

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

CARATTERIZZAZIONE DEI PARAMETRI FISIologici DI
MICROALGHE UTILIZZABILI NEI PROCESSI DI
FITODEPURAZIONE

Tesi di laurea in Botanica Marina Applicata

Relatore

Prof.ssa Rossella Pistocchi

Presentata da

Giuseppina Larivera

III sessione

Anno Accademico 2010/2011

Sommario

INTRODUZIONE	1
1.1 LE MICROALGHE E LE LORO APPLICAZIONI	1
1.2 TECNICHE DI COLTIVAZIONE DELLE MICROALGHE PER SCOPI INDUSTRIALI	5
1.3 DEPURAZIONE DELLE ACQUE REFLUE	8
1.3.1 <i>Depurazione dei reflui: metodo tradizionale</i>	8
1.3.2 <i>Depurazione dei reflui con l'utilizzo di microalghe</i>	9
1.4 FATTORI ABIOTICI E BIOTICI CHE REGOLANO LA CRESCITA ALGALE	12
1.4.1 <i>Miscelamento o mixing</i>	12
1.4.2 <i>Nutrienti</i>	13
1.4.2.1 Uptake di nutrienti	16
1.4.3 <i>Temperatura</i>	18
1.4.4 <i>Luce e fotosintesi</i>	19
1.4.4.1 Fluorescenza della clorofilla, quenching fotochimico e non fotochimico	22
1.4.4.2 Relazione tra assorbimento della luce e fotosintesi netta	24
1.4.4.3 Fotoacclimatazione	26
1.4.5 <i>Rapporti con altri livelli trofici</i>	27
MATERIALI E METODI	31
3.1 PIANO SPERIMENTALE	31
3.2 SPECIE ALGALI UTILIZZATE	32
3.3 TERRENO DI COLTURA	37
3.4 COLTURE <i>BATCH</i> E IN SEMICONTINUO	37
3.5 ANALISI DELLE PROTEINE	38
3.6 ANALISI POLISACCARIDI	40
3.6.1 <i>Estrazione dei polisaccaridi</i>	40
3.6.2 <i>Determinazione dei polisaccaridi</i>	40
3.7 ANALISI DELLA CLOROFILLA A	41
3.8 MISURA DELL'ATTIVITÀ FOTOSINTETICA	41
3.8.1 <i>Induction curve e Light curve</i>	44
3.9 ANALISI QUALITATIVA E QUANTITATIVA DEL FITOPLANCTON	46
3.9.1 <i>Conservazione dei campioni</i>	46
3.9.2 <i>Preparazione dei campioni per il conteggio</i>	46
3.9.3 <i>Conteggio dei campioni</i>	46
3.9.4 <i>Calcolo del biovolume</i>	47
3.10 ANALISI NUTRIENTI.....	49
3.10.1 <i>Analisi dei fosfati</i>	49
3.10.2 <i>Analisi dei nitrati</i>	50
3.10.3 <i>Analisi nitriti</i>	50
3.10.4 <i>Analisi dell'azoto ammoniacale</i>	51
RISULTATI E DISCUSSIONE	53
4.1 COLTURA DI <i>SCENEDESMUS</i> SP. IN SEMICONTINUO.....	53
4.2 POPOLAZIONE NATURALE IN COLTURA <i>BATCH</i>	66
CONCLUSIONI	75
BIBLIOGRAFIA	79

Introduzione

1.1 Le microalghe e le loro applicazioni

Le microalghe, insieme ai cianobatteri che con le microalghe condividono il metabolismo bioenergetico (la fotosintesi ossigenica) ma ne differiscono per la struttura cellulare (eucariotica nelle prime, procariotica nei secondi), sono organismi unicellulari fotoautotrofi che, a partire da CO₂ ed energia solare, producono zuccheri per il proprio metabolismo energetico e biosintetico, ed ossigeno che in parte usano con la respirazione ed in parte rilasciano nel mezzo esterno; sono inoltre direttamente responsabili di quasi il 50% della fotosintesi sulla terra (Tredici, 2007).

Comunemente questi microrganismi presentano un contenuto di proteine, carboidrati e grassi che varia notevolmente secondo le specie e le caratteristiche dell'ambiente in cui crescono: i lipidi, ad esempio, sono compresi tra un minimo dell'1 % ed un massimo del 40 % del loro peso secco. Tali quantità possono variare in relazione alle condizioni di allestimento delle colture e alla temperatura così, quando le alghe unicellulari crescono in situazioni di carenza di sostanze nutritive, possono incrementare la resa di lipidi ad oltre il 70 % del loro peso secco e raggiungere valori di produttività pari a 12-14 g DW (peso secco) m⁻² day⁻¹ (Walker, 2009; Mata, 2010).

Gli studi svolti per potenziare l'impiego delle alghe come coltura a uso energetico in diverse regioni del mondo hanno evidenziato la loro flessibilità. E' stato dimostrato che la crescita delle microalghe risulta notevolmente più rapida di quella delle piante terrestri se le alghe sono opportunamente fornite di nutrienti, luce e CO₂ (Pulz, 2001). Diverse aziende stanno infatti dimostrando come le alghe possano essere utilizzate nella produzione di carburante per i trasporti e di ingredienti per mangimi, o persino quale fonte di combustione per la generazione di energia da biomassa (Rittmann, 2008).

Rispetto ad altre colture energetiche, le alghe presentano diversi vantaggi: comprendono organismi con cicli di crescita brevi e, a differenza di altre colture stagionali, possono essere coltivate tutto l'anno. Ma soprattutto non ha bisogno di terreni agricoli o di acqua pulita e, di conseguenza, non sottrae risorse per l'agricoltura e quindi non va a sottrarre spazio per la produzione di fonti alimentari. Le alghe non necessitano, come detto, di acque particolarmente pulite: grazie alla loro naturale resistenza sono infatti in grado di prosperare perfino nelle acque reflue. Se confrontato direttamente con altre colture energetiche, inoltre, l'uso di questi organismi risulta più vantaggioso in termini economici data la loro maggiore produttività per ettaro di terreno rispetto al granturco, alla soia o alla palma da olio e, a differenza di queste colture, la biomassa che generano può essere utilizzata interamente nei prodotti finiti (Brennan, 2010). Ad esempio, mentre da un ettaro di palma da olio, la coltura oleaginosa a più alto rendimento in grasso, è possibile recuperare circa 6.000 litri di prodotto, è stato stimato che dalla stessa superficie coltivata a microalghe è possibile ottenere quasi 20.000 litri di olio. Le microalghe hanno strutture cellulari semplici e quindi è semplice controllare la loro composizione cellulare senza andare a diminuire la produttività, inoltre possiedono valori di rendimento quantico, legato alla fotosintesi, che varia dal 3% all'8% dell'energia solare che è convertita in biomassa e, se confrontata con le piante terrestri (0,5%), risulta notevolmente maggiore (Verma *et al.*, 2010). Questi organismi, poi, oltre a poter essere impiegati nella produzione di biocarburanti rinnovabili, contribuendo pertanto a ridurre la dipendenza dai combustibili fossili, sono in grado di trarre nutrimento dalle emissioni di CO₂ derivanti dalle centrali elettriche a combustibili fossili e di abbatterne le emissioni producendo al contempo biomasse ricche di oli (Scott, 2006).

Si ritiene che la prima coltivazione di alghe sia avvenuta a opera di Beijerinck nel 1890 utilizzando la microalga *Chlorella* che tutt'oggi è una delle microalghe più coltivate per scopi commerciali. I primi studi sulla possibilità di coltivare le microalghe per fini energetici invece risalgono alla fine degli anni quaranta del secolo scorso quando Hans Gaffron individuò una microalga, del genere *Scenedesmus*, in grado di produrre idrogeno in condizioni di anaerobiosi (Gaffron, 1942). L'attenzione verso nuove fonti di energia alternative a quelle fossili, ha rinnovato gli sforzi della ricerca circa l'impiego di tale risorsa, tuttavia a causa degli

elevati costi capitali e di gestione degli impianti non è stata ancora avviata la fase di produzione commerciale. Le ricerche puntano ad ottenere valori di produzione con rendimenti prevedibili e, per far sì che il bilancio energetico della produzione di biocombustibili da microalghe risulti positivo, è basilare mettere a punto sistemi di coltura e processi a basso costo. Lo sviluppo su scala industriale di queste tecnologie contribuirà a ridurre la dipendenza dalle fonti energetiche non rinnovabili di molti Paesi e favorirà la diffusione di biocombustibili realmente sostenibili.

Microalghe di varie specie, come *Haematococcus pluvialis*, *Arthrospira platensis* e *Dunaliella salina*, vengono già prodotte a livello commerciale in vari Paesi per l'estrazione di carotenoidi o per la produzione di integratori alimentari; nell'industria mangimistica le microalghe rivestono particolare importanza per l'allevamento di avannotti, di molluschi bivalvi, e per la formulazione di alimenti per il bestiame poiché ricche di acidi grassi $\omega 3$ e $\omega 6$. Per l'industria alimentare è utilizzata la presenza, nelle microalghe, di sostanze come il β -carotene, che viene utilizzato come colorante alimentare e integratore dietetico; il glicerolo, un altro prodotto delle microalghe, è usato negli alimenti, nei cibi e nelle bevande. Infine nell'industria farmaceutica le microalghe sono utilizzate per l'estrazione di acidi grassi polinsaturi ad elevato valore nutraceutico, come ad esempio l'Epa (acido eicosapentaenoico) e il Dha (acido docosaesaenoico), e per la produzione di diagnostici avanzati come le ficobiliproteine su cui si basa la realizzazione di biosensori (Mc Hugh, 2003; Pulz *et al.*, 2004).

Ancora in fase sperimentale sono le coltivazioni di specie utili per il risanamento di reflui contaminati da xenobiotici e metalli pesanti e per la produzione di biodiesel e idrogeno. Le ricerche in tal senso sono volte a conseguire elevati volumi di produzione con rendimenti prevedibili e programmabili, tali da riuscire a soddisfare significativamente il fabbisogno di carburanti per veicoli, poiché al momento i costi risultano ancora non economicamente vantaggiosi. Alcune analisi economiche dimostrano che il biodiesel di origine algale, anche in relazione all'ottimizzazione della tecnologia e alla crescita incontrollata del prezzo del petrolio, potrà diventare entro breve tempo competitivo con i carburanti tradizionali (Chisti, 2008). Recenti pubblicazioni hanno dimostrato inoltre che a partire dall'olio algale è possibile produrre biocarburanti utilizzabili anche nel settore dell'aerpropulsione (Daggett *et al.*, 2007).

Un ulteriore campo di applicazione in cui sono utilizzate le alghe è quello del trattamento dei reflui di origine urbana o industriale. Questo impiego inoltre potrebbe essere associato alla produzione di biodiesel riducendo significativamente i costi di produzione utilizzando le acque reflue civili o industriali (Schenk *et al.*, 2008; Godos, 2009). Le attività sociali, produttive e ricreative, principalmente in ambito urbano, richiedono ed utilizzano una grande quantità di acqua. La conseguenza diretta dell'utilizzo dell'acqua è la produzione di scarichi che, per poter essere restituiti all'ambiente, devono necessariamente essere sottoposti ad un trattamento depurativo. Le acque reflue prodotte dai centri abitati, che in passato contenevano quasi esclusivamente sostanze biodegradabili, presentano attualmente maggiori problemi di smaltimento a causa della presenza sempre più ampia di composti chimici di origine sintetica, impiegati prevalentemente nel settore industriale. Il mare, i fiumi ed i laghi non sono in grado di ricevere una quantità di sostanze inquinanti superiore alla propria capacità autodepurativa senza vedere compromessa la qualità delle proprie acque ed i normali equilibri dell'ecosistema. E' possibile quindi depurare le acque reflue urbane attraverso il sistema di fitodepurazione riproducendo processi biologici che avvengono naturalmente nei corpi idrici, la depurazione risulta però molto più veloce negli impianti rispetto ai corsi d'acqua grazie all'energia impiegata. Le acque reflue urbane, quindi possono essere utilizzate come fonte di nutrienti per la coltivazione di microalghe per vari fini commerciali. Lo sfruttamento dei reflui in tal senso permette di ridurre il costo di produzione delle microalghe, poiché i sali nutritivi necessari non devono essere acquistati ma provengono da una fonte a costo zero.

Una particolare attenzione va ai reflui industriali poiché contengono una gran varietà di inquinanti (svariate sostanze chimiche organiche, petrolio e i suoi derivati, metalli come Hg, As, Pb, Cr, sali minerali e composti chimici inorganici, sabbie e detriti, sostanze o scorie radioattive) e la loro composizione varia secondo il tipo di processo produttivo. È accertato che per quanto riguarda alcuni metalli pesanti le microalghe riescono a sopravvivere e a depurare il refluo ma le conoscenze riguardo alla depurazione di altre sostanze tossiche sono ancora poco conosciute.

1.2 Tecniche di coltivazione delle microalghe per scopi industriali

La coltivazione delle microalghe su larga scala avviene in bacini, vasche, fotobioreattori e fermentatori con tecniche e volumi diversi, secondo la specie coltivata e le particolari applicazioni. La coltivazione in bacini (*open ponds*) o vasche è largamente usata per scopi commerciali; strutture simili sono i *raceway ponds*, bacini di maggiore estensione e profondità rispetto ai primi, nei quali le microalghe seguono percorsi simili a circuiti (*raceway ponds*). Un'elica, in continuo movimento, evita l'accumulo delle alghe sul fondo, assicurando una sufficiente quantità di luce per lo svolgimento della fotosintesi (Figura 1.1). La profondità di questi bacini è inversamente correlata alla concentrazione cellulare e alla quantità di luce disponibile. Profondità di 15-40 cm rappresentano un compromesso fra esigenze contrastanti quali il dispendio di energia per l'agitazione e la raccolta (pale rotanti, pompe per acqua) e l'escursione termica diurna (Barbato, 2009; Godos, 2009).



Figura 1.1 In alto a sinistra: *Raceways ponds* di *Haematococcus pluvialis*. Impianto Cyanotech (Hawaii). In alto a destra: particolare delle pale che permettono il movimento continuo della coltura. In basso a sinistra: *Open ponds* di *Dunaliella salina* in Australia. In basso a destra: *Raceways ponds*.

Sono stimati valori di produttività per *Chlorella* pari a 15 - 25 g DW m⁻² day⁻¹ in *open pond* con una superficie che va dai 500 ai 5.000 m² ad una profondità di 10-30 cm. La crescita di *Chlorella* e *Scenedesmus* è stata inoltre sperimentata in un particolare sistema all'aperto chiamato Thin-Layared Sloping System, che ha la particolarità di avere una vasca con un piano inclinato e un sistema di pompe che permettono alla coltura di scorrere continuamente e ricevere quindi maggior luce. I risultati che si sono ottenuti sono rispettivamente pari a 24 g DW m⁻² day⁻¹ per *Chlorella* e 19 g DW m⁻² day⁻¹ per *Scenedesmus* (Grobbelaar, 2010). Questi impianti sebbene sono costituiti da strumentazioni semplici presentano l'inconveniente di mantenere mutevoli i parametri ambientali come la temperatura, la concentrazione salina e dei gas disciolti nell'acqua. Ad esempio, il volume dell'acqua può diminuire a causa dell'evaporazione o aumentare per le precipitazioni, mentre la temperatura può avere delle escursioni termiche giornaliere e stagionali. La produttività, poi, può ridursi per l'attività di alcuni parassiti o predatori che contaminano le acque: per ovviare a questo inconveniente spesso si coltivano le alghe unicellulari in ambienti con elevata salinità. Questo accorgimento, però, se da un lato evita la competizione con altre specie acquatiche dall'altro limita le specie di alghe che possono essere impiegate nel processo (Di Termini, 2011).

Così, per ottenere rese in biomassa più elevate, coltivare anche varietà algali che prediligono concentrazioni saline più basse, mantenere costanti le variabili ambientali ed impedire la contaminazione di altri microrganismi sono stati sperimentati i fotobioreattori, strutture chiuse nelle quali le alghe unicellulari non sono a contatto diretto con l'esterno. È stato dimostrato come questi sistemi abbiano un'elevata efficienza e permettono di raggiungere valori alti di biomassa (da 2 a 5 g/L) rispetto agli *open ponds* (Lee, 2001; Wang *et al.*, 2008) con valori di produttività da 50 a 200 g DW m⁻² day⁻¹ (Grobbelaar, 2009). In regimi di irradianza elevata, la massima velocità di produzione di ossigeno, prodotto finale della fotosintesi, in un tipico fotobioreattore tubolare, può essere superiore ai 10 gO₂ m⁻³min⁻¹. Livelli di ossigeno molto superiori ai valori di saturazione corrispondenti alla composizione dell'aria possono inibire la fotosintesi (Molina *et al.*, 2001). Inoltre, un'elevata concentrazione di ossigeno disciolto in combinazione con alte intensità luminose può determinare processi foto-ossidativi in grado di danneggiare le cellule

algali. Per questo motivo si devono porre in essere degli accorgimenti impiantistici che consentano l'eliminazione dell'ossigeno dalla coltura quando i livelli di quest'ultimo crescono oltre determinati limiti.

Attualmente sono disponibili differenti modelli di fotobioreattori (Figura 1.2), sebbene tutti possono essere ricondotti a quattro tipologie fondamentali, quali: a colonna, grossi cilindri posti verticalmente, realizzati in vetro o plexiglas; a tubi (*tubular reactors*), simili ai precedenti ma caratterizzati da un diametro inferiore e disposti orizzontalmente od obliquamente; a pannelli (*flat panels*), vasche in vetro con una faccia molto più estesa dell'altra e collocate in successione; a sacco (*plastic bags*), grandi buste di plastica trasparente di forma varia.

Indipendentemente dalla tipologia, tutti i sistemi chiusi presentano una gestione più complessa ed un costo capitale e operativo degli impianti molto più alto degli *open ponds*. I numerosi vantaggi presentati dai fotobioreattori hanno spinto molti studiosi a ritenere che i fotobioreattori si diffonderanno in futuro più delle semplici vasche all'aperto sebbene, prima di sostenere una simile previsione, si dovrebbe valutare attentamente sia i costi di produzione della biomassa algale sia il consumo energetico derivante dell'impiego dei reattori chiusi. Nonostante i miglioramenti tecnici apportati ai fotobioreattori essi continuano ad avere un elevato costo e una gestione più complessa e dispendiosa rispetto agli *open pond*.



Figura 1.2 Diverse tipologie di fotobioreattori: a colonna, a tubi, a pannelli, a sacco.

1.3 Depurazione delle acque reflue

1.3.1 Depurazione dei reflui: metodo tradizionale

Il trattamento delle acque di scarico si basa normalmente su processi di ossidazione. L'obiettivo primario del trattamento delle acque consiste nella rimozione o riduzione della domanda biochimica di ossigeno (BOD) dei solidi sospesi, dei nutrienti, dei batteri coliformi e della tossicità. Il BOD è una misura della richiesta respiratoria dei batteri che metabolizzano la sostanza organica presente nello scarico. I sistemi di depurazione degli scarichi non basati su alghe dipendono comunque da popolazioni microbiche naturali e dalle loro attività quali crescita, respirazione e fermentazione, che trasformano la materia organica in biomassa microbica e in prodotti terminali quali metano, CO₂, ammonio, ecc.. È stato dimostrato che circa l'80% dell'ossigeno disciolto nelle vasche di sedimentazione primaria deriva dall'attività fotosintetica delle microalghe e che quindi l'apporto di ossigeno alle vasche di depurazione dipende maggiormente dall'attività algale che dallo scambio gassoso che avviene tra aria ed acqua (Pearson, 2003). I sistemi di depurazione presentano alcune limitazioni ad esempio nel fatto che i rifiuti non vengono completamente stabilizzati e che il processo non ha nessun'altra utilità.

Il D.M. del 18 settembre 2002, n. 198 "Modalità di attuazione sullo stato di qualità delle acque, ai sensi dell'art. 3, comma 7, del D.Lgs. 11 maggio 1999, n. 152" riguarda i dati e le informazioni relative all'attuazione delle direttive europee 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane. In particolare, le informazioni relative al settore 2 del Decreto che riguarda la disciplina degli scarichi (Parte A - TRATTAMENTO DELLE ACQUE REFLUE URBANE e Parte B - SCARICHI INDUSTRIALI E DA INSEDIAMENTI PRODUTTIVI).

In un impianto di depurazione possiamo distinguere vari livelli di trattamento dei reflui:

Trattamenti preliminari: Trattamenti finalizzati alla rimozione di parti grossolane, sostanze abrasive e oleose, che non possono essere ammesse ai trattamenti successivi (Masotti, 1987).

Trattamento primario: Trattamento delle acque reflue mediante un processo fisico e chimico che comporta la sedimentazione dei solidi sospesi e, a seguito del quale il BOD5 delle acque reflue in arrivo sia ridotto almeno del 20% prima dello scarico e i solidi sospesi totali delle acque reflue in arrivo siano ridotti almeno del 50% (D. Lgs.n.152/99).

Trattamento secondario: Trattamento delle acque reflue mediante un processo che in genere comporta il trattamento biologico con sedimentazioni secondarie, o un altro processo mediante il quale siano rispettati per lo scarico i requisiti di cui all'allegato 5 del D.Lgs. 152/99 (D. Lgs.n.152/99).

Trattamento terziario: Trattamento successivo che subisce l'effluente di un impianto dopo il trattamento secondario ossidativo e di sedimentazione. Si ha la rimozione dei solidi sospesi residui solitamente tramite filtrazione su mezzo granulare.

Sono chiamati così anche i trattamenti di abbattimento dei nutrienti (azoto e fosforo) (Masotti, 1987).

Disinfezione: è essenziale per l'abbattimento della carica microbica dell'acqua in uscita dall'impianto, riducendola a valori di concentrazione residua accettabili dal punto di vista sanitario e ambientale.

1.3.2 Depurazione dei reflui con l'utilizzo di microalghe

Recentemente il nuovo campo della fitodepurazione è centrato sull'uso di microalghe al posto delle macrofite al fine di ottenere numerosi vantaggi come la diminuzione della superficie utilizzata e dei costi effettivi inoltre richiedono meno energia inoltre viene incrementata la produzione di biomassa algale utilizzabile (Um e Kim, 2009; Park e Craggs, 2010). Nei sistemi basati sulle alghe l'ossigenazione dipende dall'attività fotosintetica e non dalla fornitura meccanica di aria. Perché il processo di rimedio abbia successo, la quantità di O₂ prodotta con la fotosintesi deve superare il valore di BOD misurato. L'attività fotosintetica delle microalghe produce l'ossigeno necessario per ossidare la materia organica presente nelle acque di scarico in entrata al sistema; l'azione inversa, svolta da particolari batteri presenti in natura, tende a scindere le sostanze organiche complesse in sostanze semplici

inorganiche (processo di mineralizzazione) (Figura 1.3). A seconda della tipologia di batteri che intervengono nel processo, ad esempio batteri aerobi come *Nitrosomonas* e anaerobi come *Nitrobacter*, la semplificazione della sostanza organica può avvenire o meno in presenza di ossigeno; in tal caso si sviluppano le condizioni rispettivamente di aerobiosi e di anaerobiosi. Sono ampiamente approvati gli studi che affermano la relazione tra batteri e alghe negli impianti di depurazione (Garcia *et al.*, 2008; Kim, 2007). Sia in ambiente naturale (autodepurazione) che artificiale (impianto di trattamento), l'azione di popolazioni microbiche diverse e in cooperazione tra loro porta alla degradazione delle sostanze inquinanti presenti nelle acque attraverso processi di mineralizzazione e di raccolta in un materiale semisolido (fango) che in seguito può essere separato dalle acque per sedimentazione. I batteri eterotrofici aerobi, responsabili dell'ossidazione, utilizzano l'ossigeno disciolto e producono anidride carbonica (CO_2), azoto (N) e fosforo (P) che insieme all'irradiazione solare permettono il processo di crescita algale.

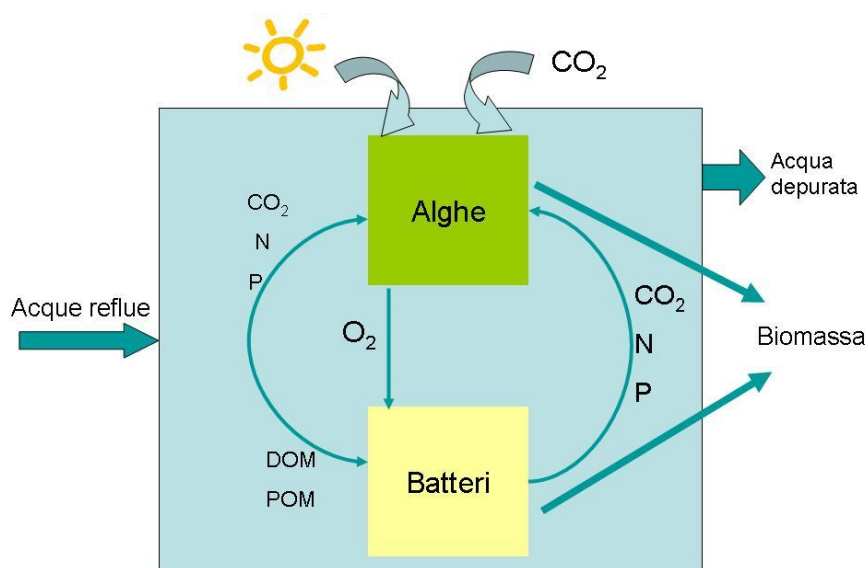


Figura 1.3 Rappresentazione schematica del processo di biorimediazione da parte delle alghe e interazione con i batteri.

La depurazione attraverso trattamenti biologici, come detto, sfrutta tecnologie basate essenzialmente su fenomeni naturali fatti svolgere in ambienti creati artificialmente, in modo che i parametri che regolano tali processi possano essere

controllati in maniera ottimale. Le microalghe utilizzate in questo processo necessitano di particolari condizioni ambientali, i principali parametri che vengono monitorati per controllare e migliorare la crescita algale sono luce e temperatura, è stato dimostrato che l'intensità e la qualità delle radiazioni luminose influenzano la crescita e la riproduzione degli organismi algali, i quali possono fotoacclimatarsi a varie intensità di energia luminosa ed avere un'efficienza fotosintetica più elevata a bassi o alti regimi di luce (Grobbelaar, 2003; Rawat 2011). Per trattamenti biologici intendiamo sistemi solitamente impiegati come trattamenti secondari, finalizzati alla rimozione delle sostanze organiche biodegradabili; tali trattamenti comprendono altresì la rimozione dei solidi in forma colloidale, non sedimentabili e quindi non separabili con trattamenti di tipo fisico. Per via biologica possono essere rimossi anche l'azoto (tramite i processi di nitrificazione-denitrificazione) e il fosforo. La comunità di microrganismi, utile al processo di depurazione, è costituita principalmente da batteri, microalghe e da una variegata microfauna, che in parte sono già presenti nel liquame da trattare, in parte provengono dall'ambiente circostante. Lo sviluppo e la crescita di questa comunità biologica è quindi determinata dalla sostanza organica contenuta nel liquame da depurare. Sono stati ideati diversi tipi di bacini con la funzione di depurare le acque reflue attraverso le microalghe, ad esempio i bacini algali ad alta velocità (HRAP). Queste vasche hanno una bassa profondità (20-100cm) è presente inoltre un sistema di mescolamento che impedisce la stratificazione termica e la sedimentazione delle alghe con una velocità della massa d'acqua di 0,15-0,3 m/s, il tempo di residenza idraulico, cioè il tempo medio nel quale il volume totale di substrato che si trova all'interno del sistema va da 2 a 8 giorni, le alghe principalmente usate sono *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina* (Park *et al.*, 2011). Un altro sistema è quello a bacini integrati, consiste in un sistema di depurazione formato da 3 o più bacini che operano in serie. Il trattamento iniziale avviene in bacini anaerobi, questi hanno la funzione di far sedimentare la massa solida oppure in bacini facoltativi che sono in grado di trattenere il materiale sedimentabile e abbattere buona parte del BOD; seguono le HRAP e quindi i bacini di maturazione per la purificazione finale dell'effluente.

1.4 Fattori abiotici e biotici che regolano la crescita algale

In un sistema di coltivazione microalgale è fondamentale tenere sotto controllo, quando possibile, alcuni parametri che regolano la crescita di questi organismi (Tabella 1.1). Nei seguenti paragrafi sono discussi i principali fattori che influiscono sulla crescita algale in sistemi di coltivazione delle microalghe.

Fattori abiotici	Fattori biotici	Fattori operativi
<input type="checkbox"/> Nutrienti Salinità <input type="checkbox"/> Sostanze tossiche <input type="checkbox"/> O ₂ , <input type="checkbox"/> CO ₂ , pH Temperatura Luce	Patogeni (batteri, virus) Predazione da parte dello zooplancton Competizione	<i>Mixing</i>

Tabella 1.1 Fattori che influenzano la crescita algale, modificato da (De La Noie, 1992).

1.4.1 Mescolamento o *mixing*

La fonte di energia preferibile per la fotosintesi delle alghe coltivate è il sole, negli impianti di coltivazione che hanno bassa profondità le alghe tendono a sedimentare e ad allontanarsi dalla luce e adagiandosi sul fondo potrebbero consumare i nutrienti presenti nell'acqua circostante per cui è importante che, per ottimizzare la crescita, le colture vengano mescolate. La crescita delle microalghe quindi dipende strettamente dal *mixing* che viene effettuato nei sistemi di coltivazione delle alghe sia negli *open ponds* che nei fotobioreattori. Per mantenere in sospensione le microalghe è necessario fornire alla coltura un'aerazione, con aggiunta di CO₂, moderata ma continua come ad esempio nei fotobioreattori o un movimento regolare fornito da pale meccaniche nel caso degli *open ponds* che, oltre ad evitare che le microalghe precipitino sul fondo, fa sì che ogni singola alga riceva adeguate quantità di luce e di nutrienti.

1.4.2 Nutrienti

Tra tutti i fattori ecologici capaci di influenzare la crescita algale, la disponibilità di nutrienti è senza dubbio uno dei più importanti, dopo luce e temperatura (Morabito, 1997). Il fitoplancton necessita di macro e micronutrienti, i macronutrienti sono quelli necessari in maggiori quantità e sono i componenti strutturali delle cellule o sono elementi importanti per l'osmoregolazione ad es.: C, H, O, N, P, S, Mg, Ca, K, Na, Cl e Si. I micronutrienti sono necessari in quantità minime e sono catalizzatori di reazioni enzimatiche, alcuni tra i più importanti sono : Cu, Mn, Fe, Zn, Co e Mo. Dopo l'azoto gassoso (N_2) la forma più abbondante di azoto inorganico (DIN) nelle acque è il nitrato (NO_3^-), le altre sono il nitrito (NO_2^-) e l'ammonio (NH_4^+). Tutte e tre le forme, comprese piccole molecole organiche, possono essere utilizzate; l'assimilazione del nitrato nelle cellule avviene tramite una sua riduzione ad ammonio e richiede maggiore dispendio di energia, tuttavia nel caso della fitodepurazione si deve tenere presente che le acque reflue raggiungono elevati valori di ammonio che possono risultare tossici per le microalghe. Il fosforo è presente come fosforo inorganico (DIP) o fosforo organico (DOP). Il DIP è prevalentemente presente come ortofosfato ed è l'unica forma che può essere utilizzata dalle microalghe tuttavia molte specie possiedono una fosfatasi alcalina extracellulare che permette loro di staccare il fosfato dalle molecole organiche.

Il rapporto atomico con cui i principali elementi sono presenti nel plancton è noto come rapporto di Redfield e prende in considerazione soprattutto carbonio, azoto e fosforo con i seguenti rapporti atomici C:106 N:16 P:1. Nell'ottica della pura ricerca, ma anche nella gestione applicata di ambienti eutrofici, il concetto di nutriente limitante si è rilevato da sempre al centro dell'attenzione. L'idea è stata per la prima volta chiaramente espressa da Justus Liebig nel 1840. La sua definizione che "la crescita di un' alga dipende dalla risorsa presente in quantità minima" è conosciuta come la "legge" del minimo di Liebig. Sono state formulate due limitazioni dell'applicabilità di questa legge: la prima sta nel fatto che essa è strettamente applicabile solo in condizioni di equilibrio stazionario (il flusso in entrata, di energia e materiali deve bilanciare quello in uscita). La seconda considerazione importante è l'interazione dei fattori. Infatti, un'elevata concentrazione, o disponibilità, di certe sostanze o l'influenza di un certo fattore,

diverso da quello limitante, può modificare la velocità di utilizzazione del fattore limitante stesso (Tilman, 1982). A volte gli organismi sono in grado di sostituire, almeno in parte, una sostanza chimica con un'altra, che sia affine alla prima e che scarseggia nell'ambiente. A partire dai primi anni '70 sono stati fatti degli studi per capire quali sono i nutrienti maggiormente limitanti per lo sviluppo delle alghe, soprattutto nell'ambiente marino. Dagli studi è emerso che la crescita algale viene controllata dalla silice, dall'azoto, e soprattutto dal fosforo; tuttavia si è visto che la carenza di solfato comporta una diminuzione dei pigmenti e di enzimi con conseguente riduzione dell'attività fotosintetica. La limitazione da nutrienti in natura è un fenomeno estremamente raro, quest'affermazione non significa che le singole specie non siano soggette a tale limitazione, ma che la comunità algale è in grado di modificare la propria composizione specifica per rimediare ad eventuali limitazioni.

Nell'ambiente naturale è stato visto che i tempi, ma anche i modi in cui i nutrienti si rendono disponibili, possono rivelarsi come importanti fattori di controllo della popolazione. La competizione interspecifica viene evitata, visto che specie diverse hanno differenti periodicità giornaliere nell'assimilare i nutrienti. Alla fine del periodo estivo, con il continuo impoverimento di nutrienti, possono essere favorite le specie di grandi dimensioni, capaci di accumulare nutrienti al loro interno; ma anche la pressione predatoria può indurre un analogo cambiamento della composizione specifica. Generalmente, nel momento in cui si riscontra un rapporto tra richiesta e disponibilità inferiore all'unità, vengono favorite le specie opportunistiche, le specie *r*, di piccole dimensioni, capaci di riprodursi in modo esponenziale; invece quando lo stesso rapporto assume un valore unitario o superiore, allora saranno predominanti le specie caratterizzate da uno sviluppo lento, ma dotate di capacità competitive superiori, ovvero le specie *K*.

Carbonio

La biomassa microalgale contiene circa il 50% di carbonio rispetto al peso secco totale (Miròn *et al.*, 2003) e le microalghe risultano essere dieci volte più efficienti nella fissazione biologica della CO₂ atmosferica rispetto alle piante terrestri; i valori sono ampiamente variabili a seconda delle varie specie con *range* che va da 0,26 mg CO₂ m⁻³ h⁻¹ (Cheng *et al.*, 2006) a 1,33 g CO₂ m⁻³ h⁻¹ (Hirata, 1996). La fonte

principale di carbonio nell'ambito della coltivazione delle microalghe è la CO_2 e le sue concentrazioni nella coltura sono correlate con i valori di pH, pertanto quest'ultimo costituisce un importante parametro da monitorare, nel caso dei fotobioreattori, durante il processo di crescita algale. I valori di pH dovrebbero infatti essere compresi in un campo di valori tra 5,5 e 8. Tuttavia man mano che il processo fotosintetico avanza il consumo di CO_2 da parte delle alghe determina un incremento del pH. È necessario quindi prevedere delle immissioni ulteriori di CO_2 laddove si determini una crescita incontrollata del pH e quindi l'instaurarsi di un ambiente basico che inibisce la crescita algale. Per ottimizzare la crescita microalgale quindi è necessario fornire alla coltura alte concentrazioni di CO_2 in quantità maggiori rispetto alle concentrazioni naturali di CO_2 presenti in ambiente (Pulz, 2007); questo è un requisito essenziale per rendere la produzione di microalghe economicamente vantaggiosa. A tal proposito sono stati sperimentati fotobioreattori che consentono la captazione diretta delle emissioni di CO_2 provenienti da centrali termoelettriche o da altre sorgenti di emissione.

Azoto

Dopo il carbonio, l'azoto è sicuramente il nutriente più importante per la crescita algale in quanto contribuisce direttamente alla produzione di biomassa, il contenuto di azoto intracellulare può variare dall'1% fino a superare il 10% e questo è dovuto principalmente alla disponibilità di nutrienti nel mezzo (Richmond, 2004). Quando le alghe crescono in condizioni di limitazione da azoto, il più importante effetto osservato è la degradazione specifica dei ficobilisomi nei cianobatteri (Collier e Grossman, 1992) che provoca una decolorazione nelle cellule, ma più in generale si osserva un accumulo di carbonio organico dovuto ad aumento di polisaccaridi e acidi grassi (Becker, 1994). L'azoto è presente in gran parte sotto forma di nitrato (NO_3^-) ma spesso anche l'azoto ammoniacale (NH_4^+) e l'urea possono essere utilizzati dalle alghe, è stato dimostrato infatti che le microalghe hanno tassi di accrescimento simili per le varie forme di azoto disponibili (Kaplan, 1986). Quando l'azoto ammoniacale è l'unica fonte di azoto disponibile, il pH potrebbe diminuire significativamente a causa del rilascio di ioni H^+ e questo comporterebbe la diminuzione di zooplancton presente nell'ambiente. Numerosi studi inoltre mostrano che la biosintesi e l'accumulo di lipidi è incrementato in limitazione di

azoto, in particolare l'aumento di lipidi neutri nella forma di triacilgliceroli (Thompson, 1996). L'accumulo di carotenoidi è un'altra caratteristica di molte alghe quando si trovano a crescere in condizioni limitanti di azoto che è spesso accoppiato ad una diminuzione del contenuto di clorofilla cellulare. Ben-Amotz *et al.* (1982) hanno osservato un aumento di β -carotene nell'alga *Dunaliella* in limitazione di azoto. Borowitzka *et al.* (1991) e Zhekisheva *et al.* (2002) in due studi distinti hanno mostrato che la bassa concentrazione di azoto è il fattore principale nella sintesi e nell'accumulo di astaxantina in *Haematococcus pluvialis*.

Fosforo

Il fosforo è un altro macronutriente essenziale che svolge un ruolo importante nei processi metabolici cellulari attraverso la formazione di vari componenti funzionali e strutturali richiesti per la crescita delle microalghe come acidi nucleici, DNA, ATP e NADPH. Quando i nutrienti sono presenti in eccesso e la luce risulta il fattore limitante molte specie algali mostrano un'elevata concentrazione di fosforo cellulare che rappresenta circa l'1% del peso secco (Goldman, 1980). Alcuni effetti dovuti alla limitazione da fosforo risultano simili a quelli osservati nelle culture in carenza di azoto. Il contenuto di clorofilla tende a diminuire mentre il contenuto di carboidrati aumenta (Carr e Whitton, 1982). Nei cianobatteri, rispetto alla mancanza di azoto, in condizione di limitazione da fosforo si osserva una riduzione di ficobilisomi; questo non è dovuto alla degradazione dei pigmenti fotosintetici ma al fatto che la loro produzione si arresta mentre la divisione cellulare prosegue (Collier e Grossman, 1992). L'esaurimento di fosforo nel mezzo di coltura porta un accumulo di β -carotene in *Dunaliella* (Ben-Amotz *et al.*, 1982) e l'accumulo di astaxantina in *Haematococcus* (Boussiba, 1992).

1.4.2.1 Uptake di nutrienti

L'*uptake* di nutrienti è legato a tutti quei fattori che regolano la crescita algale quali la luce, la temperatura, e il *mixing* della coltura.

Fauchot *et al.* (2000) hanno mostrato come i raggi UV-B influenzano l'utilizzo di azoto da parte del fitoplancton. L'esclusione dei raggi UV-B aumenta i tassi di

uptake di nitrati e azoto ammoniacale; in particolare, l'utilizzo dell'urea è risultato molto sensibile alle radiazioni UV-B in quanto la progressiva diminuzione di queste ultime aumentava l'*uptake* dell'urea dal 17% fino al 130% con un effetto favorevole da parte della crescita delle microalghe. Nelle colture algali dove i diversi fattori ambientali sono tali da non limitare la crescita algale, gli organismi crescono a spese di un substrato e, man mano che questo viene utilizzato, si ha un andamento esponenziale della crescita che continua sino a quando vi sia una disponibilità bilanciata dei nutrienti nel mezzo di coltura (Figura 1.4).

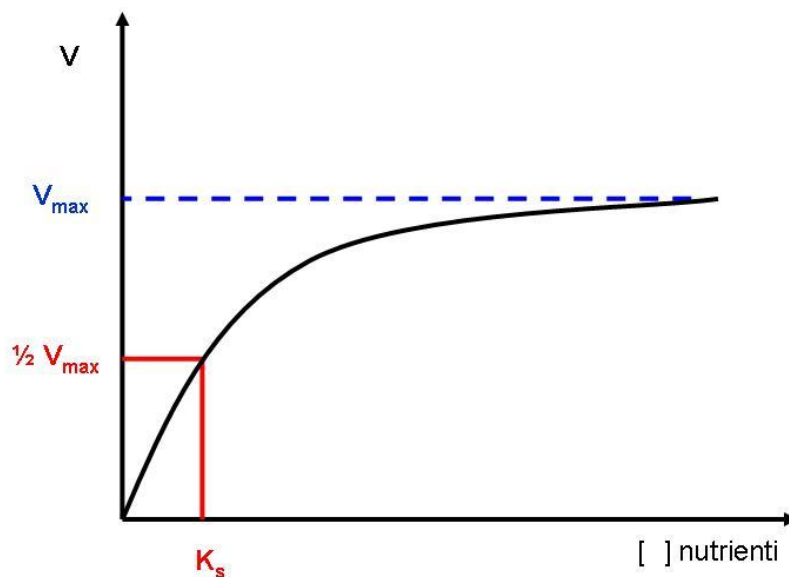


Figura 1.4 Cinetica dell'*uptake* di nutrienti. La velocità di uptake dei nutrienti V è messa in relazione con la concentrazione di nutrienti [S].

Dopo l'esaurimento di uno dei nutrienti nel mezzo di coltura nutraceutico, la crescita algale continuerà grazie all'apporto delle riserve intracellulari ma tenderà progressivamente a declinare man mano che la concentrazione intracellulare tenderà a ridursi. L'*uptake* di nutrienti può essere osservato durante la crescita del fitoplancton come diminuzione nel mezzo di coltura. I parametri fondamentali per descrivere le caratteristiche del trasporto dei nutrienti (V_{max} e K_s) si ottengono

mettendo in relazione la velocità di *uptake* con la concentrazione di substrato secondo l'equazione di Michaelis-Menten:

$$V = V_{\max} \left(\frac{[S]}{K_s + [S]} \right)$$

La velocità di *uptake* dei nutrienti nelle diverse specie è influenzato dalla dimensione delle cellule, da eventuali fenomeni di tossicità in presenza di alte concentrazioni di nutrienti, da fattori genetici e dallo stato nutrizionale in quanto la cellula può prelevare più nutrienti di quelli di cui ha bisogno per accumularli come riserva o, in alternativa, le cellule prelevano meno nutrienti poiché esiste una limitazione dovuta alla presenza di riserve interne.

1.4.3 Temperatura

Grazie ai suoi molteplici effetti, si può affermare che la temperatura rappresenta il fattore più importante nel determinare la distribuzione degli organismi viventi sulla superficie terrestre e negli ambienti acquatici (Davison, 1991). Da un punto di vista ecologico essa rappresenta uno dei principali fattori climatici che esercita un'azione incisiva sulle caratteristiche degli ecosistemi e condiziona sensibilmente l'attività metabolica e lo sviluppo degli organismi viventi. L'influenza della temperatura sui fenomeni vitali è dovuta in primo luogo ai suoi effetti sulle proprietà chimico-fisiche dell'acqua, che è il principale componente dei sistemi biologici. Al di sotto di 0°C, la cristallizzazione dell'acqua in ghiaccio comporta un aumento di volume che determina la rottura delle membrane biologiche e quindi la morte cellulare. L'effetto della temperatura sulla cinetica delle reazioni biochimiche è uno dei fattori ambientali più importanti che influenzano la composizione biochimica delle alghe. È stato dimostrato che alte temperature possono indurre la formazione di radicali attivi dell'ossigeno nelle cellule algali causando uno stress ossidativo che induce la produzione di carotenoidi (Tjahjono *et al.*, 1994; Liu e Lee, 2000). Inoltre la temperatura può determinare variazioni biochimiche, ad esempio, la diminuzione della temperatura porta ad un aumento degli acidi grassi insaturi nelle membrane lipidiche tilacoidali al fine di proteggere e mantenere efficienti le funzioni

dell'apparato fotosintetico (Nishida e Murata, 1996). È stato dimostrato in molte alghe che l'aumento della temperatura porta ad un aumento degli acidi grassi saturi mentre con temperature più basse aumentano gli acidi grassi insaturi (Renaud *et al.*, 2002). La temperatura influenza la cinetica delle reazioni chimiche, poiché ad ogni incremento di 10°C di temperatura si ha un aumento di circa il doppio della velocità di reazione (fattore Q_{10}). Per la coltivazione delle biomasse algali questo comporta approssimativamente il doppio dell'*uptake* di nutrienti per ogni aumento di 10°C nel sistema. Il metabolismo cellulare e la crescita algale, dipendono strettamente dall'intensità luminosa e dalla temperatura. Inoltre, l'intensità di luce, necessaria a saturare la fotosintesi, cresce all'aumentare della temperatura. Tutte le specie algali sono caratterizzate da un optimum di temperatura che garantisce la massima attività fotosintetica; esiste però, una temperatura minima, che permette ancora di svolgere la fotosintesi. I valori di soglia più bassi sono stati riscontrati tra le diatomee, mentre i cianobatteri preferiscono chiaramente temperature più elevate.

1.4.4 Luce e fotosintesi

La luce è sicuramente il parametro più importante per la crescita algale più nello specifico questa è influenzata dalla quantità e qualità della luce incidente e dalla densità cellulare delle colture (Richmond *et al.*, 2000; Jeon *et al.*, 2005).

La fotosintesi è un processo fisiologico tramite il quale le microalghe, utilizzando la luce come fonte di energia, sintetizzano molecole complesse come i carboidrati a partire da molecole semplici quali anidride carbonica, acqua e sali minerali. Si tratta cioè di un processo fotochimico, ovvero un cambiamento chimico derivato dall'assorbimento di radiazione luminosa da parte di molecole biologiche.



Evidenze chimiche e numerosi ritrovamenti fossili indicano che tale processo si affermò sulla Terra circa 3,5 miliardi di anni fa ad opera di batteri autotrofi, che operavano una fotosintesi di tipo anossigenico. La comparsa della fotosintesi ossigenica, con la conseguente immissione di ossigeno nell'atmosfera, si ebbe

quando i cianobatteri acquisirono la capacità di utilizzare l'acqua come donatore di elettroni. Un successivo evento di endosimbiosi tra un procariote fotosintetico ossigenico (cianobatterio) e una cellula eucariote ancestrale eterotrofa, ha dato origine ai cloroplasti che sono la sede del processo fotosintetico (Richmond, 2004; Cavalier-Smith, 2002). Da un punto di vista strutturale, i cloroplasti sono organelli delimitati da una doppia membrana, che racchiude un ambiente interno, lo stroma, nel quale si trova un sistema di membrane ben organizzato detto sistema tilacoidale (Pupillo *et al.*, 2003). Nei tilacoidi sono inseriti i complessi funzionali in grado di condurre il trasporto di elettroni dall'acqua al NADP^+ nella fase luminosa della fotosintesi, ossia: il fotosistema II (PSII), il complesso dei citocromi b6/f (cit b6/f) e il fotosistema I (PSI). E' anche presente il complesso ATP-sintasi che opera nella sintesi di ATP. La fotosintesi avviene per tappe riunibili in due fasi: la fase luminosa e la fase di fissazione del carbonio o fase oscura. Nella fase luminosa l'energia solare arriva a livello dell'apparato fotosintetico nelle membrane tilacoidali ed è convertita in energia chimica fornendo NADPH_2 e ATP. Nella fase oscura, che avviene nello stroma, NADPH_2 e ATP sono utilizzate nelle riduzioni biochimiche dell'anidride carbonica per formare carboidrati come prodotto finale. L'energia luminosa assorbita dalle molecole di clorofilla può andare incontro a 3 diversi destini: può essere usata nella fotosintesi (reazioni fotochimiche), dissipata come calore o riemessa sotto forma di fluorescenza (Figura 1.5).

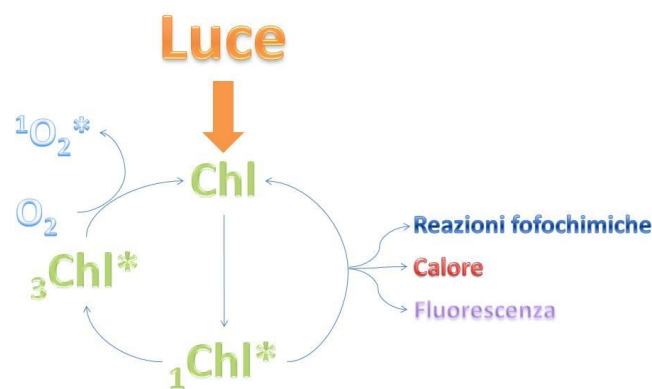


Figura 1.5 Destino della luce solare assorbita dalla molecola di clorofilla.

Questi tre processi sono in competizione tra loro, così che qualsiasi aumento dell'efficienza di uno di essi causerà una diminuzione degli altri due. Di conseguenza, misurare la resa della fluorescenza della clorofilla fornisce informazioni sulle variazioni dell'efficienza delle reazioni fotochimiche e della dissipazione come calore, questo nonostante la quantità totale di fluorescenza della clorofilla sia molto piccola (solo 1 o il 2% della luce totale assorbita).

La radiazione luminosa attiva nei processi fotosintetici, occupa la porzione dello spettro compresa tra 400 nm e 700 nm e rappresenta circa il 45% di quello totale (Gao *et al.*, 2007). Per essere utilizzata la luce deve essere in qualche modo catturata e, tra i vari pigmenti responsabili dell'assorbimento luminoso, troviamo le diverse clorofille e i carotenoidi. Il principale fotorecettore responsabile dell'assorbimento della radiazione luminosa, nelle alghe è la clorofilla a, ma anche clorofilla b o la clorofilla c e i carotenoidi svolgono un ruolo di primaria importanza (Hosikian *et al.*, 2010). Le clorofille assorbono la luce visibile nella fascia del rosso (tra 550 e 700 nm) e del blu (sotto i 480 nm) ed emettono fluorescenza nel rosso a lunghezze d'onda poco superiori a quelle di assorbimento.

La molecola di clorofilla a (chl a) è costituita da una testa ad anello porfirinico e da una coda idrofoba fitilica. L'anello porfirinico, che consiste in un poliene ciclico, è composto da quattro anelli pirrolici ed un quinto anello non pirrolico (ciclopentanone); al centro dell'anello porfirinico è collocato un atomo di magnesio (Mg^{2+}) legato ai quattro atomi di azoto dei pirroli, rivolti verso l'interno della molecola. La coda fitilica è una lunga catena idrocarburica legata all'anello IV della testa porfirinica. L'idrofobicità di questa porzione della molecola è fondamentale per garantire il legame con le regioni lipidiche delle proteine-leganti la clorofilla e con le membrane tilacoidali dei cloroplasti. Esistono diversi tipi di clorofille: la clorofilla a si ritrova in tutti gli organismi fotosintetici eucarioti e nei cianobatteri, mentre gli altri batteri fotosintetici contengono le batterioclorofille. La clorofilla b (chl b) è presente nelle Chlorophyceae ed Euglenophyceae, mentre nelle altre alghe è sostituita dalla clorofilla c. La differenza sostanziale tra queste molecole risiede nei sostituenti delle catene laterali legate all'anello porfirinico; quindi, ciò che distingue la clorofilla b dalla a è che la prima presenta un gruppo aldeidico (-CHO), mentre la seconda un gruppo metilico (-CH₃). Proprio a causa delle differenze nella loro struttura clorofilla a e clorofilla b differiscono, anche se leggermente, nei

relativi picchi di assorbimento; l'attività massima della clorofilla b si manifesta intorno ai 460 nm, dove la clorofilla a assorbe meno, d'altra parte il picco di assorbimento della clorofilla a intorno a 680 nm è maggiore rispetto a quello della clorofilla b. Questa caratteristica di sovrapposizione degli spettri è fondamentale dal momento che risulta un'integrazione dell'attività di assorbimento della luce da parte dei diversi fotorecettori. In particolare la clorofilla b svolge, assieme ai carotenoidi, il ruolo di pigmento accessorio. I pigmenti accessori "catturano" quelle lunghezze d'onda che la clorofilla a assorbe meno e convogliano l'energia verso una particolare forma di quest'ultima, attiva nel processo fotochimico.

1.4.4.1 Fluorescenza della clorofilla, *quenching* fotochimico e non fotochimico.

L'analisi della fluorescenza emessa dall'apparato fotosintetico è misurata tramite fluorimetro ad ampiezza di impulsi modulata rappresenta attualmente una metodologia molto efficace negli studi ecofisiologici delle microalghe, poiché permette di ottenere una grande quantità di dati in tempi contenuti e senza essere invasiva (Maxwell, 2000). In particolare, la fluorescenza può fornire dettagli sulla capacità di un'alga di tollerare stress ambientali e sulla presenza di danni all'apparato fotosintetico, infine, permette di capire qual è l'irradianza ottimale per la crescita di una specifica alga.

A temperatura ambiente, quasi la totalità della fluorescenza ha origine dal fotosistema II (Baker e Webber, 1987); la fluorescenza può essere misurata esponendo l'alga ad una luce di una lunghezza d'onda definita e misurando la quantità di luce riemessa a lunghezze d'onda maggiori. Ciò significa che tutte le analisi devono includere una forma di normalizzazione e una grande varietà di differenti parametri di fluorescenza devono essere calcolati. Le variazioni di fluorescenza della clorofilla sono state osservate per la prima volta nei primi anni 60 da Kautsky quando scoprì che, in seguito al trasferimento di materiale fotosintetico da buio alla luce, avveniva un aumento della resa di fluorescenza della clorofilla in un periodo di circa 1 secondo. Questo aumento è stato successivamente spiegato come una conseguenza della riduzione degli accettori di elettroni nella catena di reazioni fotosintetiche, a valle del PSII, probabilmente a livello del plastochinone

Q_A . Una volta che il PSII assorbe la luce ed il Q_A ha accettato un elettrone, esso non è più in grado di accettarne un altro fino a quando non lo ha trasferito nel successivo trasportatore di elettroni (Q_B). Durante questo periodo, il centro di reazione è definito chiuso. La presenza di una parte di centri di reazioni nello stato chiuso causa la riduzione totale dell'efficienza delle reazioni fotochimiche e quindi l'aumento della fluorescenza. Quando l'alga è trasferita dal buio alla luce, i centri di reazione del PSII si chiudono progressivamente, questo causa l'aumento della fluorescenza della clorofilla. In seguito a questo evento, comunque, il livello di fluorescenza comincia solitamente a diminuire nuovamente, in un tempo di pochi minuti. Questo fenomeno, chiamato estinzione della fluorescenza (*fluorescence quenching*) si può spiegare in due modi. Innanzitutto avviene un aumento del tasso a cui gli elettroni sono trasportati fuori dal PSII; questo è dovuto principalmente all'attivazione indotta degli enzimi coinvolti nel metabolismo del carbonio. Questa estinzione è chiamata estinzione fotochimica (*photochemical quenching*, qP). Allo stesso tempo, avviene un aumento dell'efficienza con cui l'energia viene convertita in calore; quest'ultimo processo è definito estinzione non fotochimica (Roháček, 2002). Lo studio della fluorescenza consente di seguire i processi fotochimici nei centri di reazione. I centri che si trovano nello stato aperto sono fotosinteticamente attivi, mentre quelli chiusi sono fotosinteticamente inattivi. Al fine di avere dati affidabili sull'efficienza fotosintetica è necessario essere in grado di distinguere i contributi dell'estinzione fotochimica e non fotochimica. L'approccio più usato è quello di spegnere uno dei due processi, in particolar modo la fotosintesi, cosicché si possa stimare la fluorescenza in presenza solo dell'altro. *In vitro*, questo può essere ottenuto utilizzando la tecnica del raddoppiamento della luce, che permette l'annullamento dell'estinzione fotochimica (Quick e Horton, 1984). Con questo approccio, l'alga viene sottoposta a un flash di luce di breve durata e di alta intensità, il cui effetto è quello di chiudere temporaneamente tutti i centri di reazione del PSII. Il flash saturante è talmente breve da non influire significativamente sulla fotosintesi. Durante il flash, la fluorescenza raggiunge un valore equivalente a quello che potrebbe essere ottenuto in assenza di estinzione fotochimica, la fluorescenza massima (F_m). Il confronto di questo valore con lo stato costante della fluorescenza alla luce (F_T) e al valore di fluorescenza in assenza di luce attinica (F_o) fornisce informazioni sull'efficienza dell'estinzione fotochimica e sull'efficienza

del PSII. Così come avviene per le reazioni fotochimiche, l'efficienza di dissipazione del calore (estinzione non fotochimica) può variare a seconda di vari fattori interni ed esterni, che si riflettono come variazioni di F_m . Al contrario delle reazioni fotochimiche, non è possibile inibire totalmente la dissipazione del calore e quindi non è possibile misurare la fluorescenza della clorofilla in assenza di estinzione non fotosintetica.

1.4.4.2 Relazione tra assorbimento della luce e fotosintesi netta

La quantità di luce assorbita e la fotosintesi sono correlate tramite un parametro chiamato rendimento quantico della fotosintesi, che indica il rapporto tra moli di CO_2 fissate per moli di fotoni assorbiti (PAR) dalla reazione fotochimica. La resa quantica della fotosintesi può essere misurata valutando la velocità di fotosintesi di una coltura algale sottoposta ad intensità luminose crescenti (curve P/E o *light curve*); queste curve rappresentano uno strumento molto valido per la valutazione di parametri fotosintetici utili per lo studio della fisiologia di una determinata alga (Figura 1.6). Ad un certo livello di intensità luminosa bassa la velocità di fotosintesi netta è appena sufficiente per bilanciare la velocità di respirazione, questo è chiamato punto di compensazione in cui la fotosintesi netta è uguale a zero. Il tasso di respirazione corrisponde in genere al 5-10% del tasso di fotosintesi equivalente alla luce di saturazione (Figueroa, 2003). A qualsiasi livello superiore di luce l'alga avrà un guadagno netto di fotosintesi rispetto alle perdite dovute alla respirazione. Si distingue una fase lineare in cui l'aumento di luce porta ad un aumento corrispondente di fotosintesi e la pendenza di questa retta, o parametro α ha come dimensioni:

moli di O_2 prodotto/quanta di luce incidente /unità di superficie

oppure:

moli di O_2 prodotto/unità di clif/ quanta di luce incidente/unità di superficie.

Man mano che la luce aumenta, l'efficienza di utilizzo della luce cala e i successivi incrementi di luce causeranno piccoli aumenti o nessun aumento di fotosintesi fino a raggiungere un plateau. La velocità di fotosintesi massima è definita dal parametro P_{max} che ha come dimensioni:

O₂ prodotto/unità di clf/unità di tempo

In questa situazione la velocità di assorbimento dei fotoni supera la velocità di trasporto degli elettroni dall'acqua alla CO₂.

L'intercetta tra la pendenza α e P_{max} fornisce il parametro E_k che rappresenta il livello di irradianza a cui la fotosintesi si satura e quindi il livello ottimale per una determinata specie algale in quelle condizioni fisiologiche.

E_k può essere definito come:

$$E_k = P_{max} / \alpha$$

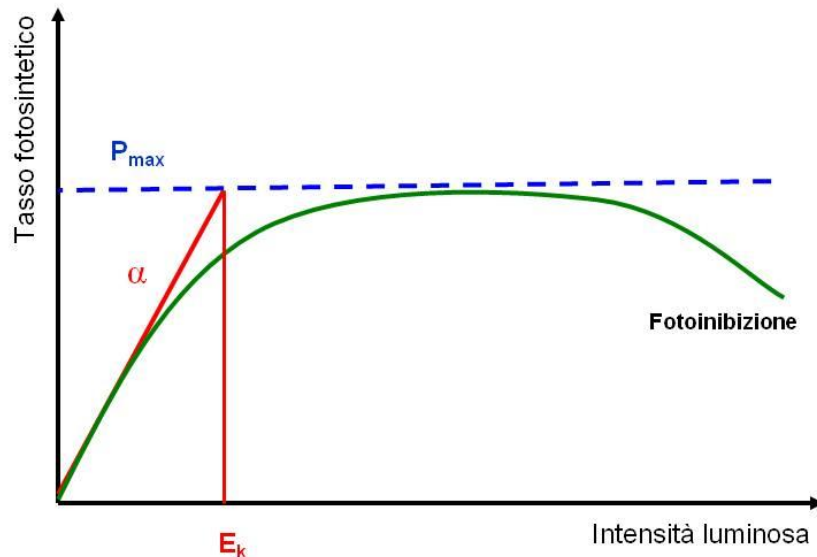


Figura 1.6 Grafico di una curva P/E standard in cui si mette in relazione il tasso fotosintetico P con l'intensità luminosa E.

La bassa resa quantica in condizioni di luce in eccesso avviene perché il tasso di assorbimento dei fotoni da parte della clorofilla supera il tasso di consumo di ATP e di NADPH da parte del ciclo di Calvin Benson e questo può provocare dei seri danni ai fotosistemi. Fotoinibizione e fotoossidazione possono allora avvenire quando le alghe ombreggiate sono improvvisamente esposte a luce intensa. Per questo motivo, le microalghe hanno sviluppato una varietà di meccanismi per minimizzare i danni causati dall'assorbimento della luce in eccesso per mezzo di: 1)

Processi fotoprotettivi fotochimici che dissipano l'energia in eccesso utilizzandola nei processi fotosintetici (estinzione fotochimica, qP); 2) Processi fotoprotettivi non fotochimici che dissipano l'energia in eccesso mediante il ciclo delle xantofille (una classe di carotenoidi che assorbono l'energia dallo stato eccitato della clorofilla e lo dissipano come calore) .

1.4.4.3 Fotoacclimatazione

Nell' ambiente naturale, gli organismi fotosintetici possono essere soggetti a frequenti cambiamenti di irradianza e per questo le microalghe hanno sviluppato diversi meccanismi di acclimatazione alla luce. E' stato dimostrato che durante i processi di acclimatazione i livelli di Rubisco sembrano essere costanti (Sukenik *et al.*, 1987) e che il controllo avviene a livello del PSII. La regolazione di quest' ultimo può avvenire tramite la modulazione della capacità di utilizzo della luce o modificando il numero di centri di reazione a livello del PSII. Colture con densità cellulare elevata richiedono un'intensità luminosa maggiore per ottenere il massimo dell'attività fotosintetica che, in ogni caso, risulta inferiore a quella che può essere raggiunta in una coltura con bassa densità cellulare, in quanto la luce è attenuata dall'elevata concentrazione dei microorganismi che si schermano fra di loro (Jeon *et al.*, 2005). Le colture con un'alta densità cellulare che comporta ombreggiamento, quindi, possono essere inibite nella crescita (Richmond e Ning, 1999); le alghe, tuttavia, si possono fotoacclimatare sia agli alti livelli di intensità luminosa (HL, High light), che a quelli più bassi (LL, Low Light). Le microalghe che si acclimatano ad alte intensità di luce (Grobbelaar *et al.*, 2003) tipicamente hanno:

- un alto tasso fotosintetico
- un basso contenuto di clorofilla per unità di biomassa
- alti livelli di pigmenti accessori come i carotenoidi
- bassa efficienza fotosintetica

D'altra parte, le microalghe che si acclimatano a basse intensità luminose (Grobbelaar *et al.*, 2003) hanno:

- basso tasso fotosintetico
- alto contenuto di clorofilla per unità di biomassa

- bassi livelli di pigmenti ausiliari come i carotenoidi
- alta efficienza fotosintetica

1.4.5 Rapporti con altri livelli trofici

La composizione delle specie e la biomassa totale della comunità microalgale in sistemi all'aperto sono determinate da fattori abiotici ma anche dalle relazioni che si vengono a formare con gli altri organismi appartenenti ad altri livelli trofici. L'effetto del *grazing* da parte dello zooplancton è un fattore importante da considerare nelle relazioni trofiche, in molti sistemi acquatici infatti è il fattore prevalente di mortalità algale. Diversi tipi di organismi zooplanctonici si nutrono di alghe dai protisti microscopici, come flagellati, amebe e ciliati, a rotiferi e a crostacei, come copepodi e cladoceri. Lo zooplancton quindi può influire negativamente sullo sviluppo algale attraverso la predazione, di cui risentono maggiormente le alghe di minori dimensioni, che di solito sono quelle con i più alti tassi di crescita e di assimilazione dei nutrienti. Inoltre esiste una relazione tra la dimensione dello zooplancton e il tasso di *grazing* (Hélène, 1998), da questo è deducibile una differente pressione predatoria a seconda del tipo di zooplancton presente nel sistema acquatico. È quindi probabile che gli effetti contrastanti dello zooplancton agiscano in modo da avvantaggiare certe specie algali e svantaggiarne altre. Accanto al controllo *top-down* esercitato dallo zooplancton sulle alghe, esiste anche un'efficiente azione di controllo *bottom-up*, esercitata dai batteri, i quali possono entrare in competizione con le alghe per i nutrienti. Il rapporto tra alghe e batteri è peraltro molto complesso. In varie occasioni si osserva una sorta di mutualismo tra i due gruppi di organismi: i batteri mineralizzano il fosforo per le alghe e queste producono carbonio per la crescita batterica. Lo spostamento da una situazione di competizione ad una di mutualismo sembra essere legato alle disponibilità di carbonio e di fosforo. Quando il rapporto C:P è molto elevato la crescita batterica è limitata dal fosforo e si instaura la competizione con le alghe per questo elemento. Se invece questo rapporto è più basso, al punto che sia C che P divengono fattori limitanti per la crescita batterica, la competizione si riduce (l'assimilazione di fosforo da parte dei batteri richiede carbonio come fonte

energetica) e si tende verso una forma di cooperazione. Poiché il rapporto C:P è spesso condizionato dallo stato trofico, è evidente come quest'ultimo influenzi anche la natura del rapporto tra alghe e batteri. In ambienti oligotrofi la disponibilità di fosforo può essere un fattore limitante per entrambi: questa situazione innesca di solito fenomeni di competizione che vedono prevalere i batteri. In ambienti eutrofici, invece, il rapporto C:P si abbassa, riducendo il vantaggio dei batteri, che diventano dipendenti dalle alghe per il rifornimento di carbonio: la competizione lascia così il posto al mutualismo.

Scopo della tesi

La depurazione è un processo finalizzato a ridurre in modo significativo le sostanze inquinanti presenti nelle acque reflue prima del loro rilascio in ambiente. Gli impianti di depurazione tradizionali, sfruttano i processi biochimici attuati in natura dai batteri decompositori, concentrando il refluo in appositi spazi ed adottando opportuni accorgimenti per aumentarne la velocità di reazione. L'uso delle alghe in impianti di depurazione di acque reflue prende il nome di ficorimedio e potrebbe rappresentare un'alternativa o una integrazione alla depurazione tradizionale dei reflui per il fatto che le alghe operano la rimozione di nutrienti e metalli pesanti dalle acque e al tempo stesso possono fornire biomassa utilizzabile come nuova fonte di energia.

L'obiettivo della ricerca riportata in questa tesi è stato di porre l'attenzione ad alcuni aspetti del recupero e trattamento biologico dei reflui provenienti da scarichi civili o industriali attraverso l'uso delle microalghe. In particolare è stata studiata la microalga *Scenedesmus* sp., prelevata in un bacino artificiale di acqua dolce nella provincia di Forlì-Cesena, in vista di una sua possibile coltivazione in vasche all'aperto; tali vasche, in costruzione al momento dello svolgimento di questa tesi, sono finalizzate alla depurazione dei reflui e al tempo stesso alla produzione di biomassa per un'eventuale applicazione nella produzione di oli o nella combustione/digestione per la produzione di energia. Per raggiungere questi obiettivi in un sistema aperto l'organismo prescelto deve, non solo raggiungere valori di produttività elevati, ma deve anche essere maggiormente competitivo rispetto ad altre alghe ed essere poco sensibile alla pressione dei *grazers* e dei patogeni.

Esperimenti svolti in precedenza con *Scenedesmus* sp. avevano dimostrato un'elevata capacità depurativa su due tipi di substrati di origine civile, l'effluente primario e il secondario di un depuratore cittadino di HERA. L'alga aveva mostrato maggiore crescita nell'effluente primario con rimozione di tutti i nutrienti nei primi 3 giorni. Inoltre era stata valutata la resistenza dell'alga ad elevate concentrazioni di

ammonio, una sostanza che può essere presente nei reflui urbani in quantità variabili e tali da poter causare un effetto tossico sulla crescita delle alghe.

Nel presente studio ci si è rivolti ad altri aspetti riguardanti la crescita di questa microalga in acque reflue, tramite esperimenti eseguiti in laboratorio con piccoli volumi. Il primo esperimento è stato realizzato in modo tale da simulare un sistema continuo di crescita di *Scenedesmus* sp. andando a ricreare le stesse condizioni di un sistema all'aperto come negli *open ponds*, in particolare prelevando periodicamente una parte di biomassa e sostituendola con terreno nuovo. Sono state applicate tre diverse condizioni per analizzare quale metodo permetteva di ottenere maggiori quantità di biomassa e per valutare come questa si diversifica nel tempo nella sua componente biochimica, tramite l'analisi di polisaccaridi e proteine; inoltre si è valutata anche la componente fisiologica, attraverso la misura dell'efficienza fotosintetica. L'efficacia di queste condizioni nel processo di fitodepurazione è stata invece oggetto di studio di una tesi parallela.

Nel successivo esperimento è stata utilizzata una popolazione algale naturale, proveniente dalla vasca di sedimentazione terziaria del depuratore di Ravenna, e fatta crescere nell'effluente primario. L'esperimento era volto a comprendere i processi di successione delle microalghe in un sistema aperto, attraverso uno studio della composizione delle specie nel tempo, e a confrontare la crescita e l'efficienza di fitodepurazione della popolazione mista con quelle di *Scenedesmus* sp.

Materiali e metodi

3.1 Piano sperimentale

Sono stati effettuati due tipi di esperimenti:

1) Il primo esperimento è stato eseguito con la modalità delle colture semicontinue. Colture di *Scenedesmus* sp. sono state allestite nell'acqua prelevata dall'effluente primario del depuratore HERA di Cesena applicando tempi di residenza idraulica di 1.5, 3 e 5 giorni ed effettuando ogni condizione in replica. Si sono allestite perciò sei colture in bottiglie ognuna delle quali con 70 ml della coltura di *Scenedesmus* sp. e 980 ml di acqua dell'effluente primario in maniera tale da ottenere un volume finale di 1050 ml per ciascuna bottiglia con una concentrazione dell'alga di 0,1 g/L (Figura 3.1). Le bottiglie sono state riposte per tutta la durata dello studio in una camera ad una temperatura di 24°-26° con all'interno lampade fluorescenti con intensità luminosa di $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio, inoltre le colture sono state areate con una miscela di aria e CO_2 92/2 v/v. Le colture sono state seguite per 15 giorni fino alla fine della fase esponenziale, valutando la crescita con misure di torbidità effettuate ogni giorno, mentre a intervalli regolari sono stati effettuati i prelievi per le analisi di proteine, clorofilla, polisaccaridi e lipidi.



Figura 3.1 Allestimento colture in semicontinuo con tempi di residenza idraulica (HRT) di 1.5,3 e 5 giorni.

2) Il secondo esperimento si è basato su colture “batch”, l’inoculo è stato fatto con una popolazione mista prelevata dalla vasca di sedimentazione del depuratore di Ravenna (Figura 3.2). Le alghe vengono fatte crescere in un volume fisso di *medium*, nel nostro caso l’acqua dell’effluente primario, in tre repliche. Le bottiglie sono state riposte per tutta la durata dello studio in una camera ad una temperatura di 24°-26° con all’interno lampade fluorescenti con intensità luminosa di $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio, inoltre le colture sono state areate con una miscela di aria e CO_2 92/2 v/v.



Figura 3.2 Prelievo di una popolazione mista di microalghe dalla vasca di sedimentazione terziaria del depuratore di Ravenna.

3.2 Specie algali utilizzate

Il primo esperimento è stato effettuato con una monocultura di microalghe appartenenti al genere *Scenedesmus*. Queste alghe vivono in acqua dolce e sono interessanti perché altamente efficienti nel contesto della fitodepurazione. In particolare è stato utilizzato un ceppo isolato nel 2009 in un bacino artificiale di acqua dolce nella provincia di Forlì-Cesena (Samori). Quest’alga, appartenente alla classe delle *Chlorophyceae*, può presentarsi sia in forma unicellulare che coloniale,

formando filamenti, lamine o ammassi. Solitamente è strutturata in piccole colonie, che sono composte da 2 a 8 cellule, cementate tra loro da una sostanza gelatinosa. Agli estremi di questi piccoli raggruppamenti si trovano due coppie di spine che sono diritte o arcuate e molto resistenti; questa caratteristica è utilizzata dalle alghe per aumentare la galleggibilità, come deterrente per i *grazers* o per distanziarsi tra le altre alghe per aumentare la disponibilità di luce e nutrienti (Trainor ed Egan, 1988). Le cellule possono essere di forma ovoidale o rotonda, possono presentare una parete di rivestimento di cellulosa oppure possono essere sprovviste di tale rivestimento. *Scenedesmus* sp. (Figura 3.3) presenta alti contenuti di clorofille e pigmenti tra cui α - e β -caroteni oltre ad alcune xantofille. Nelle cellule questi composti sono concentrati in vescicole, come materiale di tipo oleoso. Quest'alga è stata scelta proprio per gli studi condotti in passato, in relazione alle sue grandi capacità di assorbire nutrienti dalle acque. Questo fattore l'ha spesso indicata come alga potenzialmente interessante per i processi di fito-depurazione, così come quelli di bonifica, e per quelli legati all'abbattimento naturale dei nutrienti nei siti di depurazione dei reflui (Mulbry, 2009).

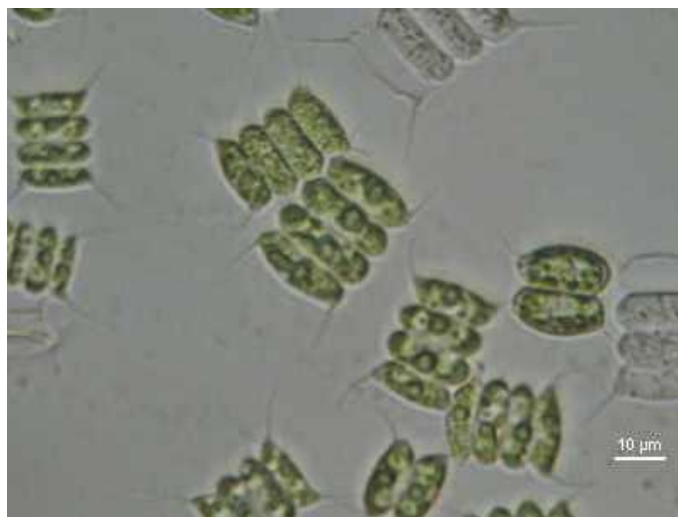


Figura 3.3 Immagine al microscopio ottico della microalga *Scenedesmus* sp.

Nel secondo esperimento una popolazione di microalghe è stata prelevata dalla vasca di sedimentazione del depuratore di Ravenna e utilizzata come inoculo nell'acqua del primario (Figura 3.4), la popolazione mista osservata al microscopio ha rivelato la presenza di un gran numero di specie suddivise in diverse categorie

tassonomiche: cloroficee, cianobatteri, diatomee, crisoficee, criptoficee, dinoficee ed euglenoficee (Jhon, 2002).



Figura 3.4 Immagine al microscopio ottico con un ingrandimento 32X della popolazione di microalghe e cianobatteri.

Le **Chlorophyceae** o alghe verdi (divisione: Chlorophyta) sono organismi presenti sia nelle acque dolci che nel mare; presentano caratteristiche morfologiche e fisiologiche molto evolute (simili alle piante superiori, es. la presenza di chl *a* e *b*). Alcuni caratteri che le differenziano dagli altri gruppi di alghe sono la presenza di cellule flagellate con flagelli simili in struttura ma che potrebbero differire in lunghezza, abitualmente sono due per cellula, ma possono anche essere 4 o più. Il cloroplasto è verde poiché le clorofille non sono mascherate dai pigmenti accessori. Le Chlorophyta sono distribuite sia in ambienti acquatici (dolci e salati) che in ambienti terrestri umidi, come sui tronchi degli alberi, sulle foglie delle piante, in simbiosi con funghi, epizoiche su alcuni animali, su rocce. Queste alghe, inoltre, si ritrovano anche nell'ambiente subaereo sotto forma di spore durature e in ambienti estremi come ghiacciai. Appartengono a questa classe le microalghe del genere *Scenedesmus*, utilizzate nel primo esperimento.

I **cianobatteri** (o alghe azzurre) classificati con le alghe nella divisione Cyanophyta, sono in realtà dei batteri con la struttura cellulare tipicamente di procarioti (Wetzel,

1983); si distinguono dai batteri per la presenza di clorofilla *a* il pigmento fotosintetico comune dei cloroplasti delle alghe eucariote, delle piante superiori e di struttura differente dalla batterioclorofilla. Morfologicamente si presentano in forma unicellulare, filamentosa o coloniale, racchiusi per la maggior parte, in una guaina mucillaginosa. Importante è la presenza di alcune cellule particolari, le eterocisti, presenti in molti cianobatteri filamentosi (*Nostoc*, *Anabaena*, ecc.), che consentono la fissazione dell'azoto molecolare.

Le **diatomee** sono uno dei più importanti gruppi di alghe in quanto presenti in tutti gli ambienti; vengono classificate all'interno della divisione Heterokontophyta come **Bacillariophyceae**. La loro caratteristica più importante è la presenza di una parete cellulare silicea che prende il nome di frustulo. Ogni frustulo è costituito da due parti, l'epiteca più grande e l'ipoteca, inferiore e inserita nell'epiteca. Tipicamente le diatomee presentano due morfologie ben distinte: le centriche, sono forme a simmetria raggiata (*Cyclotella*, *Stephanodiscus*, *Coscinodiscus*, ecc.) mentre le pennate sono forme a simmetria bilaterale (*Asterionella*, *Fragilaria*, *Navicula*, ecc.). È ben noto che molte specie sono mobili. Il movimento è il risultato di una secrezione rigorosamente controllata da svariati stimoli chimici, meccanici e fisici. Ciò viene garantito da un organo nastriforme, costituito da fibrille, in grado di contrarsi e di indurre una secrezione collosa che scorre lungo il rafe, una stretta fessura che corre lungo l'asse longitudinale della valva e che si approfondisce fino ad arrivare a contatto con il citoplasma. I pigmenti fotosintetici sono clorofilla *a*, *c1*, *c2* ed il principale carotenoide è la fucoxantina che conferisce alle cellule il loro caratteristico colore giallo-marrone dorato.

Le **Chrysophyceae** fanno parte anch'esse della divisione Heterokontophyta; sono tipiche di ambienti d'acqua dolce, prevalentemente poveri di calcio. La maggior parte di queste alghe sono unicellulari, poche sono coloniali, rare sono le filamentose. Caratteristica è la presenza di due flagelli; in alcuni generi (*Ochromonas*, *Dinobryon*, *Uroglena*, ecc.) i due flagelli sono inseriti nella cellula perpendicolarmente uno rispetto all'altro, al contrario in altri generi (*Synura*, *Mallomonas*, ecc.) i flagelli sono inseriti nella cellula parallelamente. Molte specie sono prive di una vera parete cellulare, però spesso sono provviste di uno strato di scaglie, la lorica, in cui alla cellulosa si accompagna una parte notevole di calcare, silice od ossidi di ferro. I pigmenti fotosintetici principali sono clorofilla *a*, *c1*, *c2* la

comparsa di pirenoidi inoltre è molto comune. I prodotti di riserva sono crisolaminarina, leucosina e grassi che vengono accumulati all'interno di grosse vescicole nella parte posteriore della cellula.

La classe **Cryptophyceae** è l'unica appartenente alla divisione Cryptophyta. Le microalghe che ne fanno parte possiedono due flagelli che sono approssimativamente della stessa lunghezza della cellula; la porzione esterna della cellula o periplasto è composta da una membrana plasmatica e da una serie di placche poste direttamente sotto la membrana stessa. Il numero e la forma di queste placche sono importanti caratteri tassonomici. Le Cryptophyceae contengono uno o due plastidi di grandi dimensioni che racchiudono uno stigma con granuli lipidici, una coppia di tilacoidi, la clorofilla *a*, *c2* e le ficobiliproteine. Nella porzione anteriore dell'organismo è collocata una grande struttura vescicolare (Corpi de Maupas) che funziona probabilmente da deposito di materiali di scorta.

Le **Dinophyceae** (divisione: Dinophyta) sono importanti costituenti del plancton sia marino che d'acqua dolce. Sono costituite da un epicono e da un ipocono divisi da una cintura o cingolo; nelle forme tectate sia l'epicono che l'ipocono sono normalmente divisi in un numero di teche, contenenti piastre di cellulosa, diverse per ogni genere. Presentano un solco longitudinale perpendicolare alla cintura; i flagelli, longitudinali e trasversali, fuoriescono tra le teche nell'area dove la cintura e il solco si incontrano ed emergono uno al di fuori della cellula e l'altro rimane attaccato alla cintura (Lee, 1999). I pigmenti fotosintetici principali sono la clorofilla *a*, *c2*. Il prodotto di assimilazione è l'amido ed in alcuni casi è costituito da oli insaturi, che vengono immagazzinati nel citoplasma.

Le **Euglenophyceae** (divisione: Euglenophyta) sono alghe flagellate che sono presenti nella maggior parte dei piccoli habitat d'acqua dolce inquinati, è più raro invece trovare euglenoficee planctoniche in laghi oligotrofi (Round, 1981). Le cellule euglenoidi hanno due corpi basali e uno o due flagelli emergenti. La struttura dei flagelli è molto simile a quelle delle dinoficee. Il cloroplasto contiene principalmente clorofilla *a* e *b*. Nella parte anteriore della cellula è presente un vacuolo contrattile ed uno stigma ripieno di goccioline lipidiche e di α - e β -carotene, xantofille.

3.3 Terreno di coltura

E' stato utilizzato come terreno di coltura l'effluente primario in entrata al depuratore; in particolare, è stato effettuato il campionamento di 60 L di acqua dal sedimentatore primario dell'impianto di depurazione di Cesena, quindi l'acqua è stata filtrata con un filtro a maglia di 200 μm per eliminare la biomassa in eccesso e congelata in bottiglie con un volume di 2,4 L per abbassare la carica batterica; al momento dell'utilizzo l'acqua viene scongelata a temperatura ambiente. È stato utilizzato lo stesso terreno di coltura in entrambi gli esperimenti.

3.4 Colture *batch* e in semicontinuo

Le colture vengono avviate inoculando piccole quantità di microalghe in bottiglie da 1L contenenti il terreno di coltura. Nelle colture *batch* si segue l'andamento della crescita dell'alga dal giorno dell'inoculo fino al momento in cui, esaurendo i nutrienti disponibili, le cellule non si duplicheranno più (Figura 3.5). In genere è possibile delineare diverse fasi di accrescimento:

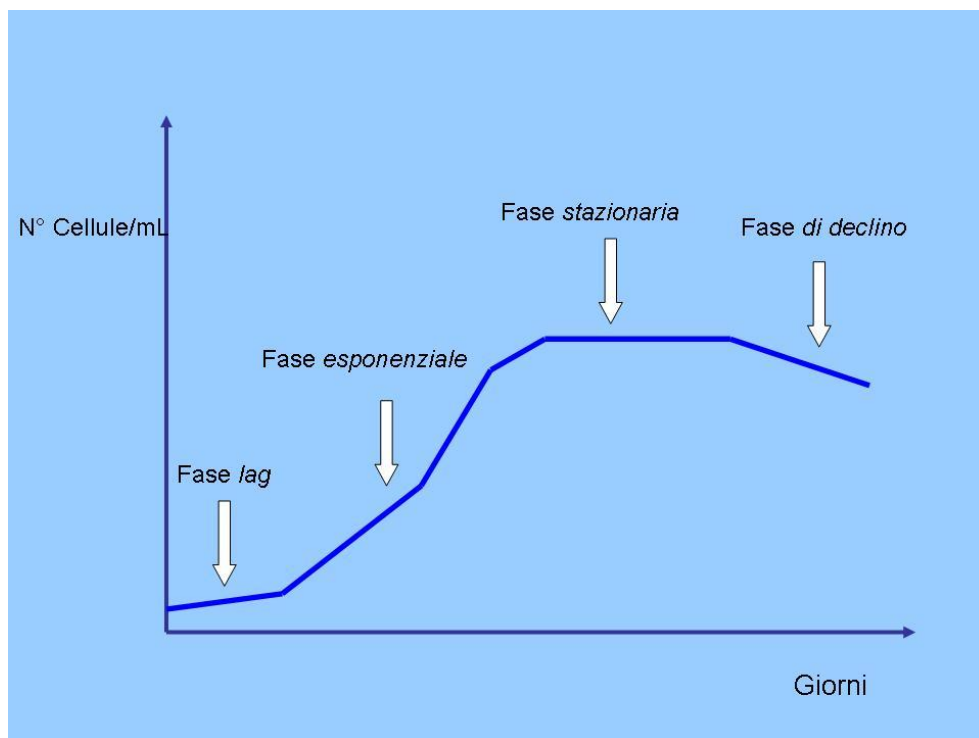


Figura 3.5 Andamento della curva di crescita algale e fasi di crescita.

fase *lag*, o di adattamento della coltura;

fase *esponenziale*, nella quale si ha una rapida crescita cellulare con andamento logaritmico;

fase *stazionaria*, nella quale diminuisce il tasso di crescita della coltura, in conseguenza all'esaurimento dei nutrienti. Il numero di cellule rimane pressoché costante e la fase può durare diverse settimane;

fase *di declino*. In questa fase i nutrienti si esauriscono sempre di più e le cellule cominciano a morire. Rispetto alle colture *batch* nel sistema di coltura semi-continuo si ha un ingresso di nutrienti in diversi tempi del processo e la contemporanea rimozione di volumi noti di coltura, ogni giorno senza però avere una portata continua. Le colture vengono parzialmente raccolte durante l'inizio della fase di *crescita stazionaria* con tre diversi tempi di residenza idraulica, 1.5, 3 e 5 giorni, e la quantità raccolta viene sostituita con nuovo mezzo di coltura. Il tempo di residenza idraulico è il tempo medio nel quale il volume totale di substrato si trova all'interno del sistema. La portata e la concentrazione del substrato sono stati costanti durante tutta la durata dell'esperimento.

E' possibile calcolare la velocità di crescita specifica prendendo due punti della curva di crescita durante la fase esponenziale, quando la curva mostra la massima pendenza. Il tasso di crescita, μ , può essere misurato applicando la seguente formula:

$$\mu = \ln (N_2/N_1)/t_2-t_1$$

3.5 Analisi delle proteine

L'analisi delle proteine è stata effettuata con il metodo di Lowry (1951). Questo metodo è basato su una reazione colorimetrica data dal reattivo di Folin (fosfomolibdato, fosfotungstato, sali rameici) con gli aminoacidi che contengono anelli aromatici. La determinazione quantitativa viene effettuata attraverso la lettura del composto colorato allo spettrofotometro (UV/VIS Jasco 7800) con una lunghezza d'onda (λ) di 750 nm, facendo riferimento ad una curva di taratura costituita utilizzando quantità note di albumina bovina come standard. L'analisi si

compie prelevando, per ogni bottiglia 5ml della coltura da riporre in provette di plastica. I prelievi si sottopongono a centrifugazione a 9000 rpm per 20 minuti ad una temperatura di 10°C, per precipitare tutte le cellule. Poi, si elimina tutto il sopranatante e si risospende immediatamente il pellet con 1ml di NaOH 0,1M. Successivamente è necessario sonicare effettuando quattro cicli da 30 secondi per ciascuna provetta, per avere la certezza che tutte le cellule si siano rotte e che il loro contenuto sia entrato in soluzione. L'avvenuta lisi delle cellule è testimoniata dalla colorazione verde che assume il materiale all'interno della provetta.

Soluzioni da utilizzare.

- 1) 5gr Na₂CO₃ in 50ml di NaOH 0,5M
- 2) 0,5gr Na,K tartrato in 50ml di H₂O
- 3) 50mg CuSO₄ in 10ml della soluzione 2

Soluzioni da preparare al momento.

- A) 10ml di soluzione 1 + 1ml di soluzione 3
- B) Reattivo di Folin Ciocalteu + 27ml di H₂O

Per costruire la curva di taratura si prepara una soluzione di albumina bovina di 1 mg/ml e si utilizzano quantità da 20 a 150 µg/ml. Da ciascuna provetta contenente il campione sonicato si fanno due prelievi, rispettivamente di 30µl e 50µl da riporre in nuove provette. Successivamente, tutti i volumi si portano a 1ml con NaOH 0,1M, il quale corrisponde anche al bianco per le letture allo spettrofotometro. Infine si aggiunge 1ml della soluzione A ad ogni provetta, si agita immediatamente su vortex e si aspetta 10 minuti. Poi si mettono 3ml della soluzione B, si agita subito su vortex e si attendono 30 minuti. Trascorso tale tempo, la reazione è avvenuta e si effettua la lettura a 750 nm. Dopo aver ottenuto i µg 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. Nelle colture in semicontinuo le misure di produttività, espresse in g/L/day, sono state calcolate come la variazione di concentrazione di biomassa (g/L) in un tempo di coltivazione della coltura espresso in giorni (day) secondo l'equazione:

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

Dove X_t è la biomassa (g/L) nel giorno t , V_{in} è il volume espresso in litri dell'effluente primario che entra nel sistema giornalmente e V_{tot} è il volume totale presente nel sistema.

3.6 Analisi polisaccaridi

3.6.1 Estrazione dei polisaccaridi

L'estrazione è stata eseguita secondo il metodo di Myklestad (1972).

Si prelevano delle aliquote di 10 ml dalla coltura, si mettono in tubi da centrifuga e si aggiungono 2 volumi di etanolo assoluto e si ripongono a -20°C per 24 ore. Dopo avere 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 1ml di H_2SO_4 80%. Si lascia per 20 ore in camera a 20°C per effettuare la digestione del campione; alla fine si diluisce il campione aggiungendo 6ml di H_2O distillata.

3.6.2 Determinazione dei polisaccaridi

L'analisi quantitativa è stata eseguita secondo il metodo di Dubois (1956).

Questo metodo è basato sul fatto che gli zuccheri in presenza di acidi concentrati formano dei composti ciclici detti furfurali. I furfurali condensano con i fenoli dando prodotti colorati. La determinazione quantitativa viene effettuata attraverso la lettura del composto colorato allo spettrofotometro, 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 $\mu\text{g/ml}$. La misura viene effettuata su un campione di 2 ml, pertanto si prelevano 2 ml dal campione precedentemente estratto, oppure 1ml a cui viene aggiunto 1ml di acqua distillata per portare a volume. Sotto cappa chimica si aggiungono in ogni tubo 50 μl di fenolo e subito dopo 5 ml di acido solforico concentrato. Si agita subito sul vortex e si fa riposare per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo aver ottenuto i μg 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. Le misure di produttività sono state ottenute come indicato per le proteine.

3.7 Analisi della clorofilla *a*

L'analisi quantitativa della clorofilla *a* è stata eseguita secondo il metodo descritto da Xue *et al.* (2011) e Ritchie (2006).

La misura viene effettuata su un campione di 5 ml, pertanto si prelevano 5 ml di coltura e si centrifugano per 20 minuti a 5000 rpm a temperatura ambiente, per precipitare tutte le cellule, viene eliminato il soprannatante e il pellet può essere conservato a -25°C. Al momento dell'estrazione il pellet viene miscelato con 5 ml di etanolo puro e riscaldato in un bagno ad acqua ad 80°C per 10 minuti e poi raffreddato per 30 minuti. Se sono presenti dei detriti in sospensione la miscela viene centrifugata nuovamente a 5000 rpm per 10 minuti. L'assorbanza del supernatante viene misurato a 750 nm e a 665 nm, l'etanolo puro viene utilizzato come bianco nell'analisi. Il contenuto di clorofilla viene calcolato come (Ritchie, 2006):

$$\text{Chla (mg/L)} = 11,9035 * (\text{Abs}_{665} - \text{Abs}_{750})$$

3.8 Misura dell'attività fotosintetica

L'attività fotosintetica è stata misurata con un fluorimetro PAM, ad impulsi di ampiezza modulata, il cui principio si basa sul fatto che 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 fotosistema II (PS II) può dare informazioni sull'efficienza della fotochimica. Il principio della misura della fluorescenza si basa sull'osservazione, fatta da Kautsky nel 1930 denominato "effetto Kautsky", 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 (101 con PDA-100, Walz) in

Figura 3.6 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 eseguire misure anche in campo (Juneau, 2005) ed è un valido strumento per monitorare il livello di stress della coltura in particolari condizioni di limitazione da nutrienti (White, 2011).

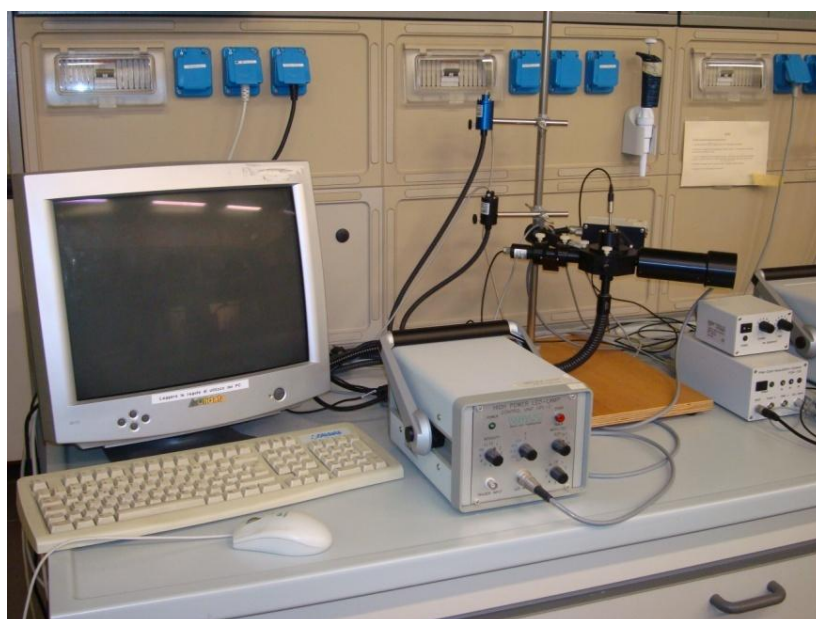


Figura 3.6 Fluorimetro PAM (101 con PDA-100, Walz)

Con il metodo degli impulsi saturanti è necessario adattare il campione (prelevandone circa 3 ml) al buio per 20 minuti circa, trascorsi i quali la sospensione algale viene posta in una cuvetta e inserita nel fluorimetro. Inizialmente il campione viene illuminato 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_0) 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 $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); questo riduce tutti gli accettori del PSII (QA) e la fluorescenza raggiunge il valore massimo (F_m) che si ottiene in assenza di fotochimica. È poi applicata una luce attinica per dare avvio alla fotosintesi (AL). Dopo un periodo di

tempo, un altro flash di luce saturante (SP) permette la misurazione della massima fluorescenza alla luce (F'_m) il livello di fluorescenza immediatamente prima del flash saturante è chiamato F_t . Lo spegnimento della luce attinica (AL), solitamente in presenza di luce nel rosso-lontano, permette la stima del livello zero di fluorescenza alla luce (F'_o) (Figura 3.7).

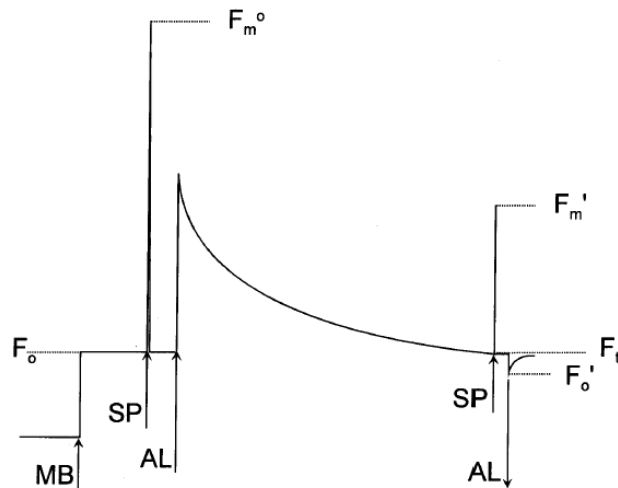


Figura 3.7 Esempio di protocollo sperimentale per la determinazione dei parametri di fluorescenza.

Da questa misura è possibile ottenere il rendimento quantico massimo o Yield massimo $(F_m - F_o)/F_m$ che si ha quando tutti i centri di reazione sono aperti e disponibili per la fotosintesi, indica variazioni nell'efficienza fotosintetica del fotosistema II. Per valutare lo stato della coltura in esame si valuta il valore iniziale che 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. Un altro parametro, l'estinzione fotochimica (qP) fornisce un'indicazione sulla proporzione dei centri di reazione del PSII che si trovano in uno stato aperto. L'estinzione non fotochimica (NPQ) della fluorescenza della clorofilla non è dovuta alla fotochimica del PSII ma ad altri processi indotti dall'esposizione del cloroplasto alla luce e quindi dalla quantità di energia non usata nella fotosintesi.

I principali indici di fluorescenza della clorofilla sono elencati in Tabella 3.1.

Parametri di estinzione fotochimica:	
$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$	Rendimento quantico potenziale del PSII (Yield massimo)
$\Phi_{PSII} = F'_v/F'_m = (F'_m - F'_o)/F'_m$	Rendimento quantico effettivo del PSII (Yield effettivo)
$qP = (F'_m - F_o)/F'_m - F'_o$	Coefficiente di decadimento fotochimico
Parametri di estinzione non fotochimica:	
$qN = F_m - F'_m / F_m - F'_o$	Coefficiente di decadimento non fotochimico
$NPQ = F_m - F'_m / F'_m$	Coefficiente di decadimento non fotochimico

Tabella 3.1 Indici di fluorescenza della clorofilla.

3.8.1 Induction curve e Light curve

Gli indici precedentemente descritti sono stati ottenuti dalle misure acquisite effettuando le cosiddette “induction curve” (IC) con il fluorimetro PAM per tutti e due gli esperimenti.

Le curve di induzione contengono informazioni complesse che riguardano il meccanismo fotosintetico. Attraverso l'applicazione di impulsi saturanti ripetitivi e analisi dell'estinzione fotochimica e non fotochimica (*quenching*) si ottengono informazioni essenziali per l'interpretazione dell'effetto Kautsky.

Nelle curve di induzione il campione viene illuminato con luce attinica di intensità luminosa costante pari a $440 \mu E m^{-2} s^{-1}$, ogni minuto viene applicato un flash saturante ($3000 \mu mol m^{-2} s^{-1}$) per 14 volte. Prima di effettuare una curva di induzione c'è una determinazione dello Yield in assenza di luce attinica, questo è un prerequisito essenziale per l'analisi del rendimento fotosintetico massimo ovvero l'efficienza quantica potenziale del PSII. I valori di fluorescenza ottenuti vengono plottati in un grafico tramite il programma WinControl (Figura 3.8). Durante i 14 minuti di illuminazione con luce attinica la coltura avvia la fotosintesi e raggiunge un valore di fluorescenza costante; il valore finale di Yield viene pertanto usato per valutare il rendimento fotosintetico effettivo alla luce. Questo parametro misura la proporzione di luce assorbita che viene usata per la fotosintesi e questo valore è stato dimostrato essere proporzionale all'efficienza di fissazione fotosintetica del carbonio.

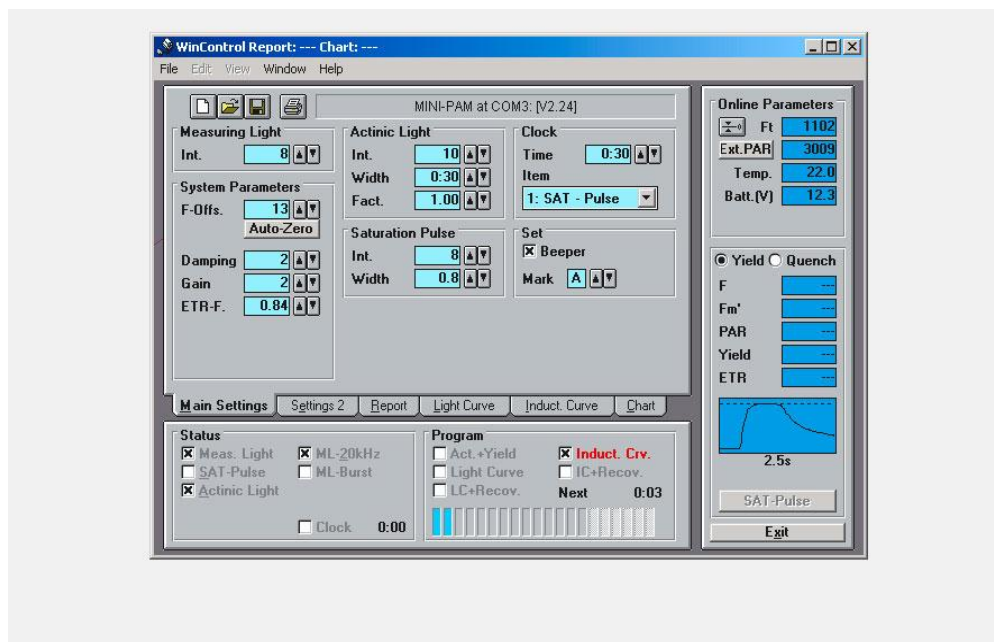


Figura 3.8 Schermata principale del programma WinControl

Una caratteristica fondamentale dell'apparato fotosintetico è la capacità di acclimatarsi alle condizioni di luce prevalente; utilizzando una "light curve" o curva P/E è possibile capire i vari stati di acclimatazione (HL o LL) nelle alghe attraverso la definizione di alcuni parametri misurati sulle curve ottenute.

Nelle colture dell'esperimento effettuato in semicontinuo sono state misurate giornalmente le *light curve*; queste consistono nell'aumentare progressivamente la luce attinica a cui le alghe vengono esposte per la durata di 1 minuto ed applicando allo scadere di questo tempo un flash saturante che permette di misurare lo Yield, il tutto per 9 volte. Prima di effettuare una LC c'è una prima determinazione dello Yield in assenza di luce attinica per la determinazione del rendimento quantico massimo.

L'intensità luminosa a cui avviene la saturazione (E_k), è stata misurata per ogni esperimento mediante il rapporto tra il massimo tasso fotosintetico (P_{max}) e la pendenza della curva (α).

3.9 Analisi qualitativa e quantitativa del fitoplancton

Allo scopo di descrivere la successione temporale delle specie di fitoplancton nella popolazione mista viene raccolta un aliquota di 1ml per ognuna delle tre repliche giornalmente durante tutta la fase dell'esperimento partendo dal giorno zero.

3.9.1 Conservazione dei campioni

I campioni vengono prelevati dalle bottiglie e trasferiti in provette di plastica da 10 ml e fissati con aldeide formica al 37%. La fissazione del campione, prima del conteggio, è resa necessaria per due motivi: previene la distruzione delle cellule e poi assicura la rapida sedimentazione delle cellule. I campioni vengono mantenuti a temperatura ambiente al buio, il conteggio è stato effettuato in tempi brevi per essere sicuri di non avere perdite di alcune cellule algali (prevalentemente flagellati), alterando così i risultati del successivo conteggio (Callieri e Stockner, 2002).

3.9.2 Preparazione dei campioni per il conteggio

Il conteggio delle cellule è stato eseguito in una camera di sedimentazione cilindrica in vetro; La preparazione della camera per il conteggio deve essere compiuta con molta cura: per primo è stato necessario omogeneizzare il campione nelle provette da 10 ml capovolgendolo ritmicamente, ma lentamente, per un certo numero di volte (circa 10); Le cellule algali della camera di sedimentazione, una volta preparata, sono state lasciate sedimentare sul fondo della stessa per 30 minuti.

3.9.3 Conteggio dei campioni

La determinazione specifica e la quantificazione delle alghe è stata realizzata seguendo il metodo Utermöhl (1958) utilizzando un microscopio ottico (ZEISS Axiovert 100). Il conteggio delle cellule algali presenti sul fondo della camera è stato realizzato con un ingrandimento 32x. Tutte le cellule algali sono state contate,

la valutazione esatta del numero di cellule di alcune specie coloniali (colonie ad es. cianobatteri degli ordini Chroococcales e Oscillatoriales) è complicato dal fatto che presentano una forma tridimensionale e che le cellule possono disporsi su più piani, per questo è stato valutato il numero di colonie. Altre specie (Chlorophyceae del genere *Chlorella* e altre alghe verdi) presentano un elevato numero di cellule sferiche di dimensioni che vanno dai 2 μm a 20 μm e non distinguibili da altre specie simili, per questa ragione sono state raggruppate e definite come nanoplancton non identificato.

Le cellule algali presenti nel campione vengono contate per campi lungo i due diametri principali del pozzetto, considerando 10 campi ogni diametro per i cianobatteri e 30 campi per ogni diametro per le restanti cellule algali. L'area del campo è di 0.302 mm^2 , mentre l'area del fondo del pozzetto equivale a 452.16 mm^2 . Dividendo l'area del pozzetto per l'area del campo, si ottiene un fattore di conversione pari a 1497, che deve essere moltiplicato per la media del numero di cellule contate nel campione. Il nanoplancton non identificato presente nel campione viene contato per campi lungo i due diametri principali del pozzetto, considerando 10 campi per ogni diametro, il conteggio è stato effettuato tramite reticolo posto all'interno del campo. Dividendo l'area del pozzetto per l'area del reticolo si ottiene un fattore di conversione pari a 4710. Il nanoplancton risulta distribuito in maniera più omogenea rispetto al resto delle altre cellule algali e quindi sono sufficienti meno osservazioni per averne una stima corretta. In questo modo si ottiene il numero di cellule per millilitro, presente nel campione in esame. Ripetendo questa procedura dal giorno zero fino al giorno di raccolta della coltura, e mettendo in relazione il numero di cellule per millilitro con il tempo, si ottiene una curva di crescita in cui è di solito possibile identificare le varie fasi di accrescimento (fase lag, esponenziale e stazionaria) e da cui è possibile ricavare la velocità di crescita specifica delle colture esaminate.

3.9.4 Calcolo del biovolume

Le dimensioni delle specie fitoplanctoniche variano su una scala di diversi ordini di grandezza (da 1 μm ad oltre 1 mm) e in alcuni gruppi, essenzialmente nelle diatomee, esiste una elevata variabilità intraspecifica della taglia cellulare, dovuta

alla modalità di riproduzione vegetativa. Per questo motivo è utile affiancare alla stima dell'abbondanza quella della biomassa fitoplanctonica, in molti studi risulta necessario esprimere la biomassa fitoplanctonica in termini di carbonio. Tale parametro può essere ricavato dalla misura del Carbonio Organico Particellato (POC) che però non consente di distinguere il contributo della frazione vivente da quello della frazione non vivente. Un comune descrittore della biomassa fitoplanctonica totale è la concentrazione della clorofilla *a* ma tale parametro viene considerato impreciso, in quanto il contenuto intracellulare di clorofilla è variabile poiché fortemente influenzato da fattori ambientali inoltre la biomassa è il peso della sostanza vivente mentre la clorofilla *a* ne rappresenta solo una parte. Sia la misura del POC sia quella della clorofilla non forniscono stime di biomassa a livello di specie, essenziale per quantificare il contributo dei diversi taxa presenti all'interno della comunità. A tale scopo è stato calcolato il biovolume relativo ai principali gruppi individuati a seguito del conteggio cellulare; il calcolo del biovolume totale del fitoplancton in un campione presuppone la conoscenza delle singole specie e del loro volume medio individuale.

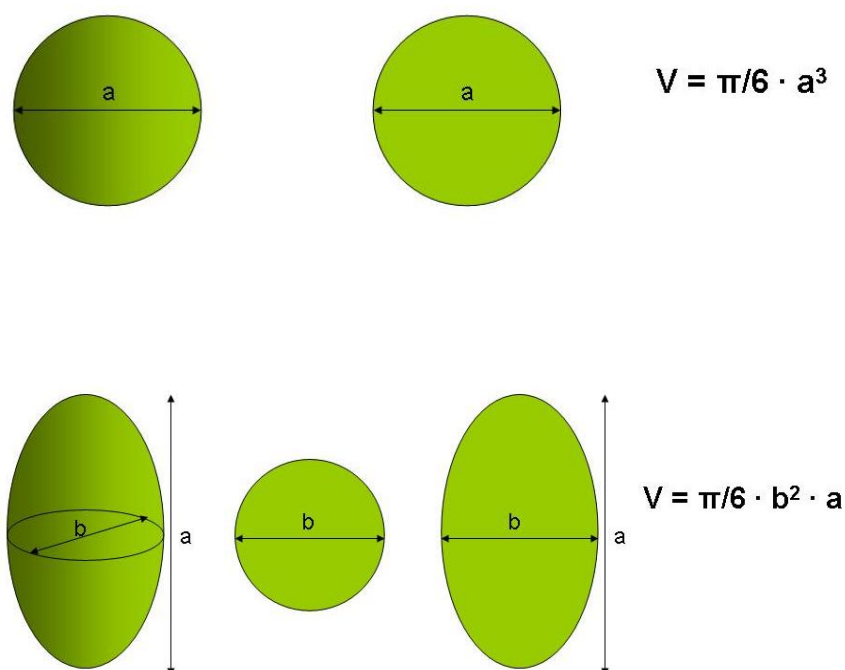


Figura 3.9 Forme geometriche e formule per il calcolo del biovolume. In alto forma sferica utilizzata per il nanoplancton non identificato, in basso forma sferoide utilizzata per *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. e *Actinastrum* sp..

Il calcolo del biovolume è stato eseguito su *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp., *Actinastrum* sp. e sul nanoplancton non identificato. La forma dei singoli taxa viene approssimata ad un solido noto per i quali si individuano le formule di calcolo del volume (Vadrucci *et al.*, 2007; Sun e Liu, 2003), per le prime tre uno sferoide mentre per il nanoplancton una sfera (Figura 3.9).

Per individuare il volume medio cellulare delle microalghe prese in considerazione sono state effettuate le relative misurazioni su 30 campi per ogni campione in replica. Si procede con il calcolo del biovolume fitoplanctonico del campione con la formula corrispondente. La misura della biomassa, espressa come biovolume per litro, si ricava moltiplicando il biovolume medio di ciascun taxon per la sua abbondanza.

3.10 Analisi nutrienti

3.10.1 Analisi dei fosfati

Vengono posti in cilindri graduati 50 ml di campione che consiste in acqua distillata per il bianco, in soluzioni a concentrazione nota per gli standard, oppure in acqua di coltura filtrata dei campioni allestiti. Alcuni campioni sono stati diluiti a causa dell'eccessiva concentrazione di fosfati che altrimenti non permetterebbero la misurazione spettrofotometrica. Per costruire la curva di taratura si prepara una soluzione di KH_2PO_4 ottenendo quindi la concentrazione di 309,7 μg di P/ml e si utilizzano quantità da 31,25 μl a 1 ml. Viene preparato un reattivo misto, contenente molibdato ammonico, acido solforico, acido ascorbico e tartrato di potassio e antimonite. I campioni vengono fatti reagire con il reattivo misto, aggiungendo 5 ml di quest'ultimo in tutti i cilindri, che vengono infine sigillati con parafilm e agitati vigorosamente. Dopo 10 minuti la reazione tra il campione il reattivo misto fa sì che il campione assuma una colorazione blu, che varia in intensità a seconda della concentrazione di fosfati presenti. Si procede con l'analisi utilizzando uno spettrofotometro UV/VIS Jasco 7800, ed effettuando le letture ad una lunghezza d'onda di 885 nm.

3.10.2 Analisi dei nitrati

Come per l'analisi dei fosfati, vengono posti in cilindri graduati l'acqua di coltura e i due terreni diluiti con acqua distillata, pari ad un quantitativo totale di 30 ml. L'analisi dei nitrati è stata svolta con il metodo della riduzione con cadmio (Strickland e Parson, 1972), mediante il kit Permachem reagents (HACH), che contiene i reagenti già ripartiti nelle dosi necessarie per lo svolgimento della reazione e suddivisi in due preparati (NitraVer 6 e NitraVer 3). Al campione da analizzare viene aggiunto il primo preparato contenente cadmio metallico ramato (NitraVer 6); il cilindro è subito sigillato con parafilm e agitato per 3 minuti. Dopo due minuti la reazione è avvenuta, il cadmio, che a fine reazione si deposita sul fondo del cilindro, ha ridotto il nitrato a nitrito. Il contenuto del cilindro viene versato nell'apposita cuvetta da 25 ml, facendo attenzione a non risospingere in soluzione il cadmio. Alla cuvetta viene aggiunta una soluzione di Solfanilammide (SA) e di Naftilendiammina (NEDA) (contenuti nel secondo preparato, NitraVer 3), che danno la colorazione al campione. La cuvetta infine viene chiusa con parafilm e agitata vigorosamente. Dopo 10 minuti la soluzione si colora di rosa, tanto intenso quanto più nitrati sono presenti nel campione analizzato. Per tarare lo strumento, vengono aggiunti in una seconda cuvetta 25 ml di campione, anch'esso diluito come il precedente. Questo è il bianco su cui verrà fatta la prima lettura spettrofotometrica a 543 nm. Infine si misura per via spettrofotometrica l'assorbanza del campione in due repliche. I valori sono espressi come mg/l di $\text{NO}_3^- \text{N}$.

3.10.3 Analisi nitriti

L'analisi dei nitriti è stato effettuato secondo il metodo della diazotizzazione dove il nitrito presente nel campione reagisce con l'acido solfanilico per formare un sale di diazonio intermedio. Questo, a sua volta, si unisce con un acido "cromotropico" per produrre un complesso colorato di rosa che è direttamente proporzionale alla quantità di nitrito presente. L'analisi è stata condotta riempiendo l'apposita cuvetta con 5 ml di campione da analizzare. A questa viene aggiunta una soluzione di Solfanilammide (SA) e di Naftilendiammina (NEDA) (contenuti nel secondo preparato, NitraVer 3), la cuvetta viene chiusa con parafilm e agitata vigorosamente fino al dissolvimento della polvere. Dopo 20 minuti la soluzione si colora di rosa se

il nitrito è presente. Per tarare lo strumento, vengono aggiunti in una seconda cuvetta 5 ml di campione, questo è il bianco su cui verrà fatta la prima lettura spettrofotometrica a 507 nm. Infine si misura per via spettrofotometrica l'assorbanza del campione in due repliche. I valori sono espressi come mg/l di NO_2^- -N.

3.10.4 Analisi dell'azoto ammoniacale

L'analisi dell'azoto ammoniacale è stato effettuato secondo il metodo della riduzione del cadmio, i campioni vengono diluiti con acqua distillata portando a 25 ml il volume finale. Alla prima cuvetta vengono aggiunti 25 ml del campione mentre nella seconda cuvetta vengono aggiunti 25 ml di acqua distillata (questo è il bianco). Vengono aggiunte tre gocce di Mineral Stabilizer a ciascuna cuvetta e agitate alcune volte per inversione, successivamente vengono aggiunte tre gocce di Polivinylic Alcohol a ciascuna cuvetta e agitate nuovamente. Infine è stato aggiunto 1 ml di reagente di Nessler (soluzione di tetraiodomercurato di potassio, $\text{K}_2[\text{HgI}_4]$) a ciascuna cuvetta. Si attende un minuto per la reazione in seguito viene effettuata la lettura allo spettrofotometro con lunghezza d'onda di 425 nm del bianco e successivamente del campione in analisi. I valori sono espressi come mg/l di NH_3^- -N.

Risultati e discussione

4.1 Coltura di *Scenedesmus* sp. in semicontinuo

Il primo esperimento è stato effettuato con la modalità delle colture semicontinue ed è stato eseguito per valutare l'effetto di tempi di residenza idraulica diversi sulla composizione biochimica di *Scenedesmus* sp. attraverso la caratterizzazione della biomassa, inoltre si è valutata la capacità di adattamento dell'alga alle condizioni prescelte attraverso la misura dei parametri fotochimici utilizzando il fluorimetro PAM.

Colture di *Scenedesmus* sp. sono state allestite nell'acqua dell'effluente primario con tempi di residenza idraulica (HRT) di 1.5, 3 e 5 giorni derivanti da diversa diluizione delle colture: nel primo caso 2/3 della coltura vengono prelevati e sostituiti giornalmente immettendo nel sistema l'acqua dell'effluente primario, lo stesso è avvenuto per il tempo di residenza 3 con una sostituzione di 1/3 della coltura e per il tempo di residenza 5 con una sostituzione di 1/5 della coltura. Pertanto i tempi di residenza maggiori corrispondono a un minor apporto di acqua dell'effluente primario e quindi di nutrienti disponibili per le microalghe. Oltre a questo è da considerare che la coltura con tempi di residenza maggiori è sottoposta a maggiore ombreggiamento delle alghe stesse e quindi si verranno a creare diverse condizioni di apporto di luce a seconda del tempo di residenza idraulico.

Dal giorno dell'inoculo si è seguita la crescita tramite misure di torbidità fino a quando non si è raggiunto l'inizio della fase stazionaria, a questo punto si è proceduto rimuovendo dalla coltura ogni giorno 3 volumi diversi, a seconda della condizione, e sostituendoli con lo stesso volume di acqua del primario per mantenere le condizioni di tempi di residenza idraulica sopra descritte.

I risultati delle misure di torbidità sono riportati nel grafico in Figura 4.1 per ogni coltura alle diverse condizioni di tempo di residenza idraulica.

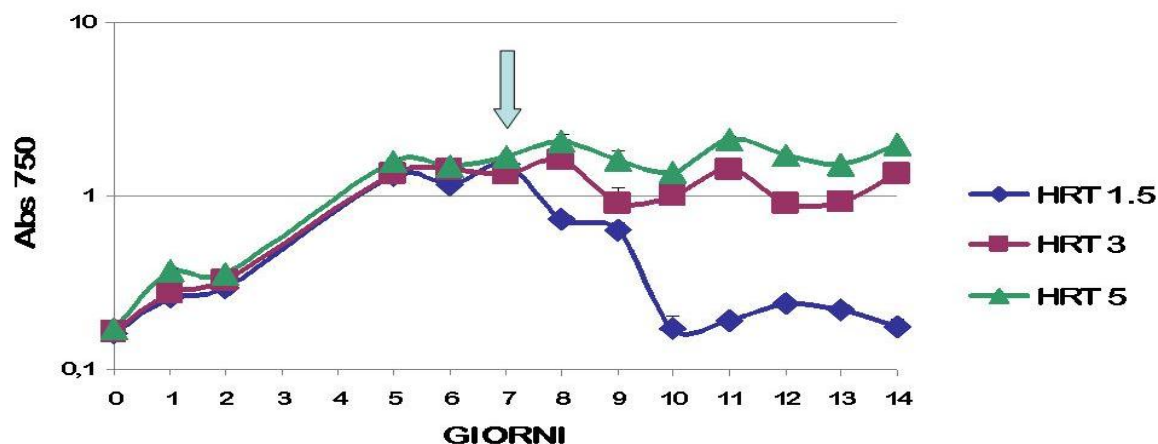


Figura 4.1 Andamento dei valori di torbidità (Abs 750 nm) delle colture di *Scenedesmus* sp. alle tre condizioni di tempo di residenza idraulica (HRT). L'inizio delle diluizioni, che corrisponde all'inizio della fase stazionaria, è indicato con una freccia.

Dal grafico si può osservare come nella prima fase, prima delle diluizioni, le colture seguono lo stesso andamento di crescita esponenziale, con una velocità di crescita pari a $0,49 \text{ giorni}^{-1}$ e un tempo di duplicazione pari a 34 ore fino alla fase stazionaria. Questo risultato è simile a quanto osservato con *Chlorella* sp., un'altra microalga appartenente alla classe delle Chlorophyceae, in cui è stata misurata una velocità di crescita pari a $0,36 \text{ giorni}^{-1}$ e un tempo di duplicazione pari a 45 ore, crescendo in un *medium* composto dal 40% di BG-11 (un terreno di coltura comunemente usato per le microalghe di acqua dolce preparato in laboratorio) e il 60% di acque reflue urbane precedentemente sottoposte ad un trattamento di dechlorazione (Mutanda 2011).

Dall'inizio delle diluizioni fino al termine dell'esperimento si osserva una quantità di biomassa minore della coltura con tempo di residenza idraulica di 1,5 giorni mentre per le condizioni di 3 e 5 giorni di residenza idraulica l'andamento risulta simile.

Per quanto riguarda la caratterizzazione della biomassa, nel grafico riportato in Figura 4.2 e in Tabella 4.1 sono riportate le percentuali su peso secco dei componenti algali quali polisaccaridi, proteine, clorofilla a (Chl a), ceneri (ASHES) e acidi grassi totali (TFA). Le analisi sono state effettuate all'inizio della fase stazionaria (Giorno 7) e nell'ultimo giorno di permanenza nelle tre condizioni con

diverso tempo di residenza idraulica (Giorno 14). I valori ottenuti all'inizio della fase stazionaria, ricordando che la coltura in quel momento si può considerare ancora *batch*, sono stati messi a confronto con quelli dell'ultimo giorno di permanenza nelle tre condizioni in semicontinuo. La misura degli acidi grassi totali è stata eseguita presso il laboratorio di chimica del C.I.R.S.A..

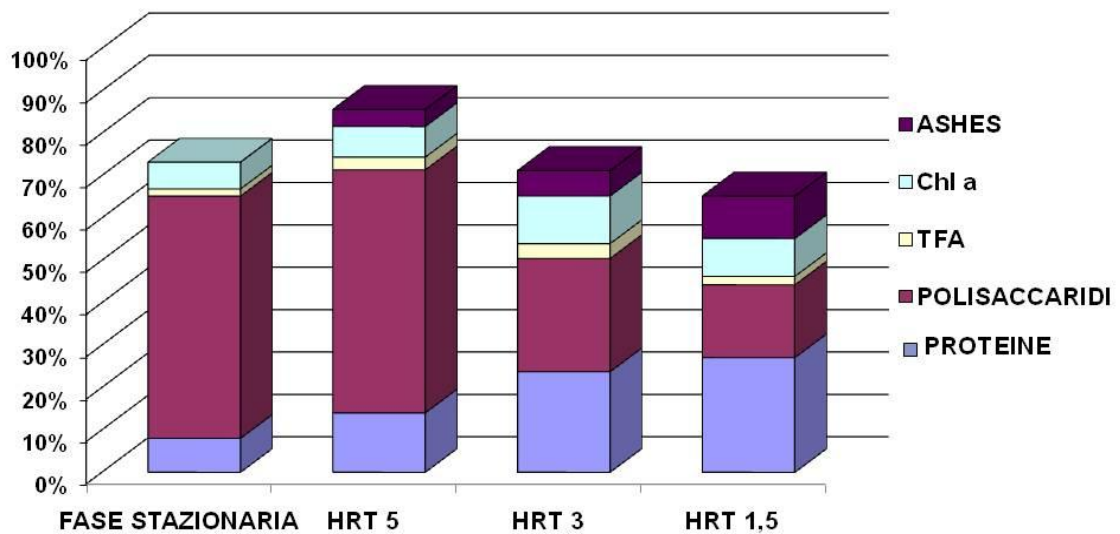


Figura 4.2 Caratterizzazione della biomassa di *Scenedesmus* sp. (%W/W) all'inizio della fase stazionaria (prima delle diluizioni) e nell'ultimo giorno di crescita in tre diverse condizioni di durata di residenza idraulica (HRT).

Si può osservare come nella fase stazionaria e nella condizione HRT 5 in cui la coltura è sottoposta a una forte carenza di nutrienti, la percentuale di polisaccaridi su peso secco rimane invariata su valori del 57%. Nelle condizioni HRT 3 e 1,5 questa percentuale si abbassa al diminuire del tempo di residenza, risultato che può essere messo in relazione con il fatto che l'apporto giornaliero di nutrienti aumenta in corrispondenza di tempi di residenza idraulica più bassi. Si ipotizza che il contenuto in polisaccaridi sia quindi influenzato da una condizione di stress nutrizionale a cui la coltura viene sottoposta. Tale osservazione non è evidente per

quanto concerne il contenuto in acidi grassi, infatti non si notano sostanziali differenze alle varie condizioni, in cui la percentuale misurata non supera il 3,5%.

La percentuale di proteine prodotta dalle colture aumenta al diminuire del tempo di residenza idraulica fino ad ottenere il 27% di proteine su peso secco nel trattamento HRT 1,5. Questo può essere messo in relazione al maggiore apporto di nutrienti che viene fornito ai sistemi con tempi di residenza idraulica minore, infatti la maggiore produzione di proteine è legata alla presenza delle varie forme di azoto nel *medium*, costituite prevalentemente da azoto ammoniacale.

	Polisaccaridi (%W/W)	Proteine (%W/W)	Chl a (%W/W)	TFA (%W/W)	ASHES (%W/W)
Fase Stazionaria	57,1	8,0	6,3 ± 0,3	1,7 ± 0,6	
HTR 5	57,3 ± 1,9	14,0 ± 0,3	7,2 ± 0,4	3,0 ± 0,4	4,0 ± 0,5
HRT 3	26,7 ± 0,4	23,7 ± 2,1	11,2 ± 0,4	3,5 ± 0,5	6,0 ± 1,7
HRT 1,5	17,2 ± 0,6	27,1 ± 3,5	8,9 ± 0,6	2,0 ± 0,1	10,0 ± 1,6

Tabella 4.1 Composizione della biomassa (percentuale su peso secco) analizzata nella fase stazionaria e nelle tre condizioni di tempo di residenza idraulica.

Nei seguenti grafici sono riportati i valori in termini assoluti di proteine, polisaccaridi e acidi grassi totali al termine dell'esperimento.

I valori di proteine, riportati in Figura 4.3 come concentrazione (mg/L) per le tre diverse condizioni, rivelano differenze rispetto al risultato espresso come percentuale su peso secco. Nelle condizioni con tempi di residenza di 3 e 5 giorni, le proteine raggiungono valori di 100 mg/L mentre a tempi di residenza più bassi la concentrazione di proteine è di 56 mg/L.

In base ai risultati acquisiti si osserva un'incongruenza tra i valori assoluti e relativi delle proteine poiché, nonostante la percentuale di proteine all'interno della biomassa ottenuta sia maggiore in condizioni di HRT 1,5, i valori in termini assoluti mostrano che nella stessa condizione la quantità su litro è inferiore rispetto ad HRT 3 e HRT 5 giorni.

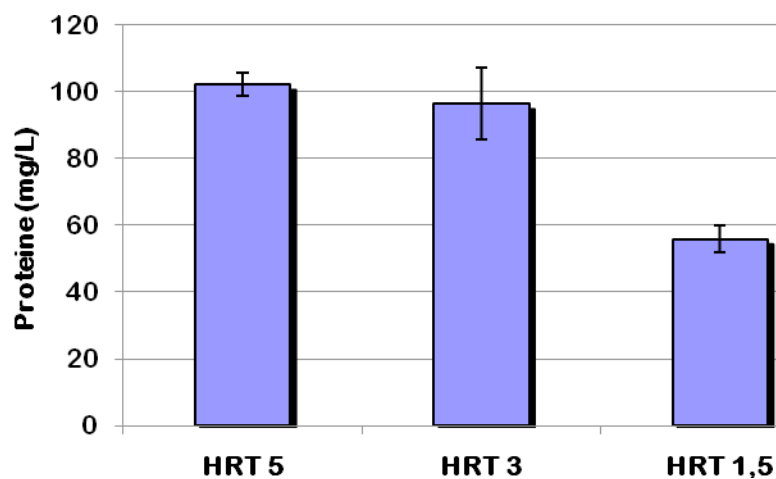


Figura 4.3 Valori assoluti di proteine, in mg/L, nelle tre condizioni di tempo di residenza idraulica.

I valori di polisaccaridi in termini assoluti (mg/L) sembrano confermare i dati in termini di percentuale su peso secco in quanto si hanno concentrazioni di polisaccaridi elevate a HRT 5 mentre per tempi di residenza più bassi il valore di polisaccaridi prodotti per litro di coltura diminuisce (Figura 4.4).

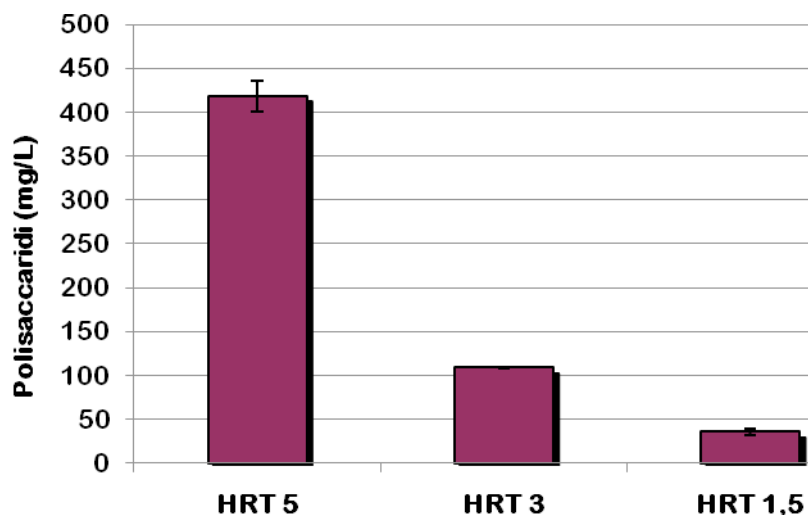


Figura 4.4 Valori assoluti di polisaccaridi, in mg/L, nelle tre condizioni di tempo di residenza idraulica.

I valori di acidi grassi totali risultano essere maggiori in condizioni di HTR 5 giorni e diminuiscono in tempi di residenza idraulica minori come mostrato anche dai valori espressi in percentuale su peso secco (Figura 4.5).

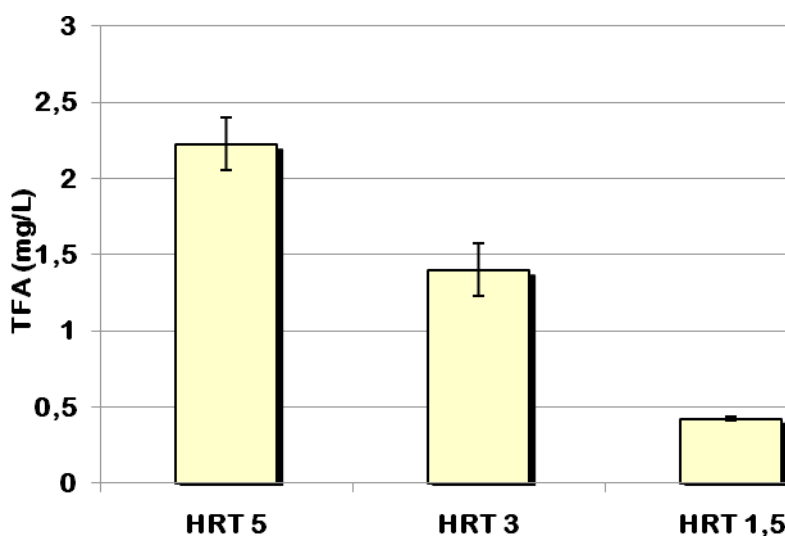


Figura 4.5 Valori assoluti di acidi grassi totali (TFA) in mg/L nelle tre condizioni di tempo di residenza idraulica.

Dai valori assoluti dei componenti cellulari si è potuto calcolare la resa giornaliera (g/L/day) i dati ottenuti sono riportati in Tabella 4.2. I valori di produttività dei polisaccaridi risultano più alti a tempi di residenza idraulica maggiori ottenendo il massimo valore nella condizione HRT 5, per quanto riguarda la produttività delle proteine invece si hanno valori inversi con produttività maggiori a valori di HRT minori. Il contenuto di acidi grassi totali segue l'andamento dei polisaccaridi con valori alti di produttività a tempi di residenza maggiori. Si può ipotizzare quindi che l'apporto maggiore di nutrienti stimola la produzione di proteine all'interno della cellula mentre uno stress dovuto alla limitazione da nutrienti porta ad un aumento di polisaccaridi intracellulari e acidi grassi.

	Produttività polisaccaridi g/L/day	Produttività proteine g/L/day	Produttività TFA g/L/day
HRT 5	0,084	0,020	$0,045 \cdot 10^{-2}$
HRT 3	0,036	0,032	$0,047 \cdot 10^{-2}$
HRT 1,5	0,024	0,037	$0,028 \cdot 10^{-2}$

Tabella 4.2 Valori di produttività di polisaccaridi e proteine nelle tre condizioni di tempo di residenza idraulica.

L'andamento della quantità di clorofilla presente nelle cellule, espresso come percentuale di peso secco del pigmento su peso secco totale dell'alga, è riportato nel

grafico in Figura 4.6. Dopo un primo calo avvenuto il giorno 2 le quantità tendono ad aumentare in tutte e tre le condizioni; nel tempo di residenza HRT 3 si ha la massima percentuale di clorofilla, la condizione HRT 1,5 si trova in una condizione intermedia mentre al tempo di residenza maggiore (HRT 5) si ha una minore percentuale di clorofilla a. Il calo in tutte e tre le condizioni può essere spiegato da una prima fase di adattamenti fisiologici che le microalghe mettono in atto subito dopo la diluizione, dal giorno 3 al giorno 8 si ha un aumento di clorofilla probabilmente dovuto al graduale aumento di biomassa che provoca ombreggiamento tra le microalghe. Questo solitamente provoca una risposta fisiologica basata sull'aumento del numero di molecole di clorofilla a per cellula, ogni molecola però risulta meno efficiente nell'assorbimento della luce poiché è dimostrato che le microalghe acclimatate a bassa luce hanno una minore sezione di assorbimento ottico.

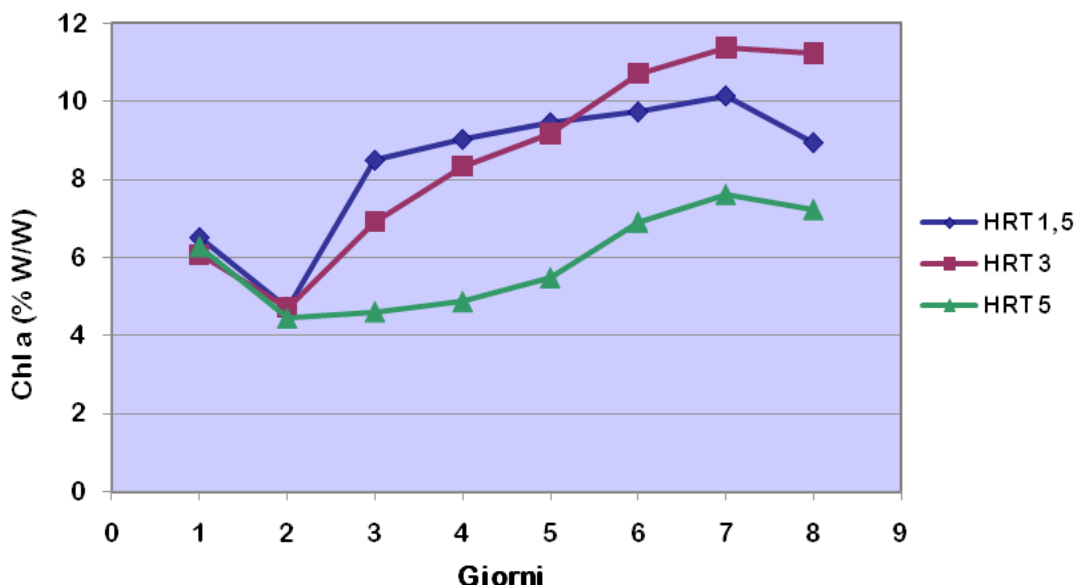


Figura 4.6 Valori relativi (%W/W) di clorofilla a nel tempo nelle tre condizioni di residenza idraulica.

Per capire meglio le risposte fisiologiche delle microalghe alle diverse diluizioni adottate, sono state effettuate giornalmente analisi di efficienza fotosintetica tramite un fluorimetro PAM a partire dal giorno 7 (il giorno di inizio delle diluizioni che nei grafici corrisponde al giorno 1) per 8 giorni fino al termine dell'esperimento. Sia nelle *light curve* che nelle *induction curve* relative a questo esperimento i campioni

analizzati il giorno 1 si riferiscono alla coltura non ancora diluita con l'effluente primario.

Di seguito sono riportati i grafici ottenuti eseguendo le *light curve*, o curve P/E, utili per capire l'andamento della fotosintesi in funzione dell'intensità luminosa. Ricordiamo che l'aumento di luce a cui sono stati sottoposti i campioni porta ad un aumento corrispondente di fotosintesi con andamento lineare, e che il valore del rapporto fotosintesi/irradianza in questa parte di curva, rappresentato dal parametro alfa (α) non possiede unità di misura poiché è un valore proporzionale al rendimento quantico massimo della fotosintesi. In Figura 4.7 sono riportati in grafico i valori di alfa (α) a partire dal giorno in cui la coltura diviene semicontinua. È evidente come nel tempo di residenza HRT 1,5 i valori di alfa risultino bassi se confrontati con tempi di residenza maggiori, questo rivela una minore efficienza da parte della coltura di utilizzare la luce per la fotosintesi. Questo può essere dovuto al fatto che la coltura è troppo esposta alla luce, a causa della maggiore diluizione, e per questo l'alga riduce i centri di reazione per effettuare la fotosintesi a favore di pigmenti fotoprotettivi, come i carotenoidi, che assorbono l'energia in eccesso e la dissipano come calore per non arrecare danno alle strutture cellulari fotosintetiche. A tempi di residenza di 3 e 5 giorni i valori di alfa risultano simili e quindi le due condizioni non influiscono in maniera differente sull'efficienza fotosintetica della coltura.

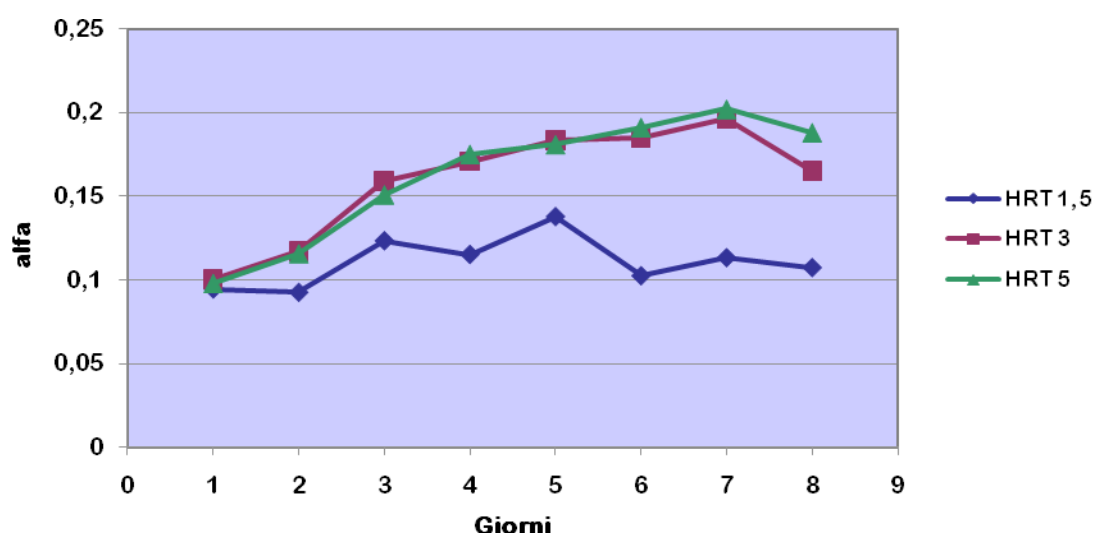


Figura 4.7 Valori di alfa (α) misurati nel tempo nelle tre condizioni di residenza idraulica (HRT).

Un ulteriore parametro preso in considerazione nell'analisi delle *light curve* è l'ETR ovvero il tasso di trasporto degli elettroni, che rappresenta una misura indiretta della velocità di fotosintesi in quanto proporzionale alla quantità di ossigeno prodotto. Durante l'esecuzione delle *light curve* la velocità di fotosintesi aumenta con l'aumentare dell'intensità luminosa fino a quando si stabilizza su un valore massimo chiamato ETR massimo (ETR_{max}) che si raggiunge nella fase di *plateau*. Nel grafico in Figura 4.8 si può osservare come allo stesso modo del parametro alfa (α) la coltura che ha come tempo di residenza 1,5 giorni ha valori più bassi rispetto alle condizioni di 3 e 5 giorni di residenza idraulica.

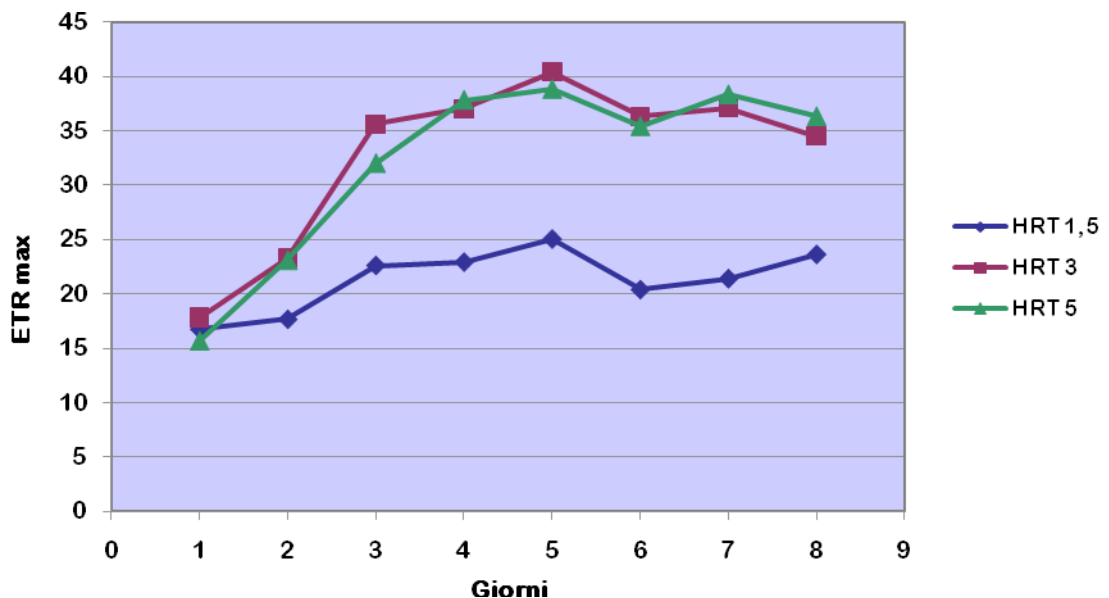


Figura 4.8 Valori di ETR_{max} ($\mu\text{mol elettroni m}^{-2} \text{s}^{-1}$) nel tempo nelle tre condizioni di residenza idraulica (HTR).

Il valore ottenuto dal rapporto tra ETR_{max} ed alfa (α) ci fornisce il parametro E_k (Figura 4.9) che rappresenta il livello di irradianza ottimale per la fotosintesi. Tale livello risulta avere un *range* ottimale di radiazione fotosinteticamente attiva (PAR) che va da 160 a 225 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nelle tre condizioni.

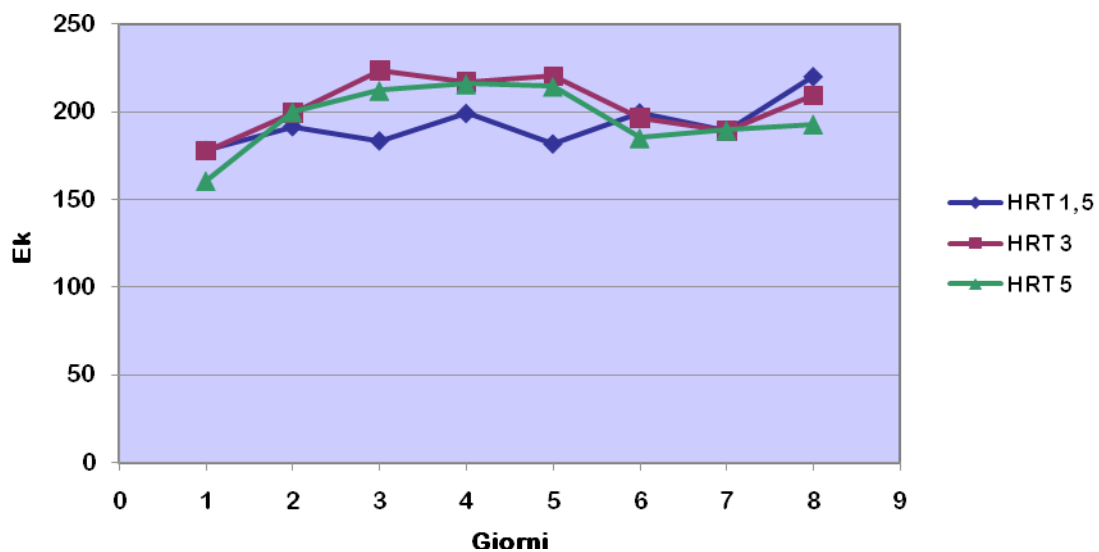


Figura 4.9 Valori di E_k ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) giorni misurati nel tempo nelle tre condizioni di tempo di residenza idraulica (HRT).

Attraverso l'analisi delle *induction curve* sono stati determinati i valori di Yield massimo o rendimento quantico massimo (F_v/F_m).

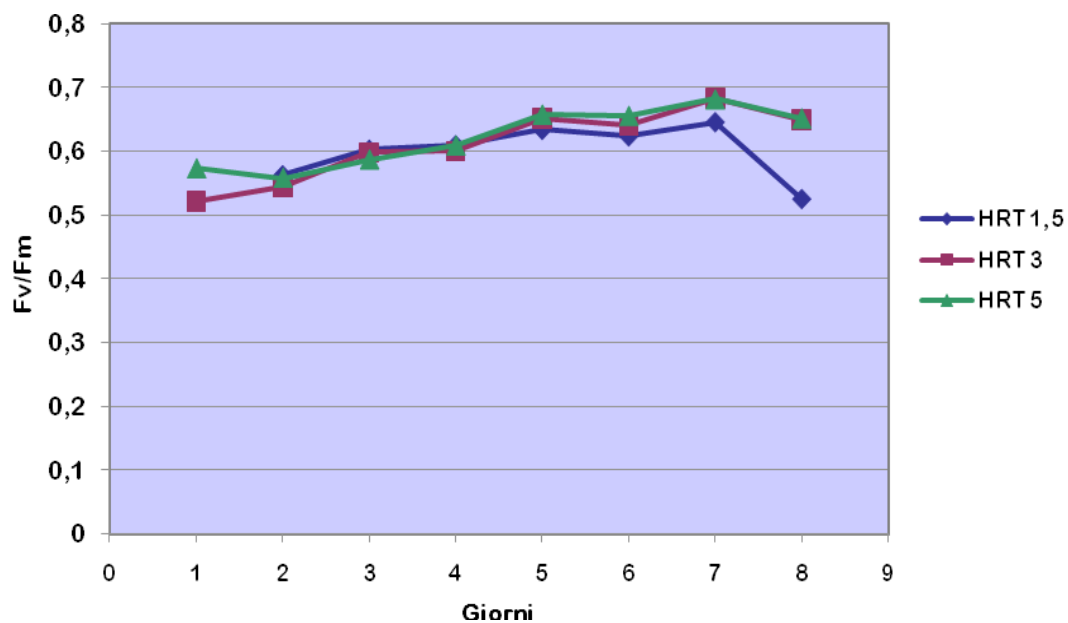


Figura 4.10 Valori di Yield massimo (F_v/F_m) nei giorni nelle tre condizioni di tempo di residenza idraulica (HRT).

Questo valore rappresenta la misura di efficienza fotosintetica potenziale del PSII e si ottiene dopo che la coltura è stata adattata al buio supponendo che tutti i centri di reazione del PSII nel momento dell'analisi siano aperti e disponibili per compiere la fotosintesi; i valori riportati nel grafico in Figura 4.10 mostrano come non ci siano differenze significative nei tre tempi di residenza idraulica; i valori di Yield massimo compresi tra 0,6-0,7 sono indicativi di un buon stato fisiologico delle alghe. Si nota un graduale aumento dello Yield massimo partendo dal giorno 1 fino al giorno 7, indice di un adattamento alle nuove condizioni di coltura, e successivamente un lieve declino nel giorno 8.

Un ulteriore valore considerato nell'analisi delle *induction curve* è lo Yield effettivo o rendimento quantico effettivo (Φ PSII); questo parametro misura la porzione di luce, assorbita dalla clorofilla associata al PSII, che viene usata nel processo fotochimico. Ricordiamo che questo valore si ottiene dopo aver sottoposto il campione ad una luce attinica per 14 minuti e impulsi saturanti ogni minuto durante l'analisi. In condizioni di laboratorio, c'è una forte relazione lineare tra questo parametro e l'efficienza della fissazione del carbonio, tuttavia potrebbe verificarsi una discrepanza tra questi due parametri in particolari condizioni di stress, dovuto al cambiamento dei tassi di fotorespirazione delle alghe (Fryer *et al.*,1998). In Figura 4.11 sono riportati in grafico i valori di Yield effettivo, questi mostrano come per il tempo di residenza idraulico 3 e 5 giorni non ci siano sostanziali differenze mentre per il tempo di residenza 1,5 giorni si nota un andamento con valori più bassi di Yield effettivo; questo può essere dovuto al fatto che la coltura con un minor tempo di residenza idraulica è sottoposta ad uno stress maggiore che causa fotoinibizione. È interessante questo risultato poiché nello Yield massimo non sono state riscontrate differenze significative per le tre condizioni mentre dopo aver sottoposto le colture alla luce, la coltura con tempo di residenza 1,5 giorni mostra una condizione di stress.

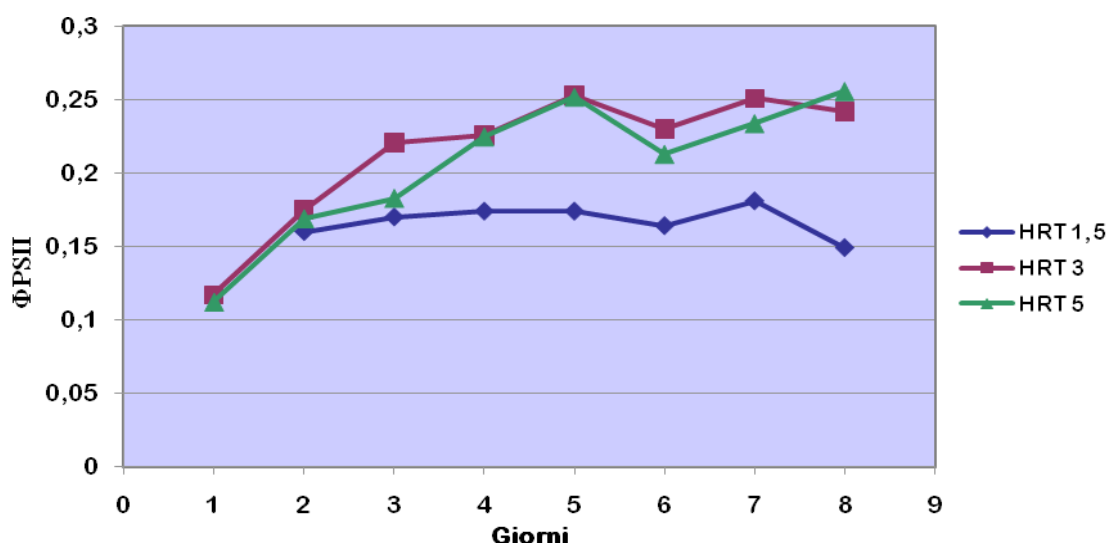


Figura 4.11 Valori di Yield effettivo (Φ_{PSII}) nei giorni nelle tre condizioni di tempo di residenza idraulica (HRT).

Attraverso le *induction curve* è inoltre possibile determinare il qP ovvero il *quenching* fotochimico che fornisce un'indicazione sulla proporzione dei centri di reazione del PSII che si trovano in uno stato aperto, da non confondere con il rendimento quantico effettivo (Φ_{PSII}) che misura l'energia luminosa assorbita dai centri di reazione del PSII per le reazioni fotochimiche. Nel grafico in Figura 4.12 si osserva un aumento rapido dei valori di qP dal giorno 1 al giorno 3, ovvero dall'inizio delle diluizioni nei tre tempi di residenza idraulica, e dal giorno 4 fino al termine dell'esperimento si osservano valori di qP stazionari maggiori nei tempi di residenza idraulica 3 e 5 giorni e meno elevati nel tempo di residenza 1,5 giorni. I valori bassi di qP nel tempo di residenza idraulica 1,5 giorni sono dovuti ad una saturazione del processo fotochimico precoce rispetto a tempi di residenza maggiori da parte della luce. La fotoacclimatazione delle colture nelle tre condizioni avviene principalmente attraverso la regolazione del tasso di *quenching* fotochimico qP , come è visibile nei primi tre giorni delle diluizioni.

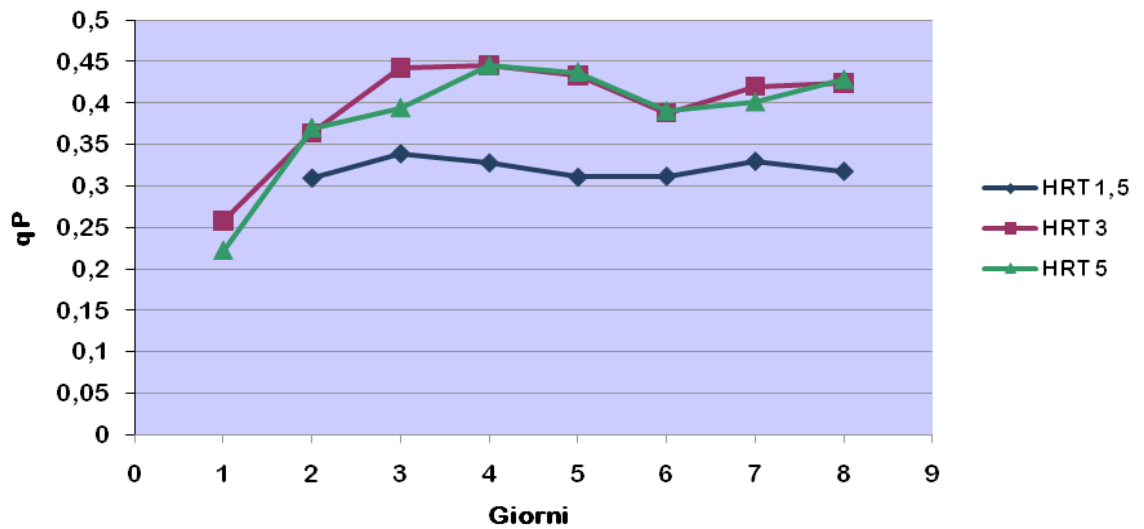


Figura 4.12 Valori di *quenching* fotochimico (qP) nel tempo nelle tre condizioni di tempo di residenza idraulica (HRT).

È stato determinato poi il *quenching* non fotochimico (NPQ) che rappresenta la dissipazione di calore provocata da situazioni di stress. Il valore di NPQ è più alto ad alta irradianza indicando un meccanismo di protezione messo in atto per evitare la sovra-eccitazione delle membrane tilacoidali.

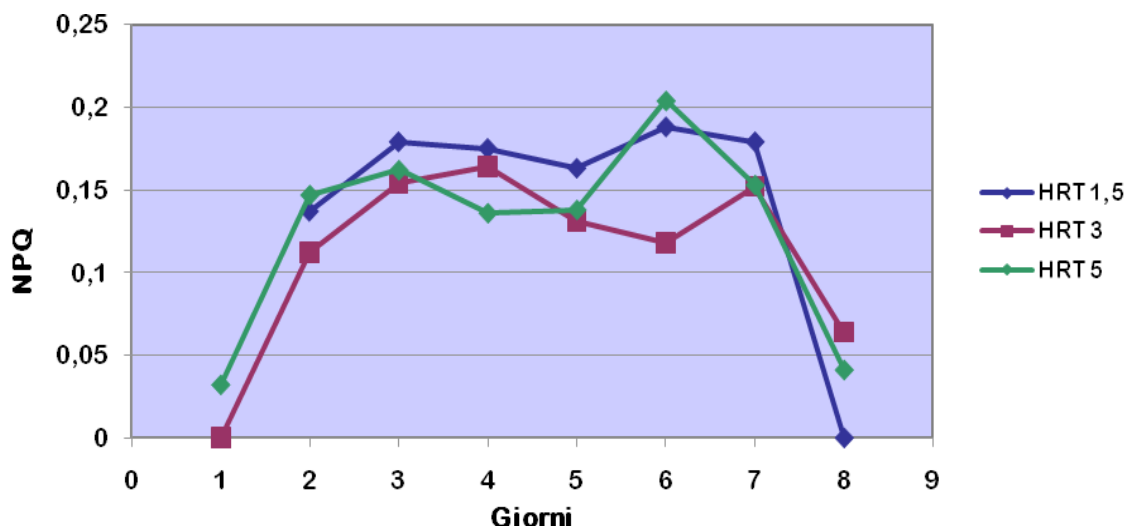


Figura 4.13 Valori di *quenching* non fotochimico (NPQ) nei giorni nelle tre condizioni di tempo di residenza idraulica (HRT).

Nel grafico in Figura 4.13 si può osservare come prima delle diluizioni (giorno 1) i valori di NPQ risultano bassi in tutte e tre le condizioni; dal giorno 2 al giorno 7 si ha un aumento dei valori nelle tre condizioni mentre nel giorno 8 si ha un declino dei valori di NPQ in tutte e tre i tempi di residenza idraulica. L'aumento osservato

dal giorno 2 fino al giorno 7 è spiegabile come una risposta della coltura ad un aumento di luce causato dall'avvio della fase in semicontinuo, non sembrano esserci differenze significative e le tre condizioni sembrano avere lo stesso andamento.

4.2 Popolazione naturale in coltura *batch*

L'esperimento descritto in questo paragrafo è stato effettuato utilizzando colture *batch*, l'inoculo in questo caso è stato fatto utilizzando una popolazione mista prelevata in estate (Luglio 2011) dalla vasca di sedimentazione terziaria del depuratore di Ravenna; si tratta pertanto di una popolazione autoctona, formatasi spontaneamente, e cresciuta all'aperto in condizioni non controllate.

Partendo dal giorno dell'inoculo, la crescita è stata seguita con misure di torbidità fino al termine dell'esperimento. I risultati ottenuti per tutta la durata dell'esperimento sono riportati nel grafico in Figura 4.14. La velocità di crescita delle colture è risultata pari a $0,48 \text{ giorni}^{-1}$ con un tempo di duplicazione pari a 34 ore circa; questi valori non si discostano in maniera significativa da quanto misurato nella monocultura di *Scenedesmus* sp. nell'esperimento in semicontinuo, prima delle diluizioni. Il valore massimo di torbidità invece viene raggiunto in tempi più lunghi rispetto all'esperimento in semicontinuo con *Scenedesmus* sp. La biomassa ottenuta al termine dell'esperimento dopo 14 giorni è di 963 mg/L.

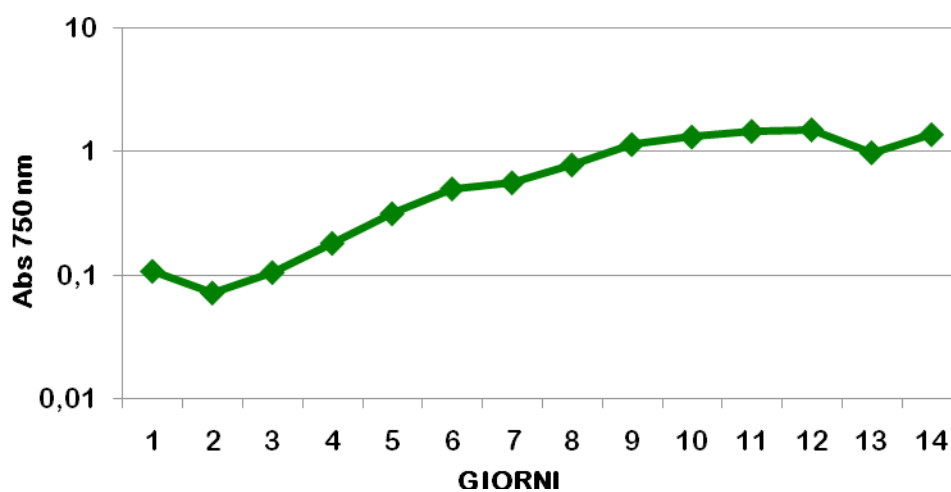


Figura 4.14 Andamento dei valori di torbidità (Abs 750 nm) nella coltura con la popolazione mista nei giorni.

Biomassa (mg/L)	Polisaccaridi (% W/W)	Proteine (% W/W)	TFA (% W/W)	ASHES (% W/W)
963 ± 50	49,6 ± 2,7	39,2 ± 3,2	2,4 ± 0,2	4,4 ± 1,2

Tabella 4.3 Caratterizzazione della biomassa della popolazione mista

La caratterizzazione della biomassa della popolazione mista effettuata al termine dell'esperimento (Tabella 4.3) mostra come i polisaccaridi rappresentino i composti organici prodotti in maggiore quantità e in percentuale simile a quella della monocultura di *Scenedesmus* sp. Al contrario la percentuale di proteine nell'ultimo giorno dell'esperimento risulta molto alta rispetto alla monocultura di *Scenedesmus* sp.; essendo la coltura della popolazione mista in fase stazionaria avanzata e quindi in una condizione di stress da nutrienti da maggior tempo dovremmo aspettarci un valore di proteine in percentuale minore.

Sono state effettuate le analisi dei nutrienti ad intervalli durante tutta la durata dell'esperimento. Nel grafico in Figura 4.15 sono riportati i valori di fosforo espresso come P-PO₄. Si può osservare che nel giorno dell'inoculo la concentrazione di fosfati presenta valori di 1,7 mg/L di P-PO₄; dopo 3 giorni si ha un abbattimento dei fosfati del 50% e questi vengono completamente rimossi in 7 giorni.

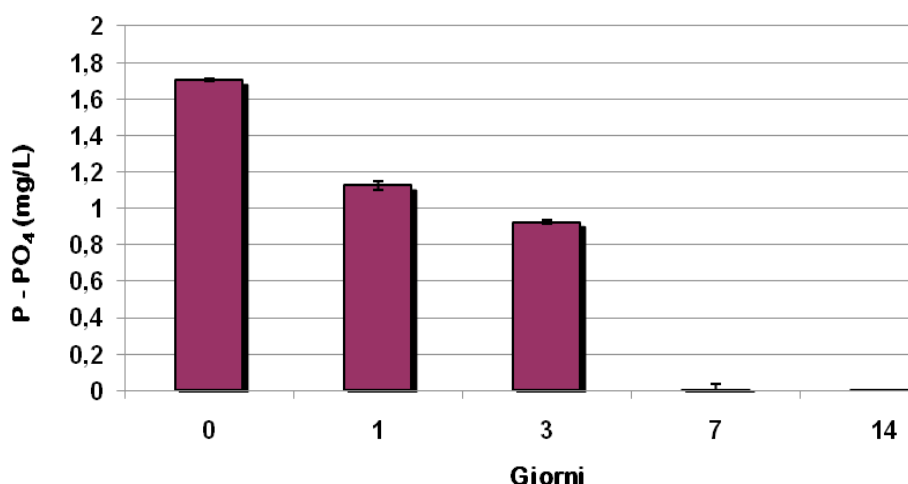


Figura 4.15 Valori di fosfati espressi in P-PO₄ mg/L nei giorni.

L'analisi dei composti azotati mostra che l'azoto ammoniacale, in Figura 4.16, è la componente prevalente nell'acqua in uscita dall'effluente primario, con valori di 23 mg/L N-NH₃⁺, mentre per i nitrati e nitriti si sono ottenuti valori notevolmente

inferiori, rispettivamente di 0,6 e 0,1 mg/L e per questo non sono stati tenuti in considerazione nella discussione dei dati. Dopo tre giorni la concentrazione di azoto ammoniacale nel *medium* viene abbattuta del 40% e al settimo giorno osserviamo la rimozione totale di ammonio nel *medium*.

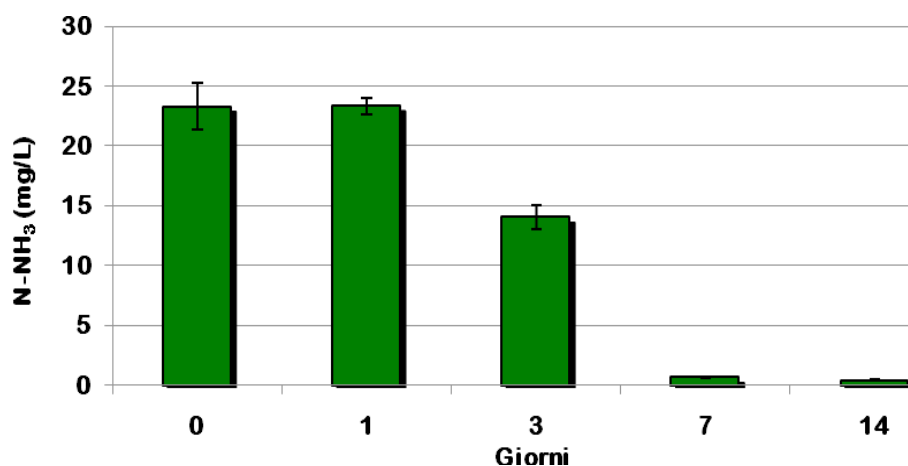
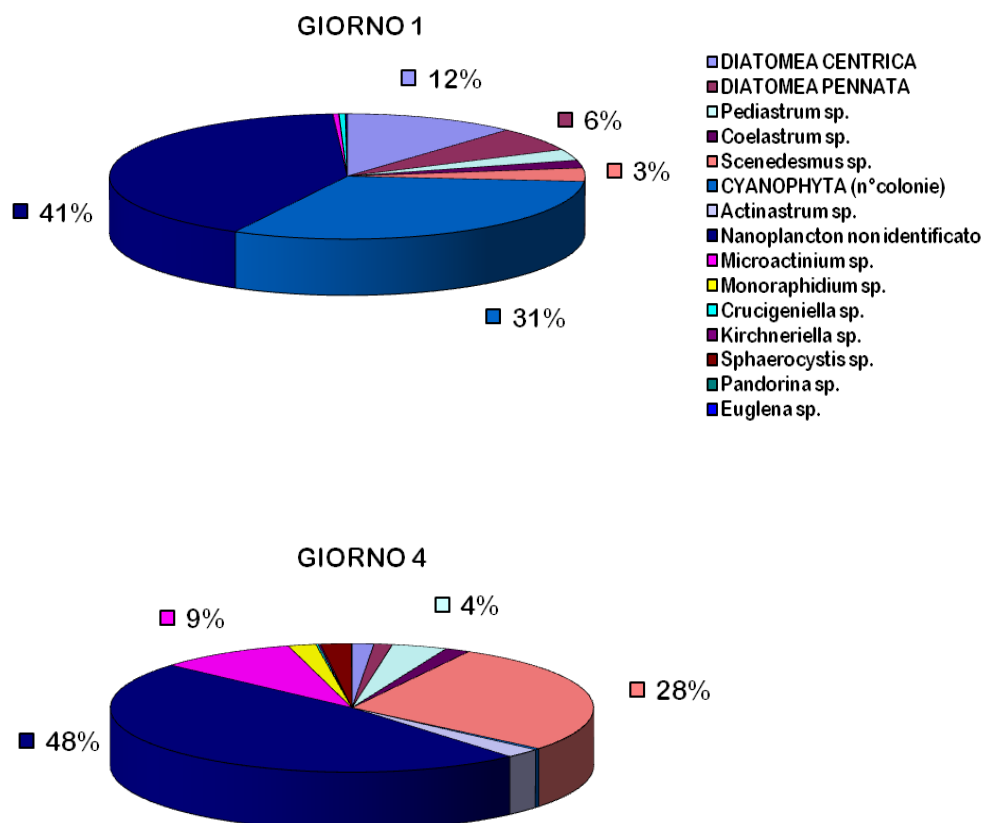


Figura 4.16 Valori di azoto ammoniacale espresso in N-NH₃⁺ mg/L nei giorni.

La composizione delle specie e la biomassa totale della comunità fitoplanctonica dipendono da un'ampia relazione tra la comunità e il resto della catena trofica, per avere una stima delle microalghe presenti nella coltura e come esse si succedono nel tempo, si è proceduto con il conteggio cellulare al microscopio ottico. Lo scopo del conteggio è di valutare se in una popolazione mista naturale *Scenedesmus* sp. riesce ad essere più competitiva rispetto alle altre microalghe e di verificare se è resistente anche alla predazione da parte dei *grazers*, aspetti importanti per un'applicazione di quest'alga in larga scala negli *open ponds*.

Nel conteggio sono stati presi in considerazione 5 raggruppamenti: diatomee centriche, diatomee pennate, Cyanophyta (numero colonie), alghe verdi (Chlorophyceae) e nanoplancton non identificato (comprendendo in quest'ultimo tutte le microalghe sferiche con un diametro che va dai 2 ai 20 µm). All'interno dei raggruppamenti sono stati individuati 12 generi. Il conteggio è stato effettuato a partire dal giorno 1 ed è proseguito fino al termine dell'esperimento. Nei grafici in Figura 4.17 sono riportati i valori percentuali del numero di cellule dei principali generi e gruppi presi in considerazione; nel giorno 1 nella coltura è presente nanoplancton non identificato in percentuale elevata, 41%, seguito da una percentuale considerevole di cianobatteri 31%, e diatomee 18% (12% centriche e

6% pennate), la percentuale di abbondanza dell'alga *Scenedesmus* sp. è del 3%. Dal giorno 4 fino al giorno 14 si osserva un graduale aumento di *Scenedesmus* sp., il valore del nanoplankton non identificato aumenta con una percentuale massima, misurata il giorno 7, per poi diminuire e raggiungere valori del 37% al termine dell'esperimento. I cianobatteri dopo pochi giorni diminuiscono in numero, solo nell'ultima fase dell'esperimento sembrano essere nuovamente presenti raggiungendo valori del 3%. Una presenza elevata di cianobatteri e diatomee al giorno 1 può essere spiegata dal fatto che la coltura si trovava in una condizione ombreggiamento al momento del prelievo e quindi le Chlorophyceae che utilizzano la luce in maniera più efficiente sono in percentuale minore. Dopo pochi giorni di esposizione della coltura a condizioni di illuminazione costante le Chlorophyceae diventano preponderanti con una presenza di *Scenedesmus* sp. che aumenta giornalmente fino al termine dell'esperimento.



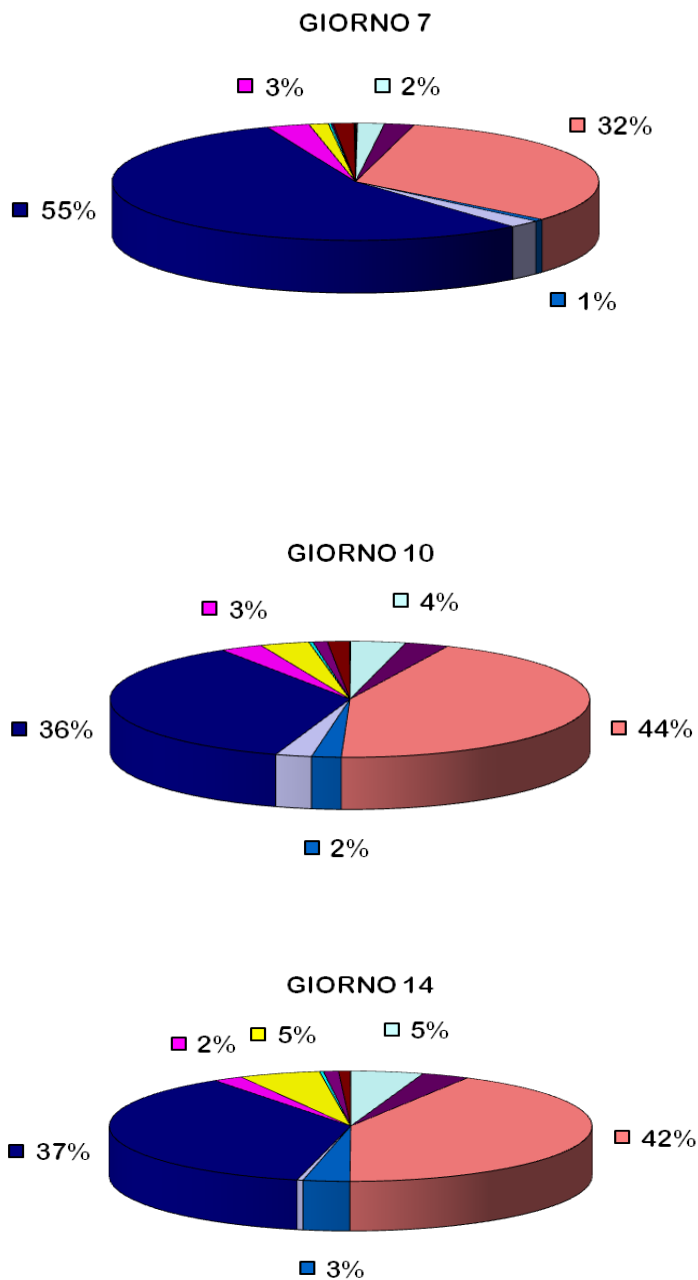


Figura 4.17 Grafici rappresentanti il numero di cellule in percentuale dei generi e gruppi presi in considerazione nel conteggio della popolazione naturale nei giorni.

Il conteggio cellulare nell'ultimo giorno dell'esperimento mostra come *Scenedesmus* sp. sia la microalga che ha prevalso nella comunità naturale, tuttavia una percentuale notevole di nanoplancton non identificato risulta essere presente fino al termine dell'esperimento. Al fine di valutare quanto quest'ultimo gruppo incide sulla biomassa finale è stata effettuata una stima del biovolume, infatti non è

detto che a una densità cellulare elevata corrisponda una biomassa elevata, nel caso della presenza di cellule piccole. Il calcolo della biomassa relativa alle specie numericamente più abbondanti nell'ultimo giorno dell'esperimento è mostrato nel grafico in Figura 4.18. Si osserva come il biovolume medio di *Scenedesmus* sp., moltiplicato per il numero di cellule presenti, raggiunge valori del 53% ben più elevati di quelli relativi alla porzione di nanoplancton non identificato. È stata inoltre effettuata una stima di altri due generi appartenenti alla classe delle Chlorophyceae, *Monoraphidium* sp. ed *Actinastrum* sp., che nell'ultimo giorno rappresentavano il 10% delle cellule presenti e si è visto che non hanno una rilevanza considerevole per quanto riguarda la biomassa totale della coltura.

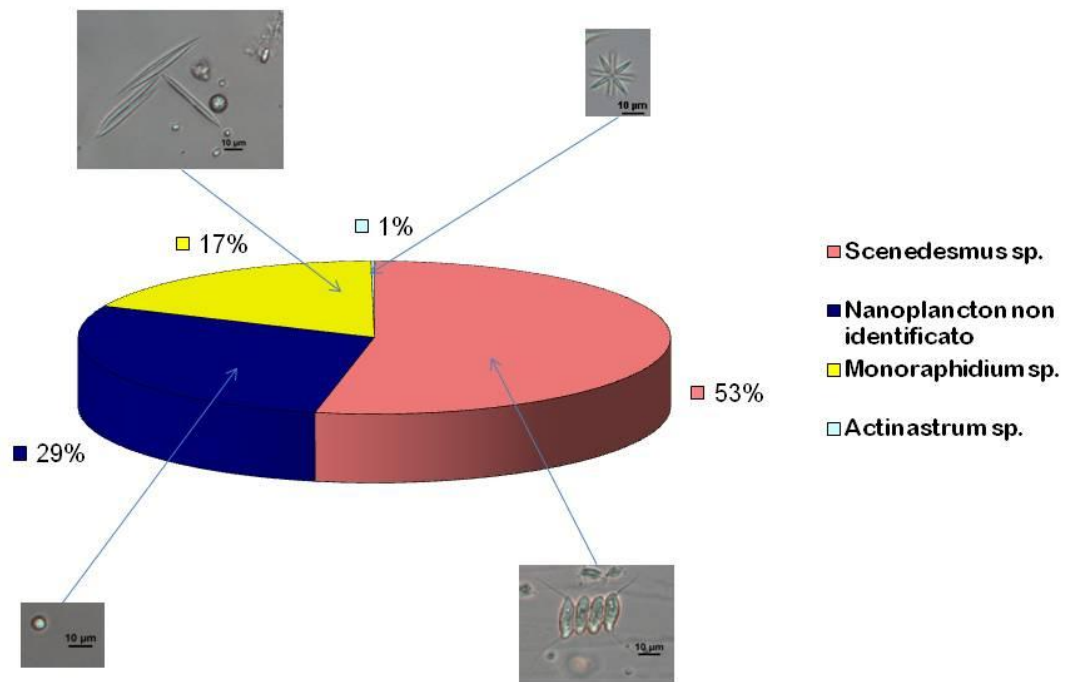


Figura 4.18 Valori percentuali di biovolume per numero di cellule dei generi e gruppi presi in considerazione nella popolazione naturale nell'ultimo giorno dell'esperimento.

Giornalmente sono stati prelevati campioni dalla coltura con la popolazione mista e sono state effettuate le *induction curve* per determinare i parametri di *quenching* fotochimico e non fotochimico. I valori di Yield massimo (F_v/F_m) del giorno 7 risultano essere simili a quelli ottenuti con *Scenedesmus* sp. in semicontinuo nello

stesso periodo e che corrisponde al giorno 1 dei grafici mostrati nel capitolo precedente (Figura 4.19). Dal giorno 7 fino al termine dell'esperimento si verifica un calo dello Yield massimo poiché la coltura si trova in una fase stazionaria avanzata e lo stato fisiologico delle microalghe tende a peggiorare.

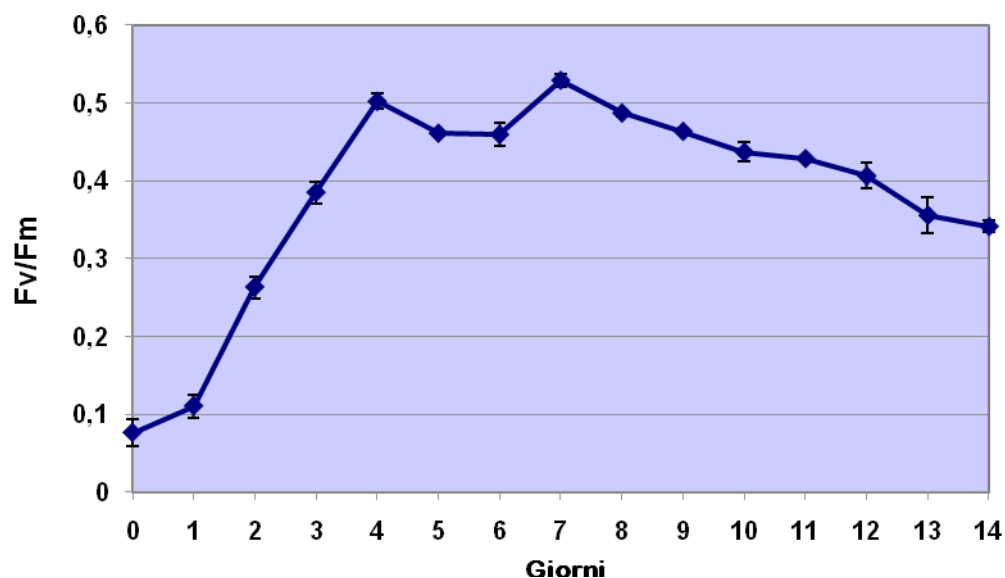


Figura 4.19 Valori di Yield massimo (F_v/F_m) della popolazione naturale nei giorni.

I valori di rendimento quantico effettivo o Yield effettivo (Φ_{PSII}) riportati nel grafico in Figura 4.20 evidenziano che al giorno 5 si ha il valore massimo di Yield effettivo e poi si ha un calo fino al termine dell'esperimento; il calo di nutrienti nel tempo che si verifica nel *medium*, in particolare di azoto, influenza diversi meccanismi fisiologici che portano le microalghe ad avere un minor contenuto di clorofilla e quindi un calo dell'efficienza fotosintetica. Questa informazione è utile in quanto mostra il momento in cui le alghe raggiungono la loro massima efficienza fotosintetica e ci fornisce un aspetto fisiologico aggiuntivo che non si evince dai valori di torbidità ottenuti.

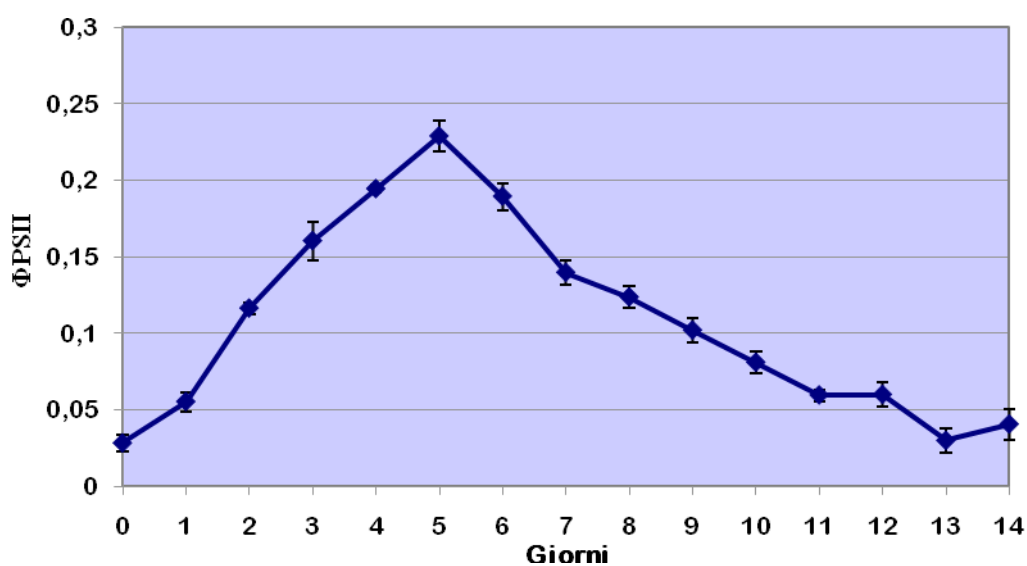


Figura 4.20 Valori di Yield effettivo (Φ_{PSII}) della popolazione naturale nei giorni.

I valori di *quenching* fotochimico qP riportati nel grafico in Figura 4.21 fanno vedere come a partire dal giorno dell'inoculo il qP aumenta rapidamente fino al giorno 3, in cui si raggiunge il valore massimo. È interessante notare come i valori di Yield effettivo (Φ_{PSII}) che misurano l'energia luminosa assorbita dai centri di reazione del PSII subiscono un calo dopo il giorno 5 mentre già dal giorno 3 si ha una diminuzione del numero dei centri di reazione aperti del PSII. Questo può essere messo in relazione con il calo di nutrienti, azoto e fosforo, nel *medium* dopo il giorno 3. Inoltre si nota dal giorno 7 che la coltura si è fotoacclimatata su valori di qP di 0,3-0,5 allo stesso modo per la coltura di *Scenedesmus* sp. in semicontinuo.

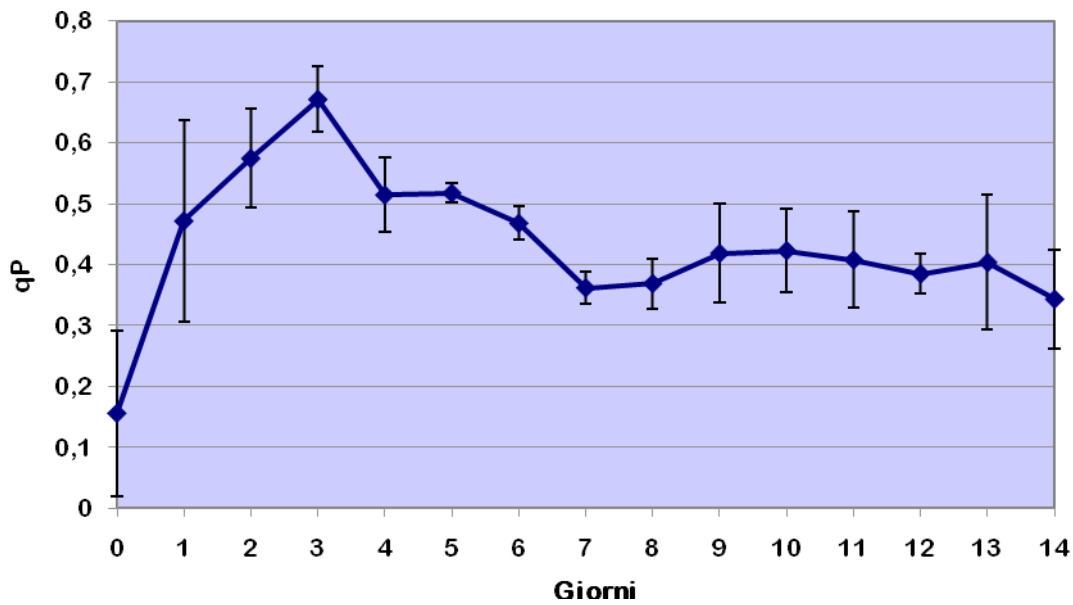


Figura 4.21 Valori di *quenching* fotochimico (qP) della popolazione naturale nei giorni.

I valori di *quenching* non fotochimico in particolare del valore di NPQ sono illustrati nel grafico in Figura 4.22 Si può osservare un graduale aumento di NPQ dal giorno dell'inoculo fino al termine dell'esperimento a dimostrazione del fatto che la coltura si trova in una condizione di limitazione da nutrienti poiché si tratta di una coltura *batch*.

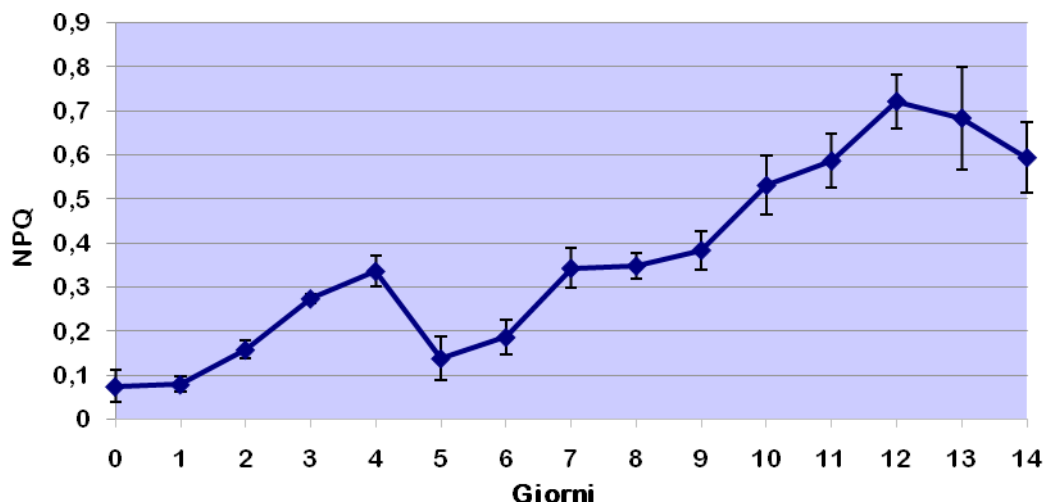


Figura 4.22 Valori di *quenching* non fotochimico (NPQ) della popolazione naturale nei giorni.

Conclusioni

Effettuando colture di *Scenedesmus* sp. in semicontinuo e adottando tempi di residenza idraulica diversi, si è visto che nella coltura con tempo di residenza idraulica minore, ovvero di 1,5 giorni, si ha una concentrazione di biomassa inferiore a quella che si ottiene nelle colture con tempi di residenza idraulica di 3 e 5 giorni. Le misure di produttività, effettuate in una tesi complementare ed espresse come solidi volatili totali per litro e per giorno (Sedda I., tesi di laurea magistrale in Scienze per l'ambiente), indicano che in tutti e tre i sistemi di coltura, nel giro di pochi giorni, si raggiunge una fase stazionaria con valori uguali di produzione di biomassa pari $0,14 \pm 0,01$ g/L/day. Pertanto, in previsione della produzione di biomassa algale nessuna delle 3 condizioni risulta particolarmente sfavorita.

L'altro aspetto che si deve prendere in considerazione e che rappresentava uno degli scopi della presente tesi, è quello relativo alla composizione della biomassa ottenuta nelle diverse condizioni di coltura in termini di polisaccaridi, acidi grassi totali e proteine. I risultati hanno evidenziato che la condizione di diluizione HRT 1,5 determina valori di produttività di polisaccaridi e acidi grassi totali (g/L/day) inferiori rispetto a quelli ottenuti con tempi di residenza idraulica di 3 e 5 giorni. La produttività dei polisaccaridi (g/L/day) risulta pertanto più elevata all'aumentare dei tempi di residenza idraulica mentre per le proteine l'andamento è inverso.

La diversa composizione cellulare delle alghe, osservata in seguito alla coltivazione con tempi di ritenzione idraulica diversi, può essere attribuita alla diversa concentrazione di nutrienti aggiunti per cui, come già evidenziato nella sezione Risultati, la maggiore diluizione della coltura corrisponde a un maggiore apporto di nutrienti, soprattutto azotati, e questo determina un aumento di biosintesi di proteine anziché di prodotti di riserva come polisaccaridi o lipidi.

Un'altra spiegazione può essere dedotta dai valori riportati, relativi all'efficienza fotosintetica. I valori di yield massimo (al buio) sono uguali per tutte le colture e non evidenziano un danno dell'apparato fotosintetico, tuttavia, per quanto riguarda lo yield effettivo (alla luce) si possono osservare valori nettamente inferiori per le alghe nella condizione HRT 1,5 rispetto a quelle coltivate nelle altre due condizioni. La diminuzione dello yield è un indice di fotoinibizione, probabilmente per una

maggiore esposizione delle cellule alla luce, dovuta alla maggiore diluizione della coltura con conseguente minore auto-ombreggiamento.

Allo stesso modo, i valori ottenuti con le curve P/E mostrano che, a fronte di valori ottimali di intensità luminosa (E_k) simili per le tre condizioni, le alghe maggiormente diluite sono caratterizzate da valori di trasporto elettronico fotosintetico (ETR) più bassi; anche l'efficienza di utilizzo della luce (alfa) è minore, probabilmente per il fenomeno di fotoinibizione.

Una delle risposte delle cellule alla fotoinibizione è basata sulla dispersione dell'energia come calore da parte di pigmenti fotoprotettivi; l'aumento del valore NPQ è dovuto a questa risposta ed è visibile in tutte le colture, in particolare dal giorno 1 al giorno 3; tuttavia per le alghe nelle condizioni HRT 3 e HRT 5 l'aumento della risposta alla fotoinibizione determina un aumento di ETR mentre per la condizione HRT 1,5 la risposta non sembra sufficiente a migliorare l'efficienza della fotosintesi. E' presumibile pensare che anche questo aspetto fisiologico, ovvero la minore fotosintesi causata dalla foto inibizione, contribuisca a determinare una minore produzione di polisaccaridi.

Ai fini di un utilizzo della biomassa di *Scenedesmus* sp. per diversi tipi di impiego è ipotizzabile che si possa adottare un tempo di residenza intermedio, ad es. HRT 3, al fine di ottenere la massima produzione di proteine nel minor tempo possibile. Allo stesso modo se si ipotizza un utilizzo di *Scenedesmus* sp. per la produzione di polisaccaridi è ragionevole utilizzare un tempo di residenza maggiore come HRT 5. Questi due tempi di ritenzione sono considerati preferibili in quanto, anche ai fini della depurazione del refluo, si è osservato che la condizione HRT 1,5 determina una scarsa rimozione di ammonio (Sedda I., tesi di laurea magistrale in Scienze per l'ambiente).

L'esperimento basato sulla crescita di una popolazione naturale in coltura *batch* è servito a capire se, in un sistema ad *open ponds*, non fosse più conveniente effettuare la fitodepurazione con alghe in grado di crescere autonomamente nel refluo utilizzato anziché con una monocoltura; inoltre si voleva capire quali dinamiche di popolazione si instaurano tra le alghe competitive. E' emerso che la velocità di crescita e la densità di biomassa raggiunta dalla popolazione mista sono di poco inferiori a quelle della monocoltura di *Scenedesmus* sp. La popolazione è in grado di rimuovere i nutrienti presenti nell'effluente primario dopo 7 giorni, in un

tempo maggiore rispetto a quello impiegato da *Scenedesmus* sp. che rimuove tutti i nutrienti in 3 giorni (Sedda I., tesi di laurea magistrale in Scienze per l'ambiente). La biomassa è inoltre caratterizzata da una percentuale di proteine più elevata rispetto a quelle misurate nelle diverse condizioni di crescita adottate per *Scenedesmus* sp.

Questo esperimento ha evidenziato che, sebbene *Scenedesmus* sp. fosse presente in scarsa quantità all'inizio dell'esperimento, la sua concentrazione aumenta nel tempo dimostrando così di essere maggiormente competitiva rispetto alle altre microalghe presenti nella coltura e di resistere a *grazers* e patogeni. La misura del biovolume di tutti gli organismi presenti nel terreno alla fine dell'esperimento ha permesso di verificare che, anche se *Scenedesmus* sp. è una specie di piccole dimensioni, la maggior parte della biomassa finale appartiene a questo organismo.

Tutti gli aspetti osservati risultano interessanti per un'applicazione di *Scenedesmus* sp. su larga scala nei sistemi all'aperto per ottenere una depurazione del refluo e allo stesso tempo una biomassa algale per fini energetici o commerciali.

I risultati ottenuti in questa tesi sono da considerarsi preliminari nei confronti di una successiva applicazione in sistemi ad *open ponds*, in quanto sono stati condotti su piccoli volumi e in laboratorio; si deve considerare che i risultati che si conseguirebbero da esperimenti in vasche all'aperto potrebbero essere differenti, se non discordanti, poiché entrano in gioco altre variabili come ad esempio la temperatura. Questo è stato in ogni modo uno studio importante per decidere alcuni aspetti relativi alla conduzione di esperimenti di fitodepurazione su scala più ampia, inoltre ha permesso di comprendere come la biomassa algale si caratterizza nel tempo andando a simulare le condizioni di crescita in un sistema continuo.

Bibliografia

- Baker N.R. e Webber A.N. (1987)** *Interactions between photosystems*. Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology, Volume 13, pp. 1-66
- Barbato F. (2009)** *Tecniche di Coltura di Microalghe*. ENEA/TB04/01/2009 www.enea.it.
- Becker E. Wolfgang (1994)** *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press. pp. 293.
- Ben-Amotz A., Katz A., Avron M. (1982)** *Accumulation of beta-carotene in halotolerant algae: purification and characterization of beta-carotene-rich globules from Dunaliella bardawil (Chlorophyceae)*. Journal of Phycology Volume 18, pp. 529–537.
- Borowitzka Michael A., Huisman John M., Osborn A. (1991)** *Culture of the astaxanthin-producing green alga Haematococcus pluvialis 1. Effects of nutrients on growth and cell type*. Journal of Applied Phycology. Volume 3, No. 4, pp. 295-304.
- Boussiba S., Fan L., e Vonshak A. (1992)**. *Enhancement and Determination of Astaxanthin Accumulation in Green Alga Haematococcus pluvialis*. Methods in Enzymology. Volume 213, pp. 386-391.
- Brennan L. e Owende P. (2010)**. *Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Volume 14, pp. 557-577.
- Callieri C. e Stockner J.G. (2002)**. *Freshwater autotrophic picoplankton: a review*. Journal of Limnology. Volume 61, pp. 1-14.
- Carr N.G. e Whitton B.A. (1982)**. *The Biology of cyanobacteria*. University of California Press. pp. 688.
- Cavalier-Smith T. (2002)**. *Chloroplast Evolution: Secondary Symbiogenesis and Multiple Losses*. Current Biology. Volume 12, pp. 62-64.
- Cheng L., Zhang L., Chen H., Gao C. (2006)**. *Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor*. Separation Purification Technology. Volume 50, pp. 324-329.

Chisti Y. (2008). *Biodiesel from microalgae beats bioethanol.* Trends in biotechnology. Volume 26, pp. 126.

Collier J.L. e Grossman A.R. (1992). *Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same.* Journal of Bacteriology. Volume 174, No. 14, pp. 4718-4726.

Daggett D.L., Hendricks R. C., Walther R. (2007). *Alternate Fuels for use in Commercial Aircraft.* The Boeing Company.

Davison I.R. (1991). *Environmental effects on algal photosynthesis: temperature.* Journal of Applied Phycology. Volume 27, pp. 2-8.

De La Noie J. , Lalibert G., Proulx D. (1992) *Algae and waste water.* Journal of Applied Phycology Volume 4, pp. 247-254.

Di Termini I., A. Prassone, C. Cattaneo, M. Rovatti. (2011). *On the nitrogen and phosphorous removal in algal photobioreactors.* Ecological Engineering. Volume 37, No.6, pp. 976-980.

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. Volume 28, pp. 350-356.

Fauchot J., Gosselin M., Levasseur M., Mostajir B., Belzile C., Demers S., Roy S., Villegas P.Z. (2000). *Influence of UV-B radiation on nitrogen utilization by a natural assemblage of phytoplankton.* Journal of Phycology. Volume 36, No. 3, pp. 484-496.

Figueroa F.L., Conde-Álvarez R., Gómez I. (2003). *Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions.* Photosynthesis Research. Volume 75, No. 3, pp. 259-275.

Fryer M. J., Andrews J. R., Oxborough K., Blowers D. A., Baker N. R. (1998). *Relationship between CO₂ Assimilation, Photosynthetic Electron Transport, and Active O₂ Metabolism in Leaves of Maize in the Field during Periods of Low Temperature.* Plant Physiology. Volume 116, No. 2, pp. 571-580.

- Gaffron H. e Rubin J. (1942).** *Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae.* The journal of general physiology. Volume 26, No. 2, pp. 219-240.
- Gao K., Wu Y., Li G., Wu H., Villafan V. E., Helbling E. W. (2007).** *Solar UV Radiation Drives CO₂ Fixation in Marine Phytoplankton: A Double-Edged Sword.* Plant Physiology. Volume 144, pp. 54-59.
- García M. (2008).** *A comparison of bacterial removal efficiencies in constructed wetlands and algae-based systems.* Ecological Engineering. Volume 32, No. 3, pp. 238-243.
- Godos I., Blanco S., García-Encina Pedro A., Becares E., Muñoz R. (2009).** *Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggyer wastewaters at high loading rates.* Bioresource Technology. Volume 100, No. 19, pp. 4332-4339.
- Goldman J.C. (1980).** *Physiological aspects in algal mass cultures.* In: Algal biomass: production and use. (eds. Shelef G., Soeder Carl J.) pp. 343-353. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Grobbelaar J.U. (2009).** *Factors governing algal growth in photobioreactors: the “open” versus “closed” debate.* Journal of Applied Phycology. Volume 21, No. 5, pp. 489-492.
- Grobbelaar J.U. (2010).** *Microalgal biomass production: challenges and realities.* Photosynthesis Research. Volume 106, No. 1-2, pp. 135-144.
- Grobbelaar J.U. e Kurano N. (2003).** *Use of photoacclimation in the design of novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation.* Journal of Applied Phycology. Volume 15, No. 2-3, pp. 121-126.
- Hélène C. e Janelle M. Curtis (1998).** *Zooplankton community size structure and taxonomic composition affects size-selective grazing in natural communities.* Oecologia. Volume 118, No. 3, pp. 306-315.
- Hosikian A., Lim S., Halim R., Danquah M.K. (2010).** *Chlophyll extraction from microalgae: A review on the process engineering aspects.* International Journal of Chemical Engineering. Vol. 2010, 11 pp.
- Jeon Y.C., Cho C.W., Yun Y.S. (2005).** *Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality.* Biochemical engineering journal. Volume 27, pp. 127-131.

John D.M., Whitton Brian A., Brook Alan J. (2002). The freshwater algal flora of the British Isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae. Volume 1 Cambridge University Press pp. 702.

Juneau P., Green B.R., Harrison P.J. (2005). *Simulation of Pulse-Amplitude-Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects.* Photosynthetica. Volume 43, No. 1, pp. 75-83.

Kaplan D. Richmond A.E., Dubinsky Z. (1996). *Algal nutrition.* In: Handbook of microalgal mass culture (ed. Richmond A.) pp.147-198 CRC press, Boca Raton.

Kim M.K., Park J.W., Park C.S., Kim S.J., Jeune K.H., Chang M.U., Acreman J. (2007). *Enhanced production of Scenedesmus spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater.* Bioresource Technology, Volume 98, No. 11, pp. 2220-2228.

Lee R.E. (1999). Phycology. Cambridge University Press. 614 pp.

Lee Yuan-Kun (2001). *Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential.* Journal of Applied Phycology. Volume 13, No. 4, pp. 307-315.

Liu Bei-Hui e Lee Yuan-Kun (2000). *Secondary carotenoids formation by the green alga Chlorococcum sp..* Journal of Applied Phycology. Volume 12, No. 3-5, pp. 301-307.

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

Masotti L. (1987). Depurazione delle acque. Calderini.

Mata Teresa M., Martins Antonio A., Caetano Nidia. S. (2010). *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review.* Renewable and Sustainable Energy Reviews. Volume 14, pp. 217-232.

Maxwell K., Johnson Giles N. (2000). *Chlorophyll fluorescence – A practical guide.* Journal of Experimental Botany Volume 51 No. 345, pp. 659-668.

McHugh D.J. (2003). *A guide to the seaweed industry.* FAO Fisheries Technical Paper pp.102-105.

Mirón A.S., Gomez A.C., Camacho F.G. (2003). *Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae.* Progress in industrial microbiology. Volume 35, pp. 249-270.

- Molina G.E., Fernández J., Ación Fernández F.G., Chisti Y. (2001).** *Tubular photobioreactor design for algal cultures.* Journal of Biotechnology. Volume 92, pp. 113-131.
- Morabito G. (1997).** *Dinamica stagionale delle comunità algali e analisi microscopica del fitoplancton.* Corso di Formazione Criteri e metodologie per lo studio ed il controllo delle alghe in acque destinate alla potabilizzazione. AGAC - Reggio Emilia.
- Mulbry W., Kondrad S., Buyer J., Luthria D.L. (2009).** *Optimization of an oil extraction process for algae from the treatment of manure effluent ;* Journal of the American Oil Chemists' Society. Volume 86, pp. 909-915.
- Mutanda T., Karthikeyan S., Bux F. (2011).** *The Utilization of Post-chlorinated Municipal Domestic Wastewater for Biomass and Lipid Production by Chlorella spp. Under Batch Conditions.* Applied Biochemical Biotechnology. Volume 164, pp.1126-1138.
- 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. Volume 9, pp. 125-136.
- Nishida I. e Murata N. (1996).** *Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The Crucial Contribution of Membrane Lipids.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. Volume 47, pp. 541-568.
- Park J.B.K., Craggs R.J. e Shilton A.N. (2011).** *Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production.* Bioresource Technology. Volume 102, pp. 35-42.
- Park J.B.K., Craggs, R.J. (2010).** *Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition.* Water Science and Technology. Volume 61, pp. 633-639.
- Pearson H. (2003).** *Microbial interactions in facultative and maturation ponds.* The Handbook of Water and Wastewater Microbiology. Volume 27, pp. 449-458.
- Pulz O. (2001).** *Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms.* Applied Microbiology and Biotechnology. Volume 57, pp. 287-293.

Pulz O. (2007). Evaluation of GreenFuel's 3D Matrix Algae Growth Engineering Scale Unit: APS Red Hawk Power Plant, AZ. IGV Institut. Fur Getreideverarbeitung GmbH www.greenfuelonline.com

Pulz O. e Gross W. (2004). *Valuable products from biotechnology of microalgae.* Applied Microbiology Biotechnology. Volume 65, pp. 635-648.

Pupillo P., Cervone F., Cresti M. e Rascio N. (2003). *Biologia Vegetale.* Zanichelli, Bologna. pp. 20-22.

Quick W. P. e Horton P. (1984). *Studies on the induction of Chlorophyll Fluorescence in Barley Protoplasts. I. Factors Affecting the Observation of Oscillations in the Yield of Chlorophyll Fluorescence and the Rate of Oxygen Evolution.* Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences , Volume 220, No. 1220 , pp. 361-370.

Rawat I., Kumar R. Ranjith, Mutanda T., Bux F. (2011). *Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production.* Applied Energy, Volume 88, No. 10, pp. 3411-3424.

Renaud S.M., Thinh L.V., Lambrinidis G. (2002). *Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures.* Aquaculture. Volume 211, pp. 195-214.

Richmond A. (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.* John Wiley & Sons. 566 pp.

Richmond A. e Cahn L. (2000) *Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view.* Journal of Applied Phycology. Volume 12, No. 3-5, pp. 441-451.

Richmond A. e Ning Z. (1999). *Efficient utilisation of high photon irradiance for mass production of photoautotrophic micro-organism.* Journal of Applied Phycology. Volume 11 pp. 123-127.

Ritchie Raymond J. (2006). *Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents.* Photosynthesis Research. Volume 89, No. 1, pp. 27-41.

Rittmann Bruce E. (2008). *Opportunities for Renewable Bioenergy Using Microorganisms.* Biotechnology and Bioengineering. Volume 100, No. 2, pp. 203-212.

- Roháček K. (2002).** *Chlorophyll Fluorescence Parameters: The Definitions, Photosynthetic Meaning, and Mutual Relationships.* *Photosynthetica.* Volume 40, No. 1, pp. 13-29.
- Round, F.E. 1981.** *The ecology of algae.* Cambridge. 664 pp.
- Schenk P.M., Hall S.R.T., Stephens E., Marx U.C., Mussnug J.H., Posten C., Kruse O., Hankamer B. (2008).** *Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production.* *Bioenergy Research.* Volume 1, pp. 20-43.
- Scott A. e Bryner M. (2006)** *Alternative fuels : Rolling out next-generation technologies.* *Chemical Week.* pp.17-21.
- Shen Y., Yuan W., Pei Z. J., Wu Q., Mao E. (2009).** *Microalgae Mass Production Methods.* American Society of Agricultural and Biological Engineers. Volume 52, No.4, pp. 1275-1287.
- Sukenik A. and Bennett J. (1987).** *Light-saturated photosynthesis-Limitation by electron transport or carbon fixation?* *Biochimica et Biophysica Acta.* Volume 891, pp.205-215.
- Sun Jun e Liu Dongyan (2003).** *Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton.* *Journal of Plankton Research.* Volume 25, No. 11, pp. 1331-1346.
- Thompson G.A. Jr (1996).** *Lipids and membrane function in green algae.* *Biochemica et Biophysica Acta.* Volume 1302, pp. 17-45.
- Tilman D., Kilham Susan S., Kilham P. (1982).** *Phytoplankton Community Ecology: The Role of Limiting Nutrients.* *Annual Review of Ecology and Systematics.* Volume 13, pp. 349-372.
- Tjahjono A.E., Hayama Y., Kakizono T., Terada Y., Nishio N. e Nagai S. (1994).** *Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga Haematococcus pluvialis at elevated temperatures.* *Biotechnology Letters.* Volume 16, No. 2, pp. 133-138.
- Trainor F.R. e Burg C.A. (1988).** *The role of bristles in the distribution of a Scenedesmus.* *British Phycological Journal.* Volume 23, pp. 135-141.
- Tredici M.R. (2007).** *Mass Production of Microalgae: Photobioreactors.* In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (ed Richmond A.), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.

- Um B.H., Kim Y.S. (2009).** *Review: a chance for Korea to advance algal-biodiesel.* Journal of Industrial and Engineering Chemistry. Volume 15, pp. 1-7.
- Vadrucci M.R., Cabrini M., Basset A. (2007).** *Biovolume determination of phytoplankton guilds in transitional water ecosystems of Mediterranean Ecoregion.* Transitional Waters Bulletin. Volume 1 No. 2, pp. 83-102.
- Verma N.M., Mehrotra S., Shukla A. e Mishra B.N. (2010).** *Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion.* African Journal of Biotechnology. Volume 9, pp. 1402-1411.
- Walker D. A. (2009)** Biofuels, facts, fantasy, and feasibility. Journal of Applied Phycology Vol.21 pp. 509–517
- Wang B., Li Y., Wu N. e Lan C.Q. (2008).** *CO₂ bio-mitigation using microalgae.* Applied Microbiology and Biotechnology. Volume 79, No. 5, pp. 707-718.
- Wetzel R.G. (1983).** Limnology (2nd Edition; Complete Revision). Saunders College Publishing. 858 pp.
- White S., Anandraj A., Bux F. (2011).** *PAM fluorimetry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitor cellular neutral lipids.* Bioresource Technology Volume 102, pp. 1675-1682.
- Xue C., Qianru Y.G., Weifeng T., Iqbal H., Wei N.C., Raymond L. (2011).** *Lumostatic strategy for microalgae cultivation utilizing image analysis and chlorophyll a content as design parameters.* Bioresource Technology. Volume 102, No. 10, pp. 6005-6012.
- Zhekisheva M., Boussiba S., Khozin-Goldberg I., Zarka A., Cohen Z. (2002).** *Accumulation of oleic acid in Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters.* Journal of Phycology. Volume 38, No. 2, pp. 325-331.