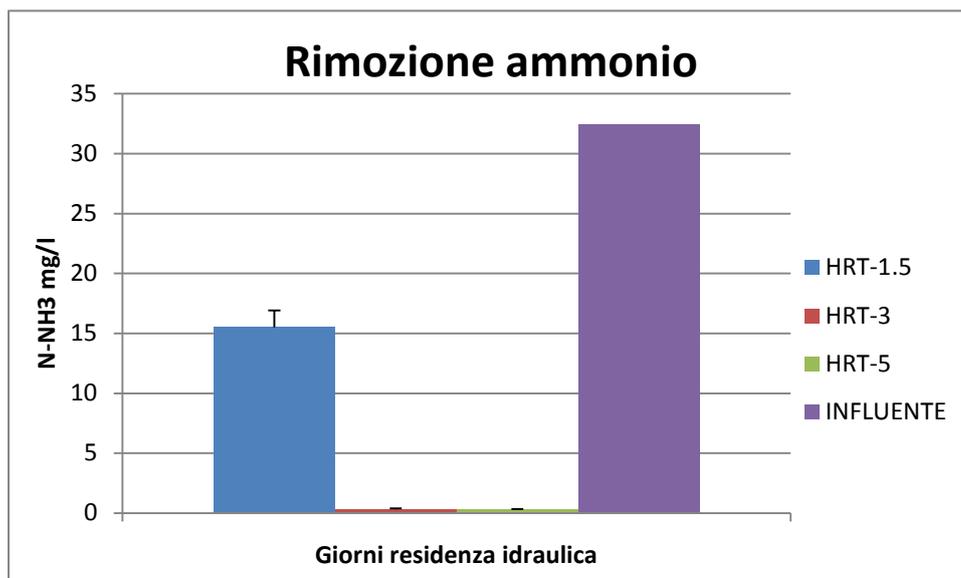


Figura 11: rimozione dell'ammonio nelle tre condizioni e nell' influente.

Per questo studio sono state svolte anche le analisi del fosforo reattivo, ma come si può osservare nella tabella sottostante le concentrazioni sono estremamente basse.

In tabella 1 sono riportate le concentrazioni dell'influente nei giorni ed è evidente come quotidianamente la concentrazione aggiunta venga sequestrata dalle alghe.

GIORNI	HRT-1.5		HRT-3		HRT-5		INFLUENTE
	CONC. FIN	DEV.ST.	CONC. FIN	DEV.ST.	CONC. FIN	DEV.ST.	CONC
7	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,000	0,15625
8	0,024	0,030	0,002	0,001	0,005	0,008	0,29403409
9	0,013	0,007	0,011	0,002	0,003	0,001	0,26988636
10	0,004	0,002	0,005	0,003	0,008	0,000	0,27414773
11	0,007	0,003	0,006	0,005	0,015	0,013	1,65340909
12	0,005	0,000	0,003	0,002	0,001	0,005	1,63636364
13	0,007	0,000	0,007	0,002	0,000	0,000	1,59659091
14	0,005	0,001	0,005	0,004	0,055	0,074	

Tabella 4: concentrazione del fosforo reattivo.

Tenendo conto dei risultati ottenuti dalle analisi dei nutrienti, i tempi di residenza idraulica che forniscono le premesse migliori per la depurazione delle acque reflue sono la condizione HRT-3 e HRT-5: in entrambe si è osservata una elevata percentuale di rimozione dei nutrienti durante tutto il periodo di esperimento. Se tuttavia si tiene conto anche dei risultati

riguardanti la biomassa algale, si osserva come nella condizione HRT-5 le concentrazioni di biomassa siano più elevate rispetto alle altre due. Inoltre in uno studio parallelo è stata caratterizzata la biomassa e si è osservato che la condizione HRT-5 presenta una composizione più idonea per una sua possibile applicazione nella produzione di energia grazie soprattutto a un elevato contenuto di polisaccaridi in essa presente.

Nei grafici seguenti è riportata la concentrazione in % su peso secco di azoto e carbonio intracellulare in relazione con il tempo.

Come mostrato in figura 12 il giorno 7 (prima della diluizione) le concentrazioni sono uguali per tutte le alghe indipendentemente dai tempi di residenza idraulica. In tutte le condizioni si osserva una crescita fino ai giorni 9-10, nei giorni successivi le concentrazioni di azoto si stabilizzano in tutte e tre le diluizioni. La coltura con tempo di residenza idraulica di 1.5 giorni è descritta da valori più elevati soprattutto nei giorni tra 8 e 10, successivamente le differenze sono meno evidenti. Questo è in accordo con i risultati ottenuti dalle analisi dell'ammonio in soluzione che nella condizione HRT-1.5 evidenzia alte concentrazioni, quindi la coltura non è in carenza di azoto. Inoltre si osserva in figura 13 una buona correlazione tra l'azoto intracellulare e le proteine (analizzate in uno studio parallelo a questo), che sottolinea che l'elevata concentrazione di azoto intracellulare in questa condizione deriva dalle proteine contenute nella biomassa algale.

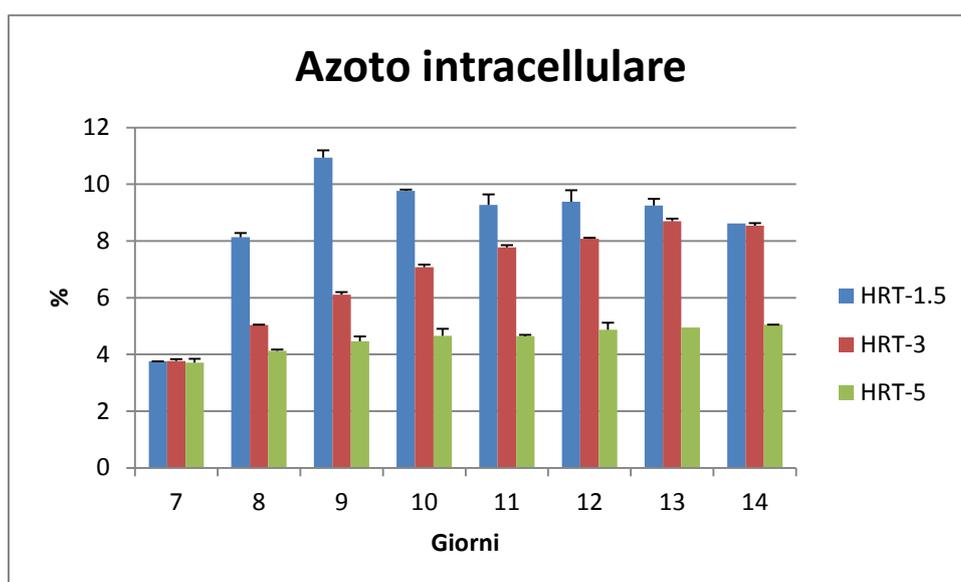


Figura 12: concentrazione di azoto intracellulare

La coltura con tempo di residenza idraulica di 5 giorni è quella con concentrazioni di azoto più basse e in cui i valori si stabilizzano dai primi giorni. Osservando le concentrazioni di ammonio in soluzione è evidente che la coltura è in carenza di azoto, per questo motivo anche la concentrazione intracellulare è bassa. Inoltre in uno studio parallelo a questo si è osservato che le colture più limitate di azoto (come HRT-%) hanno una maggior concentrazione di polisaccaridi intracellulare.

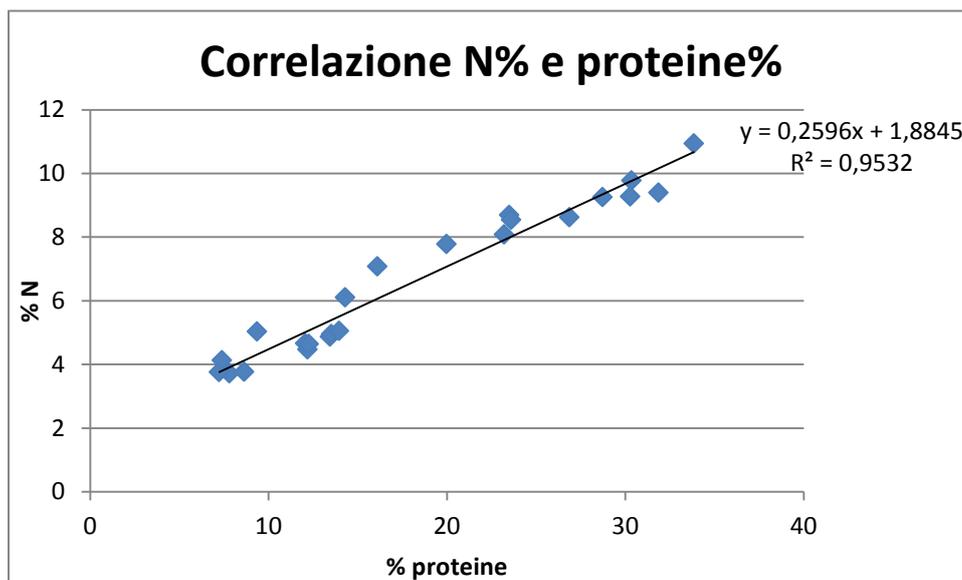


Figura 13 correlazione tra azoto intracellulare e proteine.

In figura 14 è riportata la concentrazione del carbonio intracellulare espressa in % su peso secco, in tutti e tre i tempi di residenza idraulica. Dal grafico si osserva che i valori sono molto simili nelle diverse diluizioni e si stabilizzano fin dai primi giorni. Probabilmente non si osservano evidenti differenze in quanto durante tutta la durata dell'esperimento è stata insufflata CO₂.

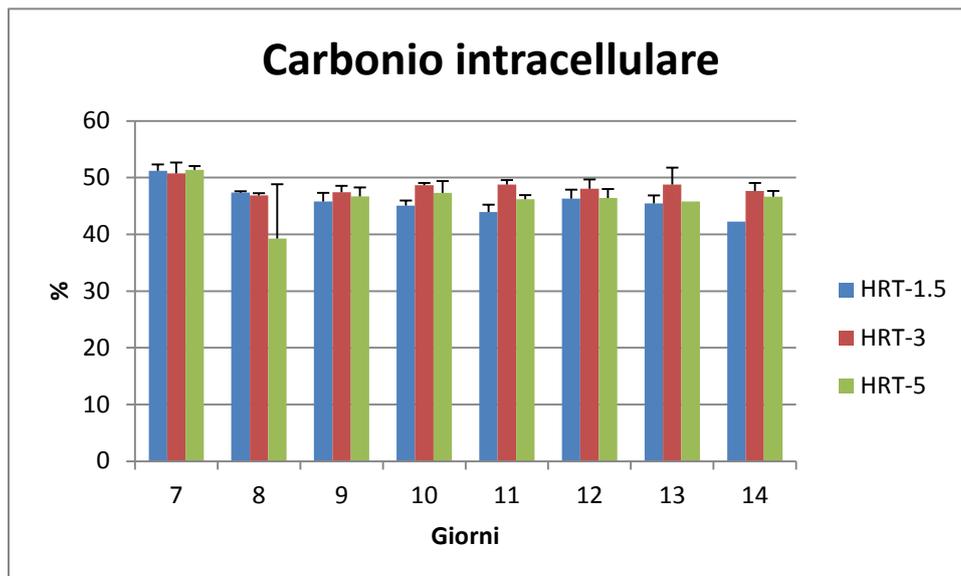


Figura 14:concentrazione di carbonio intracellulare.

Infine è mostrato il grafico che evidenzia il rapporto tra carbonio e azoto espresso in % su peso atomico. La condizione con tempo di residenza idraulica maggiore, ha un rapporto più elevato, rispetto alle altre due condizioni che presentano valori più bassi, dovuto alla più bassa concentrazione di azoto intracellulare.

La coltura con tempo di residenza idraulica di 5 giorni produce una biomassa che dal punto di vista della composizione elementare è favorita per processi di combustione ,digestione anaerobica.

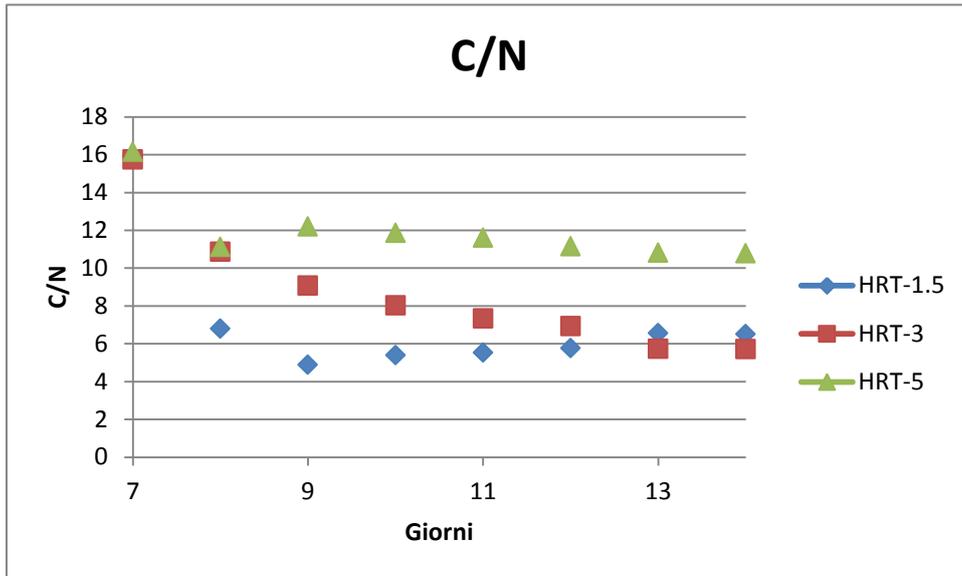


Figura 15: rapporto tra carbonio e azoto intracellulari.

6-2 Effetto delle condizioni di coltura sulla composizione della biomassa

Qui di seguito sono riportati i risultati ottenuti nel secondo esperimento, eseguito sempre con la microalga *Scenedesmus* sp. cresciuta in acque reflue di un depuratore cittadino; in questo studio si è cercato di ottimizzare la composizione algale, cercando in particolare di ottenere una biomassa ricca in acidi grassi, utili per la produzione di biocarburanti. Questo esperimento è stato eseguito allestendo le colture con modalità batch in due fasi entrambe di quattordici giorni. Nella prima si è cercato di massimizzare la biomassa utilizzando come terreno di coltura l'acqua dell'effluente primario; nella seconda, invece, si è cercato di aumentare il contenuto di carbonio nella biomassa algale prodotta, sottoponendo la coltura a carenza di nutrienti e aumento di irradianza.

In figura 1 si può osservare il grafico rappresentante l'andamento della torbidità, eseguito mettendo in relazione le misure di assorbanza con la durata dell'esperimento. Nei primi quattordici giorni si osserva una rapida crescita della coltura caratterizzata da un tasso di crescita (μ) pari a $0,37 \text{ day}^{-1}$, le colture vengono poi diluite con l'effluente secondario del depuratore e viene aumentata l'intensità luminosa a cui sono sottoposte. Vengono effettuate due diverse diluizioni: una al 50% e l'altra all'82% e le colture vengono fatte crescere per altri 14 giorni.

In entrambe le condizioni si osserva una netta diminuzione delle cellule algali dovuta alla diluizione; la coltura più diluita mostra valori di torbidità più bassi. Nella fase successiva si ha un aumento per entrambe le colture, anche se i valori di densità algale di quella diluita all'82% non raggiungono i valori ottenuti dalla coltura diluita al 50%.

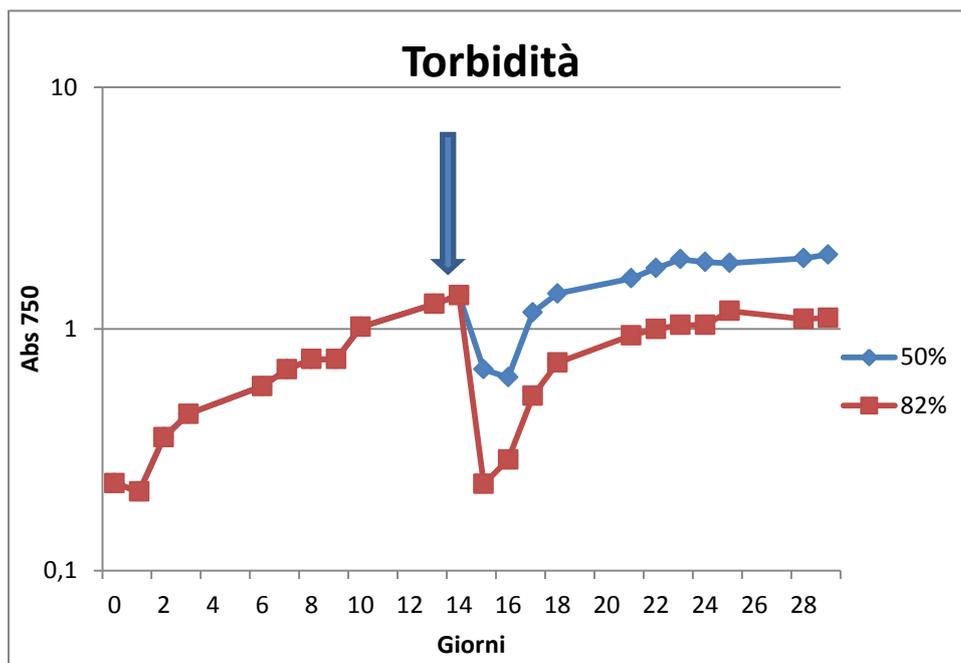


Figura 6: andamento della torbidità prima e dopo le diluizioni.

Nelle figure seguenti sono riportati i risultati delle misure di efficienza fotosintetica effettuate nel corso dell'esperimento. Nel grafico riportato in Fig. 2 si osserva l'andamento dell'efficienza fotosintetica alla luce e al buio, in relazione con il tempo, nella prima fase dell'esperimento; questo parametro è importante perché fornisce informazioni sullo stato della coltura in esame. Con la coltura adattata al buio si valuta il valore dello "yield" potenziale massimo dato dal rapporto $(F_m - F_0)/F_m$. Il valore ottenuto può variare a seconda dello stato fisiologico delle cellule: un valore attorno a 0,600 – 0,700 indica che la coltura è in buone condizioni mentre una diminuzione indica uno stato di sofferenza. In seguito ad esposizione a luce attinica, si valuta invece lo yield effettivo che indica l'efficienza fotosintetica effettiva della coltura.

Dal grafico si osserva un aumento dell'efficienza, sia al buio che alla luce, nei primi giorni dell'esperimento. Lo yield al buio mostra valori ottimali dal giorno 3 al 6; lo yield effettivo segue lo stesso andamento ma con valori più bassi dovuti ad un dispendio maggiore di energia durante la fotosintesi. Dal giorno 6 si ha diminuzione sia dello yield al buio che di quello alla luce, probabilmente dovuto allo stress causato dal calo di nutrienti; questa correlazione è stata studiata in modo più approfondito in uno studio di

dottorato (Samorì, 2012) all'interno del quale si è inserita la presente tesi di laurea.

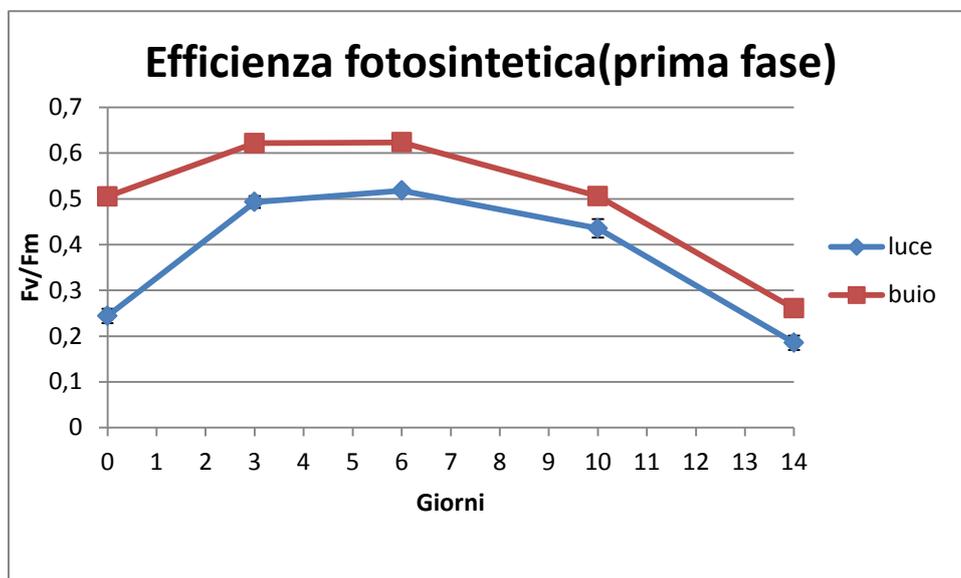


Figura 7: efficienza fotosintetica alla luce e al buio nella prima fase dell'esperimento.

Nelle figure 3 e 4 sono riportati i grafici dell'efficienza fotosintetica, rispettivamente al buio e alla luce, per le due colture derivate dalla diluizione effettuata alla fine della prima fase. Per quanto riguarda l'efficienza fotosintetica al buio (Fig. 3) si può osservare come le curve relative alle due diluizioni siano quasi sovrapposte a parte negli ultimi due giorni di analisi dove si osservano valori leggermente più elevati nella condizione diluita al 50%.

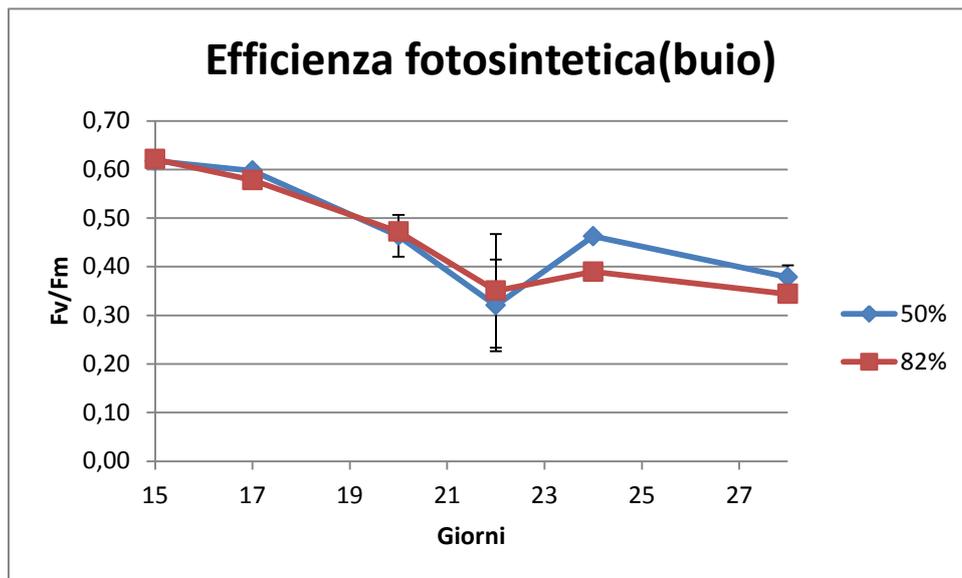


Figura 8: efficienza fotosintetica al buio durante la seconda fase dell'esperimento per entrambe le diluizioni.

Le curve decrescono da un valore ottimale di yield di 0,6 a circa 0,35, questo andamento è giustificato da una condizione prolungata di limitazione da nutrienti. La diversa diluizione delle colture sembra quindi non influenzare l'efficienza fotosintetica massima. Inoltre nella prima fase (figura 2) lo yield al buio raggiunge valori più bassi, quindi l'aumento dell'intensità luminosa da 88,2 a 140 $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$ non sembra influenzare negativamente lo status dell'apparato fotosintetico delle cellule. Anche nel grafico rappresentante l'efficienza fotosintetica alla luce si osserva una sovrapposizione delle curve delle due diluizioni ed entrambe le colture raggiungono valori di yield molto bassi. Le diluizioni non influenzano lo yield alla luce così come osservato per lo yield al buio, ma probabilmente valori così bassi sono dovuti alla carenza di nutrienti protratta per un lungo periodo, in quanto nel grafico della prima fase (figura 2) lo yield alla luce mostra valori più elevati.

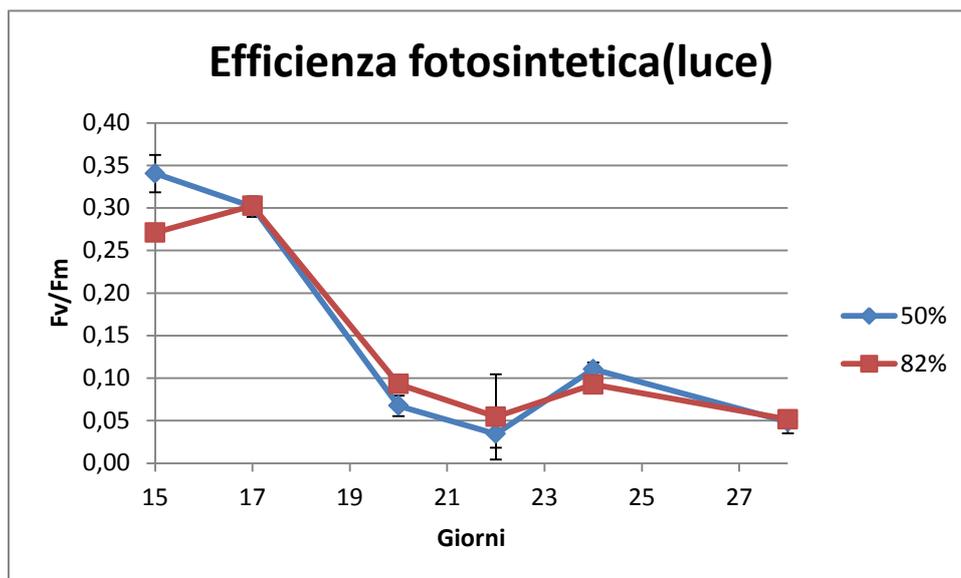


Figura 9: efficienza fotosintetica alla luce durante la seconda fase dell'esperimento per entrambe le diluizioni.

Di seguito sono mostrati i grafici rappresentanti i solidi sospesi totali e quelli volatili; questa analisi è stata svolta solo nella seconda fase dell'esperimento. Si osserva come la condizione meno diluita (50%), rappresentata in grafico dalla curva blu, mostri valori più elevati di concentrazione ma una crescita più lenta rispetto alla coltura più diluita (82%). Nello specifico sono stati riportati tassi di crescita pari a $0,17 \text{ day}^{-1}$ e $0,21 \text{ day}^{-1}$ rispettivamente per le colture diluite al 50% e al 82%. Gli andamenti dei due grafici sono paralleli. La biomassa nell'ultimo giorno di esperimento raggiunge una concentrazione di 1632 mg/L per la condizione diluita al 50%, mentre per quella più diluita la concentrazione è di 957 mg/L . I valori di crescita sono mediamente più bassi rispetto a quelli riportati in letteratura. Si è osservato in riferimento allo studio condotto da Martinez et al, (2000) che l'alga *Scenedesmus obliquus* fatta crescere in un effluente secondario ad una intensità luminosa estremamente più alta e con un apporto maggiore di nutrienti, ha raggiunto valori di velocità di crescita pari a $0,7/0,8 \text{ day}^{-1}$. Inoltre in studi preliminari condotti in una tesi di dottorato (Samorì, 2012) la stessa alga nelle medesime condizioni di luce, temperatura e terreno di questo studio, ha raggiunto valori più alti ($0,48 \text{ day}^{-1}$); probabilmente lo stress dovuto alla carenza di nutrienti protratta per un

lungo periodo di tempo che si è volutamente testato in questo studio ha causato una drastica diminuzione del tasso di crescita di *Scenedesmus* sp.

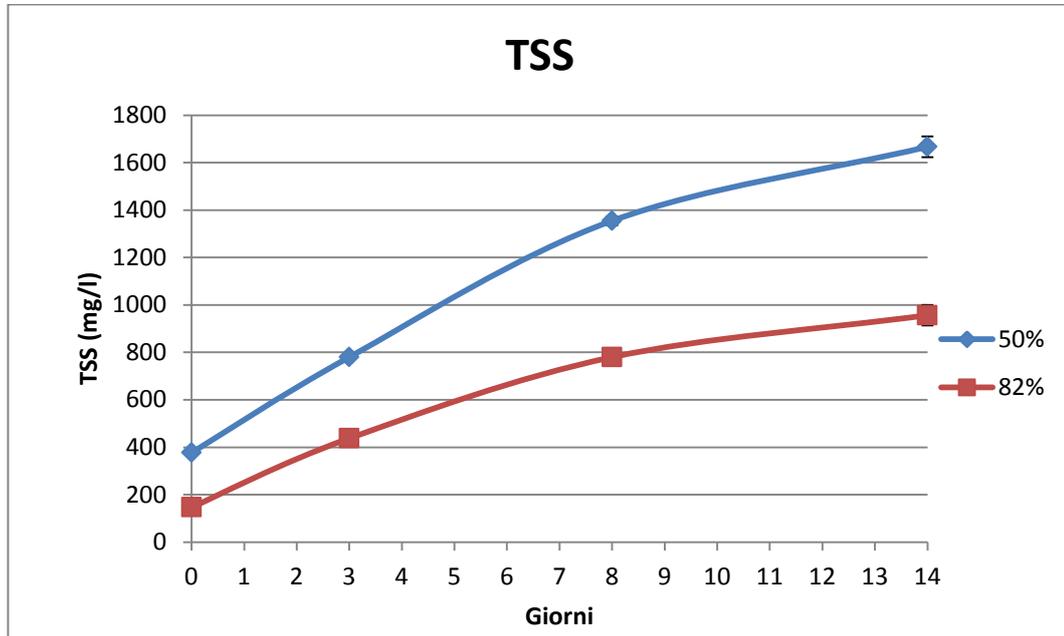


Figura 10: andamento dei solidi sospesi totali alle due diluizioni.

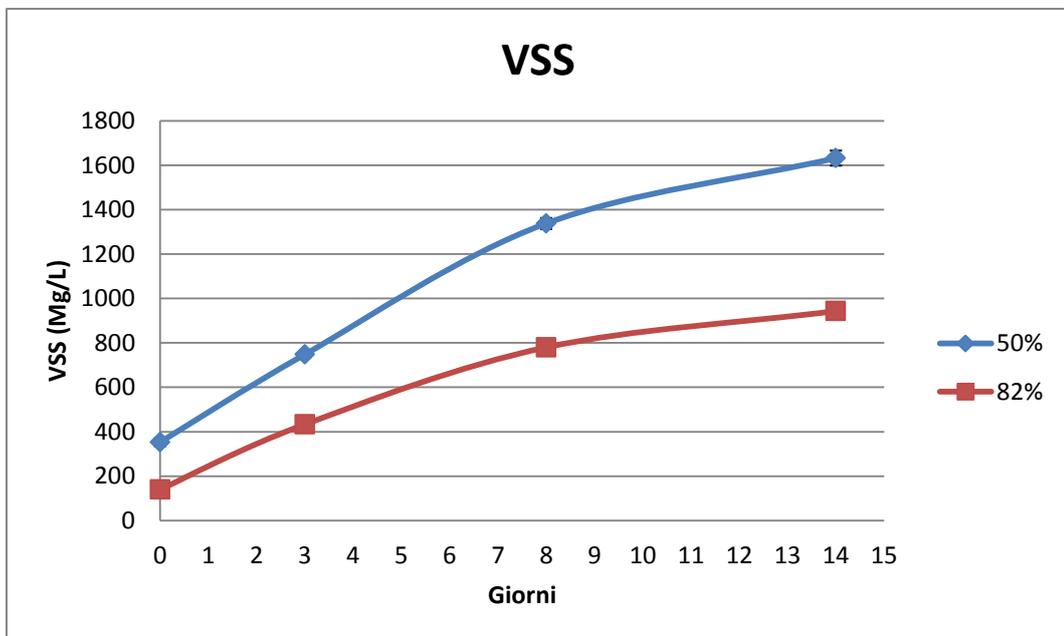


Figura 11: andamento dei solidi sospesi volatili alle due diluizioni.

In tabella 1 sono riportate le concentrazioni iniziali dei nutrienti misurati nel mezzo di coltura filtrato. Le analisi sono state svolte il giorno 0 della seconda fase subito dopo le diluizioni. I nitrati misurati nella coltura più diluita (82%) sono in concentrazione più elevata rispetto all'altra condizione. (50%). I nitriti sono presenti in entrambe le colture ma con concentrazioni bassissime, in quanto non superano 0,04 mg/L.

L'ammonio in entrambe le condizioni è presente in concentrazioni inferiori a 0,2 mg/L.

DILUIZIONE	NITRATI		NITRITI		AMMONIO	
	Conc. mg/L	Dev.st.	Conc. mg/L	Dev.st.	Conc. mg/L	Dev.st.
50%	1,46	0,17	0,04	0,03	0,14	
82%	4,00		0,01	0,01	0,21	0,06

Tabella1: concentrazione dei nutrienti presenti nelle colture nel giorno 0 della seconda fase.

Nelle figure 5-6-7 riportate di seguito è rappresentata la composizione della biomassa algale, le analisi sono state svolte l'ultimo giorno della prima fase (prima della diluizione) e l'ultimo giorno della seconda fase (dopo la diluizione). I risultati sono espressi in percentuale di peso su VSS. I valori indicati con "prima della diluizione" sono coincidenti per entrambe le colture, in quanto nella prima fase sono cresciute alle stesse condizioni.

Nell'ultimo giorno di esperimento la percentuale di polisaccaridi nella condizione di diluizione al 50% raggiunge il 70% mentre la coltura più diluita presenta un valore leggermente superiore al 60%.

L'andamento delle proteine è analogo a quello dei polisaccaridi anche se le percentuali mostrano valori di 11% per la condizione di diluizione al 50% e 7% per l'altra coltura.

Nell'ambito della tesi di dottorato di Samorì (2012), già sopra citata, è stata studiata la composizione biochimica della biomassa di *Scenedesmus* sp. in fase stazionaria, cresciuta in una coltura batch utilizzando come terreno lo stesso effluente secondario utilizzato in questo studio ad una intensità luminosa di $440 \mu\text{Einstein m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sono state rilevate concentrazioni di polisaccaridi, proteine e TFA pari a 61,9%, 9,6% e 9,3% rispettivamente. Paragonando questi risultati con quelli ottenuti nel presente lavoro si può

notare come la percentuale dei polisaccaridi ottenuta nel suddetto studio sia molto simile a quella della condizione più diluita (82%), mentre la percentuale di proteine descriva una condizione intermedia tra le due diluizioni (50% e 82%).

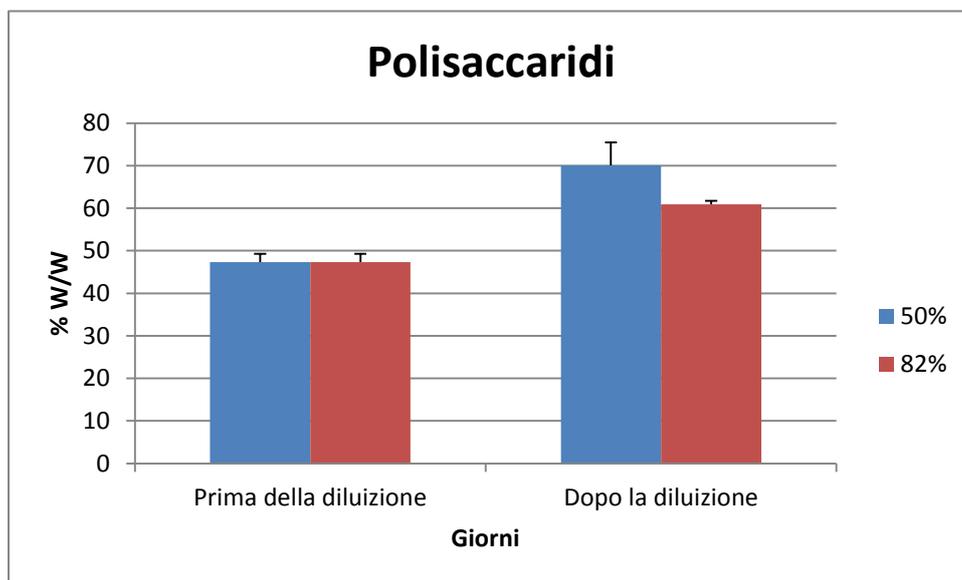


Figura 12: % in peso su VSS (%W/W) di polisaccaridi alle due diluizioni.

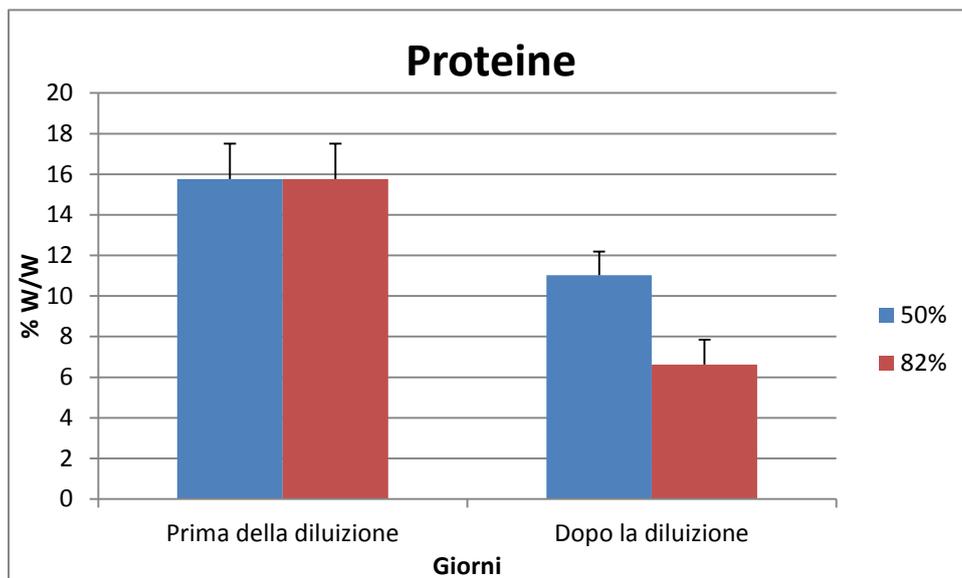


Figura 13: % in peso su VSS (%W/W) di proteine alle due diluizioni.

Le analisi degli acidi grassi sono state svolte nell'ultimo giorno della prima fase (giorno 0) e nella seconda fase dell'esperimento (giorni 3, 8 e 14 a partire dalla diluizione). Si può osservare dal grafico come la concentrazione degli acidi grassi aumenti nel tempo nelle cellule di entrambe le condizioni, tuttavia aumentando la diluizione (82%) sono presenti valori percentuali più elevati, fino a un massimo di 14,1% nell'ultimo giorno di analisi. Se si tiene conto però della concentrazione di acidi grassi espressa sul peso secco si ottiene che nella condizione diluita al 50% la concentrazione di acidi grassi è di 158,3 mg/L, mentre in quella diluita all'82% è di 132,96 mg/L. La coltura meno diluita (50%) ha quindi una concentrazione maggiore in quanto è comunque caratterizzata da valori di biomassa più elevati. Nello studio di Rodolfi et al. (2008) si è osservato come la prolungata carenza di nutrienti sia responsabile dell'accumulo di acidi grassi. Infatti dopo cinque giorni in di carenza di nutrienti una coltura di *Nannochloropsis* sp. aumenta il contenuto di acidi grassi fino a raggiungere il 50% su biomassa secca alla fine dell'esperimento (21 giorni). In questo studio non sono state raggiunte percentuali di acidi grassi così elevate soprattutto perché le alghe del genere *Scenedesmus* non sono oleaginose quanto quelle del genere *Nannochloropsis* ma si è osservato comunque un aumento di acidi grassi causato probabilmente dalla prolungata carenza di nutrienti.

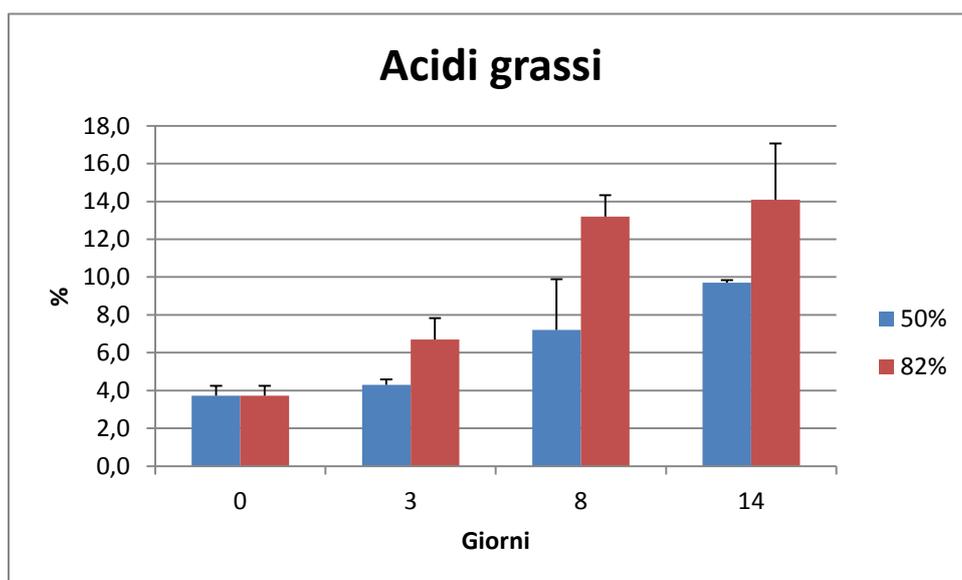


Figura 14: % di peso su peso secco di acidi grassi alle due diluizioni.

In tabella 3 sono riportate le percentuali relative di ogni singolo acido grasso nel giorno 0 (prima della diluizione) e nell'ultimo giorno di analisi. Gli acidi Linoleico e i due isomeri dell'Oleico sono stati considerati insieme, in quanto durante l'analisi con il gas-cromatografo non è stato possibile distinguere i picchi separatamente. Si osserva come l'acido Hexadecadienoico sia più abbondante prima della diluizione. Gli altri acidi grassi variano ma in quantità non rilevanti.

	PRIMA DILUIZIONE		ULTIMO GIORNO			
	% Relativa	Dev.st.	50%		82%	
			% Relativa	Dev.st.	% Relativa	Dev.st.
HEXADECADIENOICO	11,67	5,58	4,68	0,65	2,22	2,66
HEXADECATRIENOICO	3,50	2,44	1,68	0,04	3,01	1,82
PALMITICO	30,43	4,14	24,00	0,31	24,64	0,66
LINO+OLEICO	53,38	0,96	65,98	0,24	66,96	0,07
STEARICO	1,01	0,22	3,66	0,55	3,17	0,12

Tabella 2: % relativa dei singoli acidi grassi prima della diluizione e nell'ultimo giorno di analisi.

Durante l'esperimento, nella seconda fase, sono state svolte le analisi per calcolare la percentuale di azoto e carbonio all'interno delle cellule della coltura. I risultati sono rappresentati dai grafici riportati di seguito, che mettono in relazione la percentuale di azoto e carbonio calcolata sul peso secco con il tempo. In figura 11 si nota come la percentuale di azoto sia simile in entrambe le diluizioni ma anche come questa diminuisca progressivamente nel tempo. Il giorno 0 descrive la percentuale calcolata il giorno prima della diluizione.

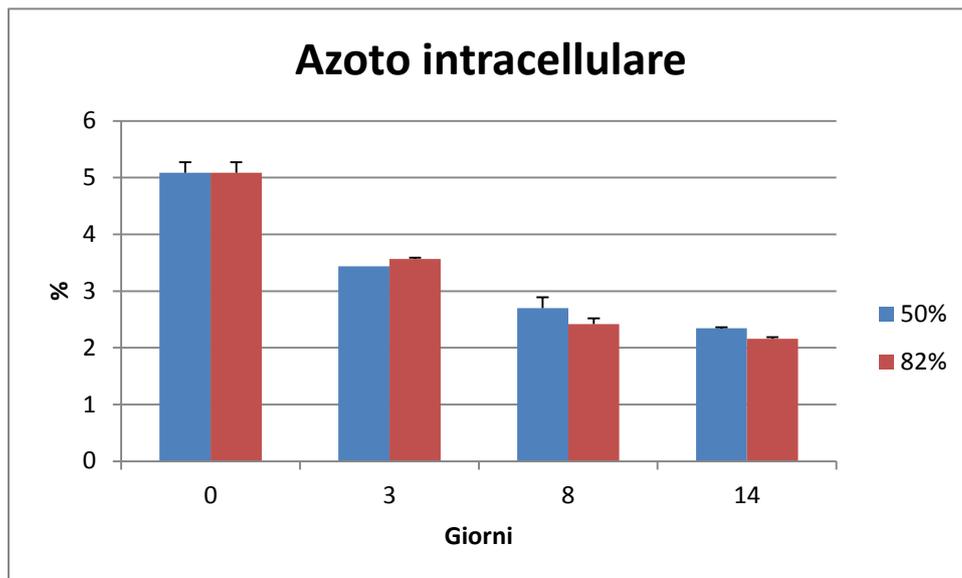


Figura 15: percentuale di azoto intracellulare alle due diluizioni.

Rispetto all'azoto la percentuale di carbonio intracellulare aumenta nel tempo e tra le due diluizioni si notano differenze più accentuate anche se non superiori a circa il 3%.

L'analisi elementare è in accordo con l'analisi biochimica, infatti in corrispondenza di un aumento della percentuale di carbonio nel tempo vi è un aumento degli acidi grassi e dei polisaccaridi.

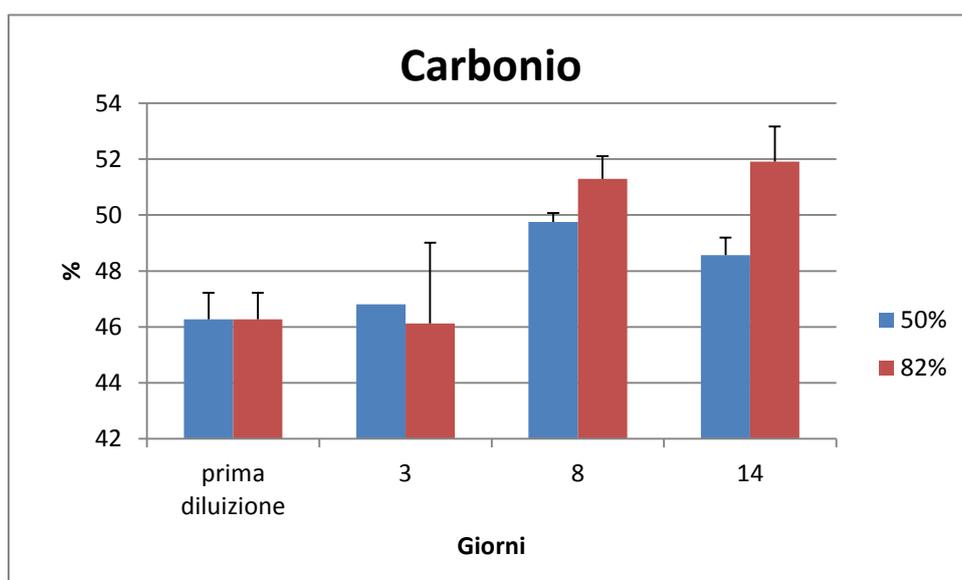


Figura 16: percentuale di carbonio intracellulare alle due diluizioni

In figura 14 è mostrato il grafico che evidenzia il rapporto tra carbonio e azoto espresso in percentuale su peso atomico, si nota come il rapporto aumenta nel tempo per entrambe le diluizioni. La condizione con diluizione all'82% raggiunge negli ultimi giorni valori leggermente più alti rispetto all'altra condizione di diluizione. Si può infine notare come l'aumento del rapporto C/N sia in effetti correlato con l'aumento degli acidi grassi (fig 10).

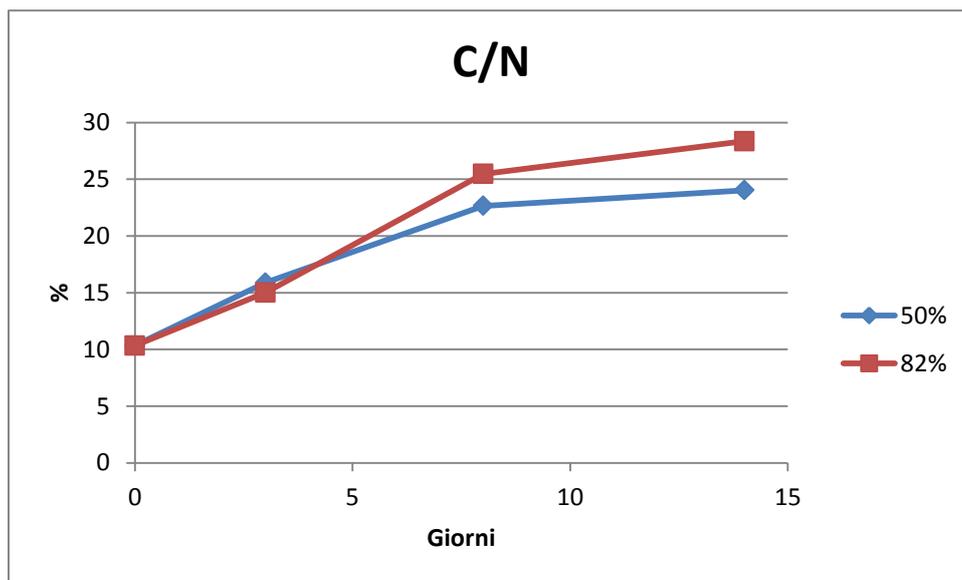


Figura 17 rapporto % tra carbonio e azoto cellulari.

Conclusioni

In seguito al crescente interesse che la società moderna sta riservando alle innumerevoli applicazioni delle microalghe questo studio nello specifico si è posto come obiettivo principale quello di valutare l'utilizzo della microalga *Scenedesmus* sp. per la depurazione delle acque reflue urbane. La scelta di questo trattamento rappresenta un'alternativa ai metodi chimici ed ai convenzionali trattamenti biologici in vista del possibile utilizzo della biomassa algale prodotta nel campo di applicazione delle energie rinnovabili.

Per quanto concerne l'aspetto depurativo delle acque, il primo studio si è incentrato sulla valutazione dell'efficienza di rimozione dei nutrienti in sistemi semicontinui che simulano ciò che nella realtà avviene in una vasca "high rate pond". Visti gli obiettivi prefissati e i limiti imposti dal DLgs 152/2006, riferiti alla concentrazione di azoto ammoniacale (limite: ≤ 15 mg/L), si può concludere che un tempo di residenza idraulica di 1.5 giorni non è sufficiente per la depurazione in quanto la concentrazione dell'effluente in uscita al sistema supera i limiti stabiliti per legge. Al contrario i tempi di residenza idraulica di 3 e 5 giorni sono risultati essere ottimi per il trattamento del refluo, in quanto fin dal primo giorno di trattamento consentono di ottenere un effluente con concentrazioni ampiamente al di sotto dei limiti di legge.

La condizione con tempo di residenza idraulica di 3 giorni, oltre all'elevata efficienza nel trattamento del refluo, permette di ottenere la stessa produttività di biomassa algale, in termini di mg/L/giorno, degli altri due tempi di residenza idraulica e consente rispetto alla condizione con tempo di residenza idraulica di 5 giorni il trattamento di un volume maggiore di acqua per unità di tempo.

Dalla caratterizzazione della biomassa, ottenuta nella condizione con tempo di residenza idraulica di 5 giorni, si è osservato un più elevato rapporto C/N che risulta essere ottimale per un eventuale applicazione della biomassa stessa in processi di digestione anaerobica per la produzione di biogas. Inoltre è stato possibile notare come tale rapporto sia dovuto a una minor concentrazione di azoto cellulare che è conseguenza all'immissione nel sistema di bassi quantitativi di ammonio.

In conclusione, in base agli obiettivi prefissati, possono essere adottate diverse soluzioni per la messa a regime del sistema di coltivazione di microalghe con l'utilizzo di acque reflue. Se l'obiettivo prioritario è quello di trattare acque di scarto in alternativa ai metodi convenzionali, come quelli a fanghi attivi, sarebbe preferibile adottare tempi di residenza idraulica dell'ordine dei 3 giorni; questo tempo permette la depurazione efficiente di un maggior volume d'acqua, rispetto a quello trattabile a tempi di residenza idraulica superiori, a discapito però dell'ottimizzazione della composizione della biomassa algale. Se invece l'obiettivo principale è quello di ottenere una biomassa più interessante per l'applicazione nel campo della produzione di energia rinnovabile, mettendo quindi in secondo piano la necessità di depurare consistenti volumi di acqua nel minor tempo possibile, la scelta di un tempo di residenza idraulica di 5 giorni è risultato essere la condizione migliore.

Il secondo esperimento si proponeva di indagare quali fossero le condizioni più favorevoli per ottimizzare ulteriormente la composizione biochimica ed elementare della biomassa algale ai fini di renderla sempre più idonea per un futuro utilizzo nel campo delle energie rinnovabili.

A tal fine si è visto come, applicando una prolungata carenza di nutrienti, si ottenga un aumento del rapporto C/N e in particolare un aumento della percentuale di acidi grassi.

Le due diluizioni apportate hanno determinato alcune differenze in quanto nella coltura diluita al 50% si è osservata una variazione degli acidi grassi prodotti dal 3% al 9,7% con il prolungarsi della fase di stress da carenza di nutrienti, mentre nella condizione diluita all'82% la percentuale è arrivata al 14%.

La coltura con minore diluizione (50%) ha prodotto valori di biomassa più elevati con tempi di crescita più lenti rispetto all'altra coltura, probabilmente in conseguenza della più alta concentrazione di cellule che ha portato a fenomeni di ombreggiamento nei confronti della luce. Questa ipotesi non ha però riscontrato differenze significative nei risultati ottenuti mediante la misura della fluorescenza al PAM. La velocità di crescita della coltura diluita all'82% risulta più elevata tuttavia la concentrazione di biomassa algale si assesta a valori più bassi rispetto a quelli ottenuti nell'altra coltura.

La percentuale per unità di biomassa di acidi grassi ottenuti nella condizione di diluizione al 82% è risultata essere maggiore ma, tenendo conto della concentrazione di tali composti su litro di coltura, la produttività in termini assoluti è superiore nella condizione di diluizione più bassa con valori raggiungendo 158,3 mg/L contro i 132,96 mg/L della coltura diluita all'82%.

Nonostante la microalga *Scenedesmus* sp. non sia tra le specie più rinomate per l'abbondanza di acidi grassi, l'elevata velocità di riproduzione e la capacità di tollerare ed utilizzare elevate quantità di nutrienti la rendono una possibile specie candidata all'impiego in colture massive per la produzione di biomassa utile alla produzione di energia rinnovabile. Inoltre il presente lavoro ha dimostrato come, sottoponendo la coltura a condizioni specifiche di stress, sia possibile incrementare la produzione di composti utili, quali acidi grassi per la produzione di biodiesel, e aumentare il rapporto C/N, caratteristica fondamentale per ottenere elevate rese nella produzione di biogas.

Bibliografia

Abdulquader G, Barsani L., Tredici M., 2000 Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossom (Chad) and its household usage among the Kanembu. *Jornal of Applied Phycology* 12: 493-498, 2000.

American Public Health Association, (1995) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association Washington, DC.

Barnwal B.K; Sharma M.P., 2004 Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Biotechnology Adv* 25 (2007) 294–306.

Becker, E.W., 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press.

Chisti, J., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294-306.

Chisti, J., 2008. Response to Reijnders: do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants? *Trends Biotechnol.* 30, 1-2.

De la noüe J, Lalibertè G., Proulx D.,(1992). Algae and wastewater. *J. Appl. Phycol.*, 4, 247-254.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.

Egan P.F., Trainor F. R., 1989. Low cell density: The unifying principle for unicell development in *Scenedesmus* (Chlorophyta) *Br. Phycol J.* 24:271-83.

Gonzalez L. E, Canizares R.O., Baena S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *chlorella vulgaris* and *scenedesmus dimorphus*.

Griffiths, M.J., Hille, R.P., Harrison, S.T.L., 2011. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *Journal of Applied Phycology*.

IEA (International Energy Agency) (2004) *Biofuels for transport – An international perspective*. OECD www.iea.org.

Lee, Y.K, 2001. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *J. Appl. Phycol.* 13(4): 307-315.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

Lurling M., 1998. Effect of grazing associated infochemicals on growth and morphological development in *Scenedesmus acutus* Meyen (Chlorophyceae) *J. Phycol*, 34, 578-586.

Martínez, M., Sánchez, S., Jiménez, J., El Yousfi, F., Muñoz, L., 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* 73, 263-272.

Metcalf e Eddy, 2006. *Ingegneria delle acque reflue trattamento e riuso*. MCGRAW-HILL, quarta edizione.

Myklestad, S., Haug, A., 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 9, 125-136.

Rodolfi, L., Zitelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., 2008. Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102, 100-112.

Ruiz-Marin A., Leopoldo G. Mendoza-Espinosa ,*, Stephenson T.,2010 Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology* 101 (2010) 58–64.

Samorì G.,2012. Algal Wastewater treatment and biomass producing potential: nutrient removal efficiency and cell physiological responses. Ph.D. thesis.

Sanchez Miron A., Contreras Gomez A.,Garcia Camacho F., Molina Grima, and Chisti Y.(1999). “Comparative Evaluation of Compact Photobioreactor tors for large-scale monoculture of microalgae”. *J. Biotechnol*, 70,251 (1999).

Trainor, Francis M., 1963, Spine distribution in several *Scenedesmus* Cultures. *Amer, Jour, bot.* 51(9): 995-1001. 1964.

Trainor F. R., 1992. Cyclomorfofosis in *Scenedesmus armatus* (Chlorophyta): An ordered sequence of ecomorph development. *J. Phicol.* 28:553-558.

Wen Z., B. Johnson M.,2009. Microalgae as a Feedstockfor BiofuelProduction. Virginia cooperative extension Publication 442-886.

Woert I.; Feffer A.; Lundquist; and Nelson Y, 2009. *Journal of Enviromental Engineering*, American Society of Civil Engineers, 135(11):1115-1122.