



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale
in Scienze Ambientali

Tesi di Laurea

Ottimizzazione di un processo semi-continuo per
il trattamento di digestato vinicolo utilizzando un
consorzio *Chlorella vulgaris*-batteri con
produzione di prodotti secondari ad alto valore
aggiunto

Relatrice

Prof.ssa Cristina Cavinato

Laureanda

Maria Vittoria Castori

Matricola 877652

Anno Accademico

2019 / 2020

Abstract

Le microalghe hanno ricevuto molta attenzione negli ultimi anni come fonte di energia rinnovabile (biodiesel di terza generazione), inoltre possono essere coltivate su acque reflue operando una simultanea depurazione (utilizzo di azoto e fosforo). Il presente lavoro di tesi ha valutato la possibilità di coltivare un consorzio *Chlorella vulgaris*-batteri in un sistema semi-continuo alimentato con la frazione liquida del digestato ottenuto dal processo di digestione anaerobica di fango e feccia di vinificazione.

Sono stati effettuati due test, uno applicando un tempo di ritenzione idraulica (HRT) di 47 giorni (RUN 1) e uno abbassando l'HRT a 10 giorni (RUN 2). Nel corso della sperimentazione è stata valutata la composizione percentuale della biomassa con un focus sulla caratterizzazione della frazione lipidica per la produzione di biodiesel. Nelle condizioni di stato stazionario, la concentrazione di biomassa è risultata di $2.2 \pm 0.13 \text{ g l}^{-1}$ in RUN 1 e $0.94 \pm 0.06 \text{ g l}^{-1}$ in RUN 2 con una percentuale di lipidi del $20.00 \pm 1.68\%$ per RUN 1 e di $15.34 \pm 5.00\%$ per RUN 2.

La caratterizzazione della frazione lipidica ha mostrato che per entrambe le condizioni sperimentali l'olio microalgale è potenzialmente utilizzabile senza necessità di pretrattamenti per la produzione di biodiesel, in quanto la percentuale di acido linolenico risulta essere inferiore al limite di legge del 12% w/w (Standard EN 14213 e Standard EN 14214).

Indice

1. Introduzione.....	6
1.1 Utilizzo delle microalghe per il recupero di prodotti secondari ad alto valore aggiunto.....	6
1.1.1 Definizione delle condizioni di coltura microalgale.....	7
1.1.2 Utilizzo delle microalghe per la fitodepurazione.....	9
1.1.3 Meccanismi di rimozione dei nutrienti.....	10
1.1.4 Tipologie di processo e reattori.....	12
1.1.5 Sistemi di recupero della biomassa microalgale.....	15
1.1.6 <i>Chlorella vulgaris</i>	16
1.1.7 Stato dell'arte del trattamento di digestato con microalghe.....	17
1.1.8 Biodiesel di terza generazione.....	23
1.2 Digestato anaerobico da trattamento di scarti di lavorazione del vino.....	28
1.2.1 Processo produttivo del vino.....	28
1.2.2 Scarti di lavorazione del vino.....	29
1.2.3 Trattamento acque reflue di cantina.....	30
1.2.4 Digestione anaerobica.....	31
1.2.5 Digestato.....	33
2. Scopo.....	34
3. Materiali e metodi.....	35
3.1 Monitoraggio e caratterizzazione della biomassa.....	35
3.2 Digestione anaerobica della feccia vinicola bianca e rossa e caratterizzazione del digestato.....	38
3.3 Disegno Sperimentale.....	39
3.3.1 Coltivazione del consorzio microalghe-batteri su lungo periodo (RUN 1 con HRT = 47 giorni)	
3.3.2 Coltivazione del consorzio microalghe-batteri su breve periodo (RUN 2 con HRT = 10 giorni)	
3.4 Caratterizzazione dell'effluente.....	40

4. Risultati e discussione.....	42
4.1 Crescita microalgale e produzione biomassa.....	42
4.1.1 Risultati per RUN 1.....	42
4.1.2 Risultati per RUN 2.....	44
4.2 Rimozione nutrienti e fitodepurazione.....	46
4.3 Caratterizzazione della biomassa.....	50
4.3.1 Proteine.....	50
4.3.2 Amido.....	53
4.3.3 Lipidi.....	53
4.3.4 Clorofille a e b e carotenoidi.....	56
4.4 Caratterizzazione della frazione lipidica.....	58
4.5 Considerazioni sullo sviluppo del processo.....	61
5. Conclusioni.....	64
6. Appendice 1- Materiali e Metodi.....	65
7. Bibliografia.....	71

Tabelle

Tabella 1: Tipologie di digestato anaerobico per coltivazione microalgale e relativi pretrattamenti.....	20
Tabella 2: Stato dell'arte della coltivazione di <i>Chlorella</i> in semi-continuo su digestato.....	22
Tabella 3: Confronto tra le varie fonti di biodiesel.....	23
Tabella 4: Confronto tra il contenuto percentuale di olio in varie specie e generi microalgali.....	24
Tabella 5: Bilancio di massa del processo di vinificazione.....	30
Tabella 6: Caratteristiche fisico-chimiche di un refluo da cantina.....	30
Tabella 7: Concentrazioni delle differenti soluzioni stock per la preparazione del mezzo sintetico BG11....	35
Tabella 8: Caratterizzazione del digestato alimentato al fotobioreattore dopo separazione solido-liquido...	39
Tabella 9: Confronto dei risultati di peso secco e conta cellulare per RUN 1 e RUN 2.....	45
Tabella 10: Caratterizzazione dell'effluente in condizioni di stato pseudo-stazionario per RUN 1 e RUN 2...	46
Tabella 11: Valori di rimozione percentuale dei cationi per RUN 1 e RUN 2.....	46
Tabella 12: Confronto composizione della biomassa del consorzio microalghe-batteri in RUN 1 e RUN 2...	50
Tabella 13: Caratterizzazione della frazione lipidica del consorzio microalghe-batteri in RUN 1 e RUN 2.....	59

Figure

Figura 1: Sistemi a vasca aperta per la coltivazione di microalghe.....	13
Figura 2: Sistemi chiusi per la coltivazione di microalghe.....	14
Figura 3: Fasi e metodi di raccolta delle microalghe.....	16
Figura 4: Fotografia di <i>Chlorella vulgaris</i>	17
Figura 5: Reazione di transesterificazione.....	27
Figura 6: Schema delle fasi del processo di digestione anaerobica.....	32
Figura 7: Camera di conta Bürker.....	36
Figura 8: Analisi del peso secco della coltivazione del consorzio microalghe-batteri in RUN 1.....	42
Figura 9: Analisi di conta cellulare della coltivazione del consorzio microalghe-batteri in RUN 1.....	43
Figura 10: Analisi del peso secco del consorzio microalghe-batteri in RUN 2.....	44
Figura 11: Analisi di conta cellulare del consorzio microalghe-batteri in RUN 2.....	44
Figura 12: Andamento delle concentrazioni di Na ⁺ , NH ₄ ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ e C ²⁺ in RUN 2.....	48
Figura 13: Quantitativo proteine totali (%) nella biomassa in RUN 1 e RUN 2.....	52
Figura 14: Monitoraggio del quantitativo di lipidi totali (%) nella biomassa in RUN 1 e RUN 2.....	55
Figura 15: Quantitativo di clorofilla a, b e carotenoidi totali in RUN 2 confrontata con il peso secco.....	57

Lista Acronimi

ATP (adenosintrifosfato), NADPH (nicotinammide adenina di-nucleotide fosfato), GAP (gliceraldeide 3-fosfato), TAG (triacilgliceroli), FFA (acidi grassi liberi), FAME (esteri metilici degli acidi grassi), DNA (acido desossiribonucleico), RNA (acido ribonucleico), PBR (fotobioreattore), COD (domanda chimica di ossigeno), sCOD (domanda chimica di ossigeno solubile), TS (solidi totali), TVS (solidi volatili totali), OLR (carico organico volumetrico), SGP (produzione specifica di biogas), GPR (velocità di produzione del biogas).

1. Introduzione

L'aumento della popolazione mondiale e lo sviluppo economico hanno portato ad un incremento della richiesta di energia, cibo e sostanze chimiche con la conseguente necessità di sviluppare nuove fonti alternative e sostenibili (Koutra et al., 2018). I combustibili fossili non sono una fonte di energia rinnovabile: la loro combustione comporta l'incremento delle emissioni di gas serra, composti principalmente da CO₂, che svolge un ruolo cruciale nel surriscaldamento globale (Hill et al., 2006). La CO₂, che può persistere in atmosfera da 50 a 200 anni (Van Der Hende et al., 2012), viene considerata il principale gas serra, contribuendo al riscaldamento globale per il 52% (Wilbanks and Fernandez, 2014). In seguito al protocollo di Kyoto del 1997, molte ricerche si sono focalizzate sull'identificazione di nuove strategie di mitigazione dell'anidride carbonica; tra queste, l'uso della fotosintesi svolto dalle microalghe viene considerato un approccio promettente dato che la loro percentuale di carbonio (50%) deriva direttamente dalla fissazione della CO₂ e producendo 100 tonnellate di biomassa si fissano circa 183 tonnellate di CO₂ (Wang et al., 2008).

L'aumento della popolazione ha fatto insorgere anche problematiche relative all'aumento significativo di rifiuti e reflui provenienti dalle attività antropiche (Chuka-ogwude et al., 2020). I reflui provenienti da queste attività possono essere usati come *input* per la coltivazione delle microalghe in quanto contengono azoto e fosforo, nutrienti essenziali per la produzione di biomassa microalgale contenente prodotti secondari ad alto valore aggiunto (i.e. lipidi e pigmenti) (Koller et al., 2014). La coltivazione di microalghe si può quindi inserire come trattamento terziario nei processi di trattamento delle acque reflue (Martin et al., 1985).

I prodotti secondari ad alto valore aggiunto ottenuti dalla biomassa microalgale possono essere utilizzati per la produzione di biocarburanti di terza generazione (biodiesel, biogas e bioetanolo) e biopolimeri e fertilizzanti (Koutra et al., 2018). Il vantaggio nell'uso di oli da microalghe per la produzione di biodiesel risiede nella non competizione con la filiera agro-industriale, quindi la non necessità di terreno fertile per la coltivazione, rese maggiori rispetto alle piante superiori e utilizzo di acque reflue sulle quali effettuano fitodepurazione (Razzak et al., 2013).

1.1 Utilizzo delle microalghe per il recupero di prodotti secondari ad alto valore aggiunto

Le microalghe sono organismi eucarioti unicellulari fotosintetici, ubiquitari in ambiente acquatico e rappresentano la base della catena trofica degli ecosistemi marini e di acqua dolce.

Hanno tre tipologie di metabolismo per produrre ATP: autotrofia, eterotrofia o mixotrofia. L'autotrofia utilizza il carbonio inorganico (CO₂) e l'energia luminosa per produrre carbonio organico ed energia sotto forma di ATP, secondo il processo di fotosintesi. I vantaggi del metabolismo autotrofo sono la possibilità per le microalghe di convertire energia solare, CO₂ e H₂O contribuendo così alla riduzione dell'anidride carbonica presente nell'atmosfera (Carvalho et al. 2006). Le microalghe autotrofe hanno una più alta capacità di fissare la CO₂, circa 10-50 volte superiore rispetto alle piante terrestri (Cheng et al., 2013; Lam et al., 2012).

Il metabolismo eterotrofo utilizza il carbonio organico in assenza di luce per produrre energia utile alla cellula. Questa tipologia di metabolismo in ambito industriale offre la possibilità di incrementare la produttività e la densità cellulare, fattori che tipicamente inibiscono la coltivazione in autotrofia nei grandi impianti. La coltivazione eterotrofa delle microalghe, oltre che fornire elevata produttività in termini di biomassa, fornisce anche elevati contenuti di lipidi nelle cellule (Miao et al. 2006; Li et al. 2007). Lo svantaggio delle coltivazioni in eterotrofia è rappresentato dall'elevato costo delle fonti di carbonio organico; è pertanto necessario trovare fonti più economiche, come ad esempio il glicerolo derivato dai processi di produzione del biodiesel (Liang et al. 2009) o le acque reflue. Utilizzando le acque reflue come fonte di carbonio organico per la crescita delle microalghe è possibile ottenere alti tassi di crescita e un efficiente riciclo dei nutrienti (Perez-Garcia et al., 2011). Altri svantaggi della coltivazione eterotrofa sono rappresentati dai costi elevati, dalla limitata disponibilità di substrati a causa della competizione con altri usi (tra cui quello alimentare), dalla complessità del sistema e dai rischi di contaminazione (Safi et al., 2014).

Il metabolismo mixotrofo utilizza contemporaneamente sia il metabolismo autotrofo che eterotrofo, quindi sia il carbonio inorganico (CO₂) che il carbonio organico (glicerolo, acetato, glucosio etc) per svolgere i processi di fotosintesi e respirazione cellulare con le rispettive produzioni di energia sotto forma di ATP. Alcuni ricercatori ritengono che la coltivazione mixotrofa possa rappresentare una valida soluzione per superare le problematiche relative ai costi di produzione, che al momento sono il principale ostacolo alla commercializzazione delle microalghe (Patel et al., 2019). La mixotrofia rispetto alla condizione eterotrofa offre una migliore *carbon footprint* dovuta al simultaneo sequestro della CO₂ (Zahn et al., 2017). Tra le molteplici specie microalgali, *Chlorella vulgaris* ha mostrato le migliori rese in condizioni di mixotrofia per il trattamento dei reflui (Mallick et al., 2011).

1.1.1 Definizione delle condizioni di coltura microalgale

I principali fattori che determinano la crescita delle microalghe sono: concentrazione e qualità dei nutrienti, concentrazione di anidride carbonica, rifornimento idrico, esposizione alla luce, temperatura (16-27°C), pH

(4-11), salinità (12-40 g l⁻¹), fattori biologici, presenza di composti tossici e metalli pesanti, e le condizioni operative del sistema di coltivazione (Jankowska et al., 2017). L'intensità luminosa è un fattore chiave anche per la sintesi dei lipidi: una irradiazione appropriata può portare a cambiamenti della concentrazione di Mg²⁺ e NADPH nello stroma che determinano il destino di alcuni metaboliti chiave (ad esempio GAP) e ciò può portare all'accumulo di triacilgliceroli (TAG) che sono componenti chiave per la produzione di biodiesel (Lv et al., 2010). I sistemi microalgali possono essere illuminati con la luce del sole, con lampade (ad esempio a LED) o in entrambi i modi. Solitamente le microalghe hanno un limite di saturazione della luce di 6500 lux circa; esposizioni superiori possono causare stress ossidativo. Pertanto, l'eccessiva foto-assimilazione può tradursi in accumulo di lipidi dovuto al meccanismo di difesa che si instaura per evitare danni foto-ossidativi (Shin et al., 2018).

Anche la temperatura rappresenta un fattore limitante per la coltivazione di microalghe sia in sistemi aperti che in sistemi chiusi (Mata et al., 2010). Molte microalghe possono tollerare temperature di 15°C inferiori al loro ottimale, ma superarlo anche solo di 2-4°C può provocare la perdita totale della coltura. Si possono anche verificare problemi legati al surriscaldamento in giornate molto calde soprattutto nei sistemi chiusi, che possono raggiungere al loro interno anche i 55°C; in questi casi è necessario adottare sistemi di raffreddamento, come i refrigeratori evaporativi, per abbassare la temperatura a circa 25-26°C (Moheimani et al., 2005). Per quanto riguarda il pH, la maggior parte delle specie microalgali viene coltivata in un range di 7-9, con valori ottimali compresi tra 8.2-8.7 (Faried et al., 2017). Un altro importante parametro operativo è il mescolamento, necessario per l'omogeneizzazione di cellule, calore e metaboliti. Una buona turbolenza, soprattutto in reattori di grandi dimensioni, permette alle cellule di circolare velocemente e non stazionare nelle zone meno illuminate del reattore (Barbosa et al., 2003).

Le microalghe necessitano di alte concentrazioni di nutrienti essenziali (C, N, P, S, K, Fe, etc) (Markou et al., 2014). Alcune microalghe sono in grado di utilizzare le acque reflue come fonte di nutrienti, in particolare azoto e fosforo (Pittman et al., 2011). L'azoto, dopo il carbonio, è l'elemento più abbondante nella biomassa microalgale, e il suo contenuto in peso secco rientra in un range di 1-14% (tipicamente 5-10%) (Grobbelaar et al., 2004). L'azoto fa parte di composti biochimici essenziali come acidi nucleici (DNA e RNA), amminoacidi (proteine) e pigmenti come clorofille e ficocianine. Può essere assimilato in forma inorganica (NH₄⁺, NO₃⁻) o in forma organica come urea o amminoacidi (Perez-Garcia et al., 2011). La carenza di questo elemento determina una condizione di stress per le microalghe che si manifesta con una produttività di biomassa minore ma anche con alta produzione di lipidi, sostanze di riserva che vengono stoccate all'interno delle cellule (Lardon et al., 2009). In particolare, la carenza di azoto determina l'espressione di tre geni dell'acil-transferasi coinvolti nella sintesi di TAG (Boyle et al., 2012). Nello studio condotto da Liang et al. (2009) la limitazione di azoto nel mezzo di coltura ha determinato un incremento del contenuto di lipidi dal 33% al 38%. Il fosforo è un altro elemento fondamentale per la crescita delle microalghe, e il suo

contenuto nella biomassa può variare da 0,05% a 3.3% (Grobbelaar et al., 2004); esso rientra nella composizione di molte molecole organiche essenziali per il metabolismo, come acidi nucleici (DNA e RNA), membrana cellulare (di natura fosfolipidica) e ATP (Razzak et al., 2013). Specialmente nei sistemi naturali, questo nutriente può essere un fattore limitante per la crescita delle microalghe (Oliver e Ganf, 2000). A differenza di azoto e carbonio che sono elementi rinnovabili (nonostante richiedano alti *input* energetici), il fosforo deriva da rocce fosfatiche fossili, che non sono rinnovabili (Elser, 2012). Negli ambienti naturali, così come nelle acque reflue, il fosforo è presente in varie forme, ad esempio ortofosfato, che è la forma con cui viene assorbito dalle cellule microalgali. Si possono comunque utilizzare forme sia inorganiche che organiche per la coltivazione delle microalghe (Huang e Hong, 1999). Microalghe e cianobatteri possono accumulare riserve di fosforo intracellulare come granuli di polifosfato (*luxury uptake*) (Powell et al., 2009). La capacità di accumulare il fosforo in eccesso può essere sfruttata per rimuoverlo dai reflui (Powell et al., 2011).

1.1.2 Utilizzo delle microalghe per la fitodepurazione

Le grandi quantità di sostanze nutritive e metalli tossici presenti nelle acque reflue municipali, industriali e agricole costituiscono una minaccia per gli ecosistemi naturali e per la salute umana, soprattutto nel momento in cui raggiungono il corpo idrico recettore (Cai et al., 2013). Una delle principali conseguenze del rilascio ambientale di acque ricche di nutrienti è l'eutrofizzazione (de-Bashan et al., 2010). L'eutrofizzazione causa una crescita accelerata di alghe e piante, aumentando la loro presenza nelle acque, di conseguenza porta a un deterioramento della qualità dell'acqua (Arbib et al., 2014). La direttiva 98/15/CE della Commissione Europea definisce i requisiti per gli scarichi idrici da impianti di depurazione urbani verso le aree ad alto rischio di eutrofizzazione, a 10 mg l⁻¹ per l'azoto totale e 1 mg l⁻¹ per il fosforo totale (98/15/CE del 27/02/1998).

La capacità delle microalghe di rimuovere azoto, fosforo, metalli pesanti e composti tossici da diversi effluenti può avere un ruolo chiave nella *bioremediation* delle acque reflue, come dimostrato da numerosi studi (Ruiz-Martinez et al., 2012; Shimura et al., 2012; Zhu et al., 2013). L'utilizzo di acque reflue determina una riduzione dei costi di coltivazione delle microalghe, oltre che della *water footprint* (Aketo et al., 2019). Specialmente per la produzione di biocarburanti da microalghe, la richiesta idrica della coltivazione è molto elevata: Yang et al. (2011) ha stimato che per la produzione di 1 kg di biodiesel derivato da microalghe siano necessari 3726 kg di acqua, e che l'utilizzo delle acque reflue potrebbe ridurre questo valore di circa il 90%.

Le acque reflue possono essere definite in base a caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche. La più importante caratteristica fisica è la temperatura, in quanto influenza le reazioni chimiche e biologiche che

avvengono nel mezzo, oltre che pH, conduttività, etc (Rawat et al., 2011). Per quanto riguarda le caratteristiche chimiche, i principali componenti delle acque reflue sono proteine, carboidrati, lipidi, urea, oli e una piccola quantità di composti organici sintetici; i composti inorganici più comuni sono invece cloro, idrogeno, ferro, azoto, fosforo, zolfo e tracce di metalli pesanti (Muttamara et al., 1996). Generalmente l'azoto è presente come ione ammonio (NH_4^+), e il fosforo in forma di anioni inorganici (H_2PO_4^- e HPO_4^{2-}) (Martinez et al., 1999).

La fitodepurazione può essere definita come l'utilizzo di macro o microalghe per rimuovere o biotrasformare inquinanti, inclusi nutrienti e composti xenobiotici dalle acque reflue (Mulbry et al., 2008). Le alghe possono contribuire alla degradazione degli inquinanti ambientali sia trasformando direttamente l'inquinante in questione sia incrementando il potenziale di degradazione di quest'ultimo da parte della comunità microbica presente (Rawat et al., 2011). Con il processo di fotosintesi, le microalghe producono e forniscono O_2 ai batteri eterotrofi aerobi per mineralizzare gli inquinanti organici e ossidare NH_4^+ , usando a loro volta la CO_2 emessa dai batteri durante la respirazione: ciò consente di migliorare notevolmente la rimozione del BOD (domanda biochimica di ossigeno) (Muñoz et al., 2006) e di mitigare le emissioni di CO_2 (Wang et al., 2010).

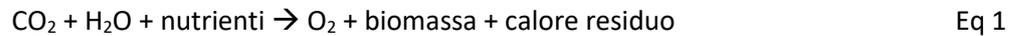
L'efficienza di crescita delle microalghe nelle acque reflue tuttavia dipende da diverse variabili. Le diverse fonti di refluo (municipale, domestico, industriale o civile) determinano una grande differenza di composizione, dove generalmente si ha maggiore quantitativo di azoto nei reflui provenienti da allevamenti animali (Chiu et al., 2015), mentre i reflui industriali contengono metalli pesanti come Cd, Cr, Zn, e composti organici tossici come biocidi o surfattanti (Razzak et al., 2013). Inoltre, diverse specie di microalghe hanno diverse soglie di tolleranza ai vari composti. Le specie microalgali appartenenti al phylum Chlorophyte sono state molto studiate in questo contesto per la loro alta efficienza nella rimozione dei nutrienti dalle acque reflue, in particolare il genere *Chlorella* sp. (Cai et al., 2013; Wu et al., 2014; Zhu et al., 2019; Fernández-Linares et al., 2020; Hu et al., 2020; Zuliani et al., 2016).

1.1.3 Meccanismi di rimozione dei nutrienti

Le microalghe possono rimuovere i nutrienti presenti nei reflui grazie ai loro meccanismi metabolici. La tipologia di refluo e le sue caratteristiche (i.e. concentrazione di inquinanti, pH, colore) determinano l'efficienza di fitodepurazione dei sistemi microalghe-batteri (Posadas et al., 2014). Nello specifico, il rapporto C:N:P determina la biodegradabilità del refluo. Il valore ottimale di questo rapporto sarebbe 100:18:2 (g/g/g). Eventuale carenza di carbonio può essere sopperita con aggiunta di CO_2 (Posadas et al., 2015). Quantitativi di N- NH_4^+ superiori a 100 mg l^{-1} e valori di pH superiori a 8 possono inibire il processo fotosintetico a causa della tossicità di NH_3 . Per questo motivo reflui che presentano alti valori di ammonio

(i.e. digestato anaerobico da reflui agro-industriali (600-800 mg N-NH₄⁺ l⁻¹)) devono essere diluiti o forniti in piccole quantità per evitare l'inibizione della crescita microalgale (Serejo et al., 2015).

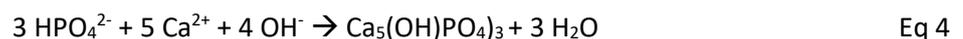
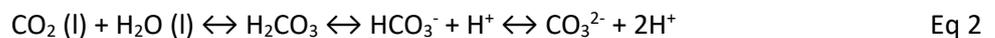
Le microalghe possono convertire biologicamente la CO₂ in biomassa utilizzando gli elettroni rilasciati durante la reazione descritta in Eq 1 (fotolisi dell'acqua luce-dipendente):



La biomassa microalgale contiene approssimativamente 43-56% di carbonio, pertanto per ottenere 1 kg di biomassa è richiesto 1.8 kg di CO₂. Alcune microalghe possono utilizzare come fonte di carbonio anche substrati organici (metabolismo mixotrofo o eterotrofo).

Sono state identificate tre tipologie di meccanismo di rimozione dei nutrienti da parte di consorzi microalghe-batteri:

- 1) Assimilazione dei nutrienti, che vanno a costituire nuova biomassa. Il contenuto di N nelle microalghe varia da 6.6% a 9.3%, mentre per P si ha un range di 0.2%-3.9% (Posadas et al., 2015; Powell et al., 2009).
- 2) Rimozione abiotica dei nutrienti, come il processo fotosintetico che determina un aumento di pH causato dalla rimozione di CO₂ (Eq 2), lo strappaggio dell'ammoniaca ad alti valori di pH (Eq 3) e la precipitazione di fosfati in presenza di Ca²⁺ e Mg²⁺ con formazione di idrossiapatite [Ca₅(OH)PO₄]₃ o struvite [NH₄MgPO₄*6H₂O] (Eq 4).



Questi primi due meccanismi insieme determinano una rimozione di N e P del 70-80% e del 60-70%, rispettivamente, in sistemi di coltivazione aperti (Posadas et al., 2015).

- 3) Dissimilazione dei nutrienti, in particolare per l'azoto processi di nitrificazione (Eq 5) e denitrificazione (Eq 6):



La nitrificazione consiste nella trasformazione di ammonio in nitrato in presenza di ossigeno, mentre la denitrificazione è la riduzione del nitrato in azoto molecolare in condizioni anossiche da parte dei batteri eterotrofi (Rittmann e McCarty, 2001).

L'assimilazione di ammonio rappresenta il principale meccanismo di rimozione dell'azoto nei sistemi microalghe-batteri (45%).

1.1.4 Tipologie di processo e reattori

Esistono diverse tipologie di processo per la coltivazione delle microalghe, tra questi ci sono la coltivazione in batch, fed-batch, continuo o semi-continuo. La coltivazione in batch, detta anche “a sistema chiuso”, è un sistema discontinuo in cui tutto il terreno di coltura viene fornito nel momento iniziale (Yin et al., 2020). Le principali difficoltà che si presentano sono il mantenimento di irradiazione e livelli di nutrienti costanti, perché l'assorbimento dei nutrienti e il *self-shading* delle cellule dovuto a un continuo cambiamento della densità cellulare può portare a bassa produzione di biomassa (Zhu et al., 2013).

Le colture in continuo o semi-continuo sono le tipologie di processo maggiormente utilizzate per la crescita di microalghe per produzione di biodiesel (Kaspar et al., 2014; Zhu et al., 2013). Nella coltura in semi-continuo, la biomassa viene raccolta in maniera intermittente e sostituita con terreno di crescita fresco; la coltura in continuo invece prevede che la biomassa sia raccolta continuamente e contemporaneamente sostituita con i nutrienti (Yin et al., 2020). In questo modo, il volume all'interno del reattore viene mantenuto costante e le microalghe crescono in ambiente che non subisce variazioni. Questo forza i microrganismi ad adattarsi alle condizioni presenti all'interno del reattore, e dopo alcune generazioni si raggiunge uno stato stazionario (Guedes et al., 2014). Queste generazioni vengono definite dal parametro operativo HRT (tempo di ritenzione idraulica). L'HRT è uno dei parametri più importanti nei sistemi di coltivazione in continuo o semi-continuo ed è definito come il periodo di ritenzione del mezzo colturale nel sistema. Pertanto, questo parametro è determinato dal rapporto tra il volume del reattore ed il volume giornaliero del mezzo colturale utilizzato, che viene quindi rimosso e sostituito con mezzo colturale fresco (Wang et al., 2010). I sistemi di coltivazione in continuo o semi-continuo permettono una migliore controllabilità dei parametri di crescita e una maggiore produttività in termini di biomassa (Alejandro et al., 2010).

L'HRT è il fattore operativo chiave che influenza la produttività microalgale (Matamoros et al., 2015). Tuttavia, nei sistemi di coltivazione comuni si può applicare un range di HRT limitato per evitare il fenomeno di *wash out* dovuto a HRT troppo bassi. Questo termine indica la condizione che si viene a verificare quando la velocità di estrazione della biomassa è superiore a quella di recupero dei nutrienti, o comunque della velocità di produzione di biomassa all'interno del fotobioreattore. In generale, la crescita microalgale è favorita da bassi HRT e alti carichi organici, poiché in queste condizioni le cellule si trovano in fase di crescita logaritmica. Con HRT più lunghi raggiungono la fase di stabilità in cui si moltiplicano più lentamente producendo cellule più piccole (Medina e Neis, 2007). I sistemi di coltivazione con ricircolo, o l'utilizzo di un fotobioreattore a membrana, consentono di introdurre un nuovo parametro operativo definito tempo di ritenzione dei solidi (SRT). Questo parametro è associato alla concentrazione di biomassa ed è dato dal rapporto tra volume del reattore moltiplicato per la concentrazione di biomassa presente all'interno del reattore e il flusso in uscita moltiplicato per la biomassa in uscita dal sistema. Risulta

pertanto evidente che in sistemi senza ricircolo HRT e SRT hanno lo stesso valore (Bilad et al., 2014). La possibilità di sdoppiare HRT e SRT consentirebbe di lavorare con bassi HRT e alti SRT, evitando il fenomeno di *wash out* della coltura e aumentando l'efficienza di rimozione dei nutrienti in un sistema di fitodepurazione. Luo et al. (2017) definisce il valore ottimale di SRT (18 giorni) per la produzione di biomassa con *Chlorella vulgaris*.

La coltivazione delle microalghe può essere effettuata in varie tipologie di impianto, i più usati vedono l'uso di vasche aperte (*open raceway ponds*) o di fotobioreattori chiusi (PBR). I sistemi a vasche aperte, mostrati in Figura 1, applicano una coltivazione all'aperto e possono essere artificiali o naturali, come laghi o lagune (Jiménez et al., 2003). Si tratta di sistemi semplici ed economici, ma possono essere suscettibili a contaminazione e condizioni meteorologiche avverse (Narala et al., 2016). Nei sistemi aperti è inoltre difficile tenere sotto controllo i parametri di crescita, come pH, temperatura, evaporazione (Mata et al., 2010). Il vantaggio nell'uso di questi sistemi è la potenziale costruzione in zone non arabili e desertiche, anche se la richiesta di acqua risulta estremamente elevata (Chisti, 2007).



Figura 1: Sistemi a vasca aperta per la coltivazione di microalghe. (fonte: femonline.it)

I fotobioreattori (PBR), mostrati in Figura 2, sono sistemi di coltivazione chiusi. Risultano più efficienti in termini di qualità di produzione grazie alla possibilità di operare in condizioni controllate; tuttavia possono avere alcuni svantaggi tra cui pulizia, accumulo di ossigeno disciolto con conseguente limitazione della crescita, e costi più elevati di progettazione e mantenimento (Molina Grima et al., 1999). I PBR possono

avere varie conformazioni, ad esempio tubolari, a pannello e a colonna. I fotobioreattori a pannello sono composti di materiale trasparente per massimizzare la cattura di energia solare, con un sottile strato di coltura densa che scorre attraverso il pannello. Questo permette l'assorbimento di radiazioni attraverso i pochi millimetri di spessore della coltura diminuendo l'effetto di ombreggiatura determinato da alte densità cellulari. Sono particolarmente adatti a colture algali ad alta concentrazione di biomassa data l'elevata efficienza fotosintetica rispetto al PBR tubolari (Richmond et al., 2004). I PBR tubolari, o a colonna, offrono la miscelazione più efficiente e la possibilità di monitorare al meglio le condizioni di crescita (Eriksen, 2008). Un'altra tipologia di sistema di coltivazione chiuso è il fotobioreattore a membrana, che risulta dall'integrazione tra PBR e tecnologia a membrana. Si tratta di un sistema che opera in continuo il cui design punta a incrementare l'accesso della luce (alto rapporto superficie/volume) e offrire condizioni di crescita ottimali per le microalghe (Luo et al., 2017). La presenza della membrana è finalizzata alla completa ritenzione della biomassa microalgale per evitare il fenomeno di *wash out*, perciò consente di operare a HRT e SRT differenti. I MPBR consentono un aumento della produzione di biomassa, favoriscono la rimozione dei nutrienti dal mezzo di coltura (digestato o acque reflue) e hanno richieste di terreno inferiori (Bilad et al., 2014).



Figura 2: Sistemi chiusi per la coltivazione di microalghe.

Sia i sistemi di coltivazione all'aperto che i sistemi chiusi vengono utilizzati su scala commerciale per produrre biomassa da cui ottenere proteine, pigmenti, acidi grassi e antiossidanti (Huesemann e Benemann, 2009). Il recupero di lipidi da biomassa microalgale e la successiva conversione in biodiesel non sono influenzate dal fatto che la coltivazione avvenga in sistemi aperti o chiusi; pertanto, per la produzione di biodiesel da microalghe, relativamente ai sistemi di coltivazione l'unico fattore di comparazione rimane il costo di produzione (Chisti, 2007).

1.1.5 Sistemi di recupero della biomassa microalgale

La raccolta della biomassa tramite separazione solido-liquido rappresenta circa il 20-30% del costo totale di produzione (Barros et al., 2015). Attualmente la raccolta delle microalghe viene effettuata con metodi meccanici (centrifugazione, filtrazione), chimici (coagulazione/flocculazione) o biologici (bioflocculazione). È di uso comune combinare due o più tecnologie per ottimizzare i risultati e ridurre significativamente i costi del processo (Shlesinger et al., 2012).

La raccolta delle microalghe viene solitamente svolta in due fasi: ispessimento e separazione solido-liquido. L'ispessimento ha la funzione di aumentare la concentrazione della sospensione microalgale e ridurre il volume da trattare, e viene effettuato tipicamente tramite coagulazione/flocculazione (sia chimica che biologica), sedimentazione o flottazione (Barros et al., 2015). La coagulazione/flocculazione chimica è la tecnica più diffusa poiché consente di trattare ingenti volumi di coltura microalgale e può essere applicata su un'ampia varietà di specie (Uduman et al., 2010). La sedimentazione per gravità è la metodologia più semplice e spesso utilizzata per la raccolta di microalghe, soprattutto in acque reflue, sia per gli elevati volumi trattati sia per il basso valore della biomassa coltivata (Gutzeit et al., 2005). Tuttavia, questo metodo è utilizzabile soltanto per specie che presentano cellule di grandi dimensioni (superiori a 70 micrometri), come *Spirulina* (Muñoz et al., 2006).

Dopo il trattamento di ispessimento, viene effettuata la separazione solido-liquido grazie a tecniche di filtrazione o centrifugazione. La filtrazione viene solitamente applicata dopo coagulazione/flocculazione per incrementare l'efficienza della raccolta. Questa tecnica risulta sostenibile a livello di costi però solo per la raccolta di cellule molto lunghe o che formano grandi colonie (Zhou et al., 2013). La centrifugazione è il metodo di raccolta più veloce, ma anche il più costoso a causa dell'alto consumo energetico, il che limita la sua applicazione all'ottenimento di prodotti ad alto valore aggiunto (Christenson et al., 2011). Dopo la raccolta, la torta di biomassa che si ottiene viene disidratata per facilitare i processi a valle, come l'estrazione dei lipidi (Barros et al., 2015). In Figura 3 vengono riportate le fasi e i metodi di raccolta della biomassa microalgale.

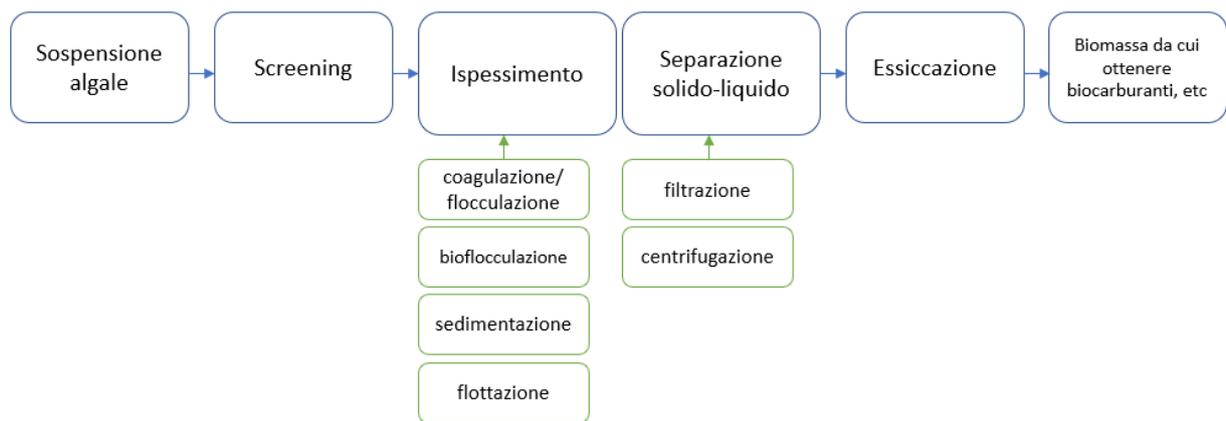


Figura 3: Fasi e metodi di raccolta delle microalghe.

1.1.6 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris (dominio Eukaryota, regno Protista, divisione Chlorophyta, classe Trebouxiophyceae, ordine Chlorellales, famiglia Chlorellaceae, genere *Chlorella*, specie *Chlorella vulgaris*) fu scoperta dal ricercatore olandese Martinus Willem Beijerinck nel 1890 come prima microalga con un nucleo ben definito (Safi et al., 2014). Agli inizi del '900, il contenuto proteico di *Chlorella* (superiore al 55% del peso secco) attirò l'attenzione di studiosi tedeschi come fonte alimentare alternativa; negli anni '50, fu studiata su ampia scala per tecnologie di abbattimento della CO₂ (Burlew, 1953). Attualmente, il Giappone è il maggiore consumatore di *Chlorella* sp. per trattamenti medici (Kitada et al., 2009) date le sue proprietà immunomodulanti e anticancerogene (Justo et al., 2001; Morimoto et al., 1995). *Chlorella* è nota anche per la sua capacità di accumulare lipidi, specialmente in condizioni di carenza di azoto, che presentano un profilo di acidi grassi adatto alla produzione di biodiesel (Converti et al., 2009; Zheng et al., 2011).

Morfologicamente *Chlorella vulgaris* è una cellula sferica di diametro compreso solitamente tra 2 e 10 µm (Yamamoto et al., 2005). In Figura 4 viene riportata una fotografia rappresentante cellule di *Chlorella vulgaris*. Presenta un singolo cloroplasto con una doppia membrana di fosfolipidi: la membrana esterna è permeabile a ioni e metaboliti, mentre quella interna è specifica per il trasporto delle proteine (Safi et al., 2014). All'interno del cloroplasto possono formarsi granuli di amido, specialmente in condizioni di crescita sfavorevoli. La condizione di stress determinata dalla carenza di azoto può portare all'accumulo di lipidi all'interno del citoplasma o nel cloroplasto (Van den Hoek et al., 1995). *Chlorella vulgaris* ha riproduzione asessuata (autosporulazione) e veloce (circa 24 ore) (Yamamoto et al., 2004).

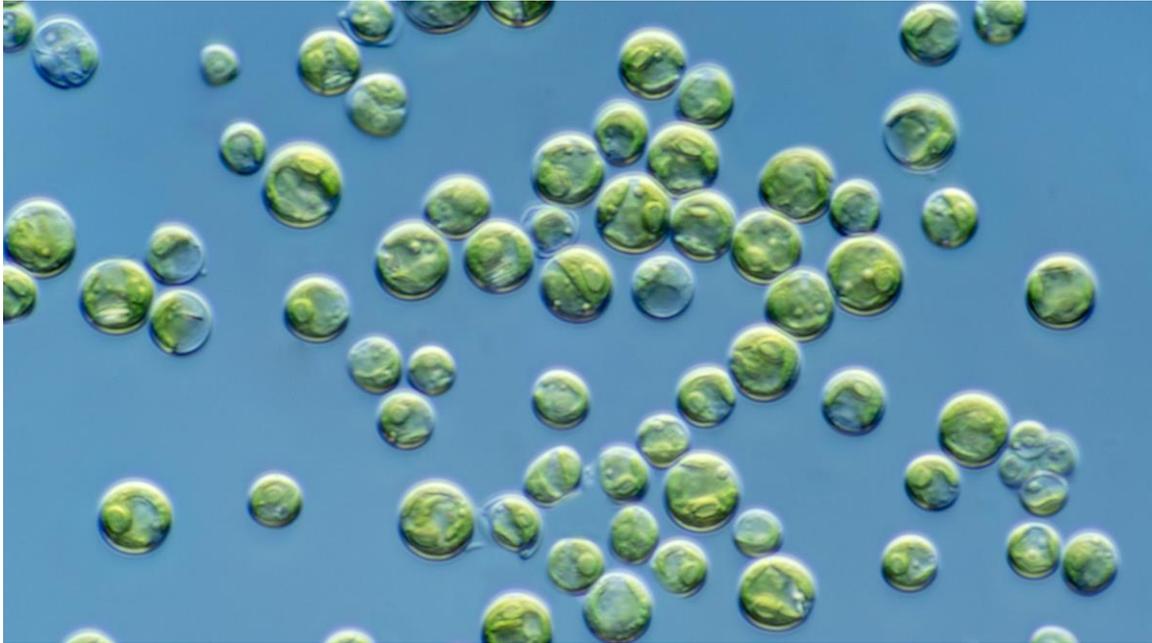


Figura 4: Fotografia di *Chlorella vulgaris* (fonte: micropia.nl).

I principali produttori sono Giappone, Germania e Taiwan, con una produzione annua di 2000 t in peso secco (Brennan et al., 2010). La sua coltivazione così diffusa è associata alla sua resistenza nei confronti di condizioni di crescita avverse e antagonisti. In condizione di stress ambientali, quali carenza di azoto o fosforo, stress luminoso o con concentrazioni di CO₂ troppo elevate, è stata riscontrata una diminuzione della produzione di biomassa con accumulo di lipidi o di amido. Su queste basi, sono state testate varie tipologie di coltivazione per ottenere carboidrati, lipidi, pigmenti o proteine (Pribyl et al., 2012).

Chlorella vulgaris è considerata una delle migliori specie microalgali per la *phycoremediation* delle acque reflue, con un ottimo potenziale di rimozione totale dell'azoto e un modesto potenziale di rimozione del fosforo (Gonzalez et al., 1997): si può avere un range di rimozione dell'azoto del 45-97%, del fosforo del 28-96% e una riduzione del COD del 61-86% da diverse tipologie di refluo (Aslan et al., 2006; Feng et al., 2011).

1.1.7 Stato dell'arte del trattamento di digestato con microalghe

La coltivazione in semi-continuo di microalghe alimentate con digestato anaerobico per la produzione di biodiesel di terza generazione è diventata oggetto di studi scientifici solo nell'ultimo decennio. L'applicazione di questo sistema di coltivazione risulta essere la metodologia ottimale per produrre biodiesel da biomassa microalgale (Yin et al., 2020). L'interesse crescente nell'uso della biomassa microalgale per produzione di biodiesel, trattamento di reflui, produzione di prodotti secondari ad alto valore aggiunto e cattura della CO₂ risiede nella capacità delle microalghe di avere produttività annue e tassi di crescita maggiori rispetto alle piante superiori, con il vantaggio di una composizione lipidica simile (Shuba et al., 2018; Gnansounou et al., 2016).

Diversi autori hanno studiato l'uso di varie specie microalgali: *Scenedesmus obliquus* (Feng et al., 2014), *Botryococcus braunii* (Ashokkumar et al., 2014), *Monoraphidium dybowskii* (Yang et al., 2018), *Desmodesmus* sp. (Ho et al., 2014) ma un focus è stato effettuato sulla specie microalgale più studiata, *Chlorella* sp., considerata una delle specie a più alta resa di lipidi, che può essere coltivata utilizzando acque reflue o digestato, operando perciò una contemporanea fitodepurazione dei reflui (Li et al., 2011; Han et al., 2015; Tu et al., 2016). La coltivazione in semi-continuo rappresenta la miglior coltivazione per la produzione di biomassa su larga scala in quanto si ha una riduzione dei tempi di produzione con un continuo trattamento del refluo entrante nel sistema. La coltivazione microalgale per risultare sostenibile a livello globale richiede l'uso di fonti di carbonio provenienti da reflui civili o industriali in modo da ridurre i costi di produzione ed operare un trattamento terziario attraverso la biomassa microalgale (Moreira et al., 2016). Ho et al. (2014) hanno analizzato la crescita di *Desmodesmus* sp. sia in semi-continuo che in fed-batch mostrando un incremento della produzione di lipidi in semi-continuo ($302 \text{ mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$) rispetto alla modalità fed-batch ($213 \text{ mg l}^{-1}\text{d}^{-1}$).

Tra le varie metodologie di coltivazione, i sistemi chiusi (PBR) sono preferibili in quanto consentono di monitorare meglio le condizioni colturali rispetto a sistemi aperti (*open ponds*), in particolare pH e temperatura (Han et al., 2013; Kong et al., 2020) e di effettuare una più efficiente coltivazione in semi-continuo (Moheimani et al., 2013; Yang et al., 2017). Nella progettazione dei PBR è importante garantire un'elevata superficie di illuminazione per ottimizzare la coltivazione microalgale, in quanto fenomeni di auto-ombreggiamento possono comportare una diminuzione della crescita di biomassa (Tan et al., 2018). Tra le tipologie di mezzo di alimentazione più utilizzate in letteratura ci sono le acque reflue municipali (Yang et al., 2017; Han et al., 2016) e le acque reflue da allevamento (Fernández-Linares et al., 2020; Zhu et al., 2013) in quanto ricche di azoto e fosforo necessari per la crescita della biomassa (Chen et al., 2020; Lee et al., 2021). Integrare il trattamento dei reflui con la coltivazione di microalghe può potenzialmente condurre alla risoluzione della sostenibilità energetica del sistema e allo smaltimento dei reflui degli impianti di trattamento. Dal punto di vista economico, utilizzare reflui per la coltivazione microalgale porterebbe una riduzione dei costi di coltivazione e, di conseguenza, dei biocarburanti prodotti da essa (Chen et al., 2018).

In alcuni studi viene utilizzato digestato anaerobico come mezzo di crescita per la coltura microalgale. Il digestato prima dell'utilizzo viene tipicamente pretrattato, in genere viene applicata una filtrazione in modo da rimuovere anche la componente microbiologica (Silkina et al., 2017) spesso preceduta da centrifugazione per consentire una migliore separazione dei solidi sospesi (Zuliani et al., 2016) o sterilizzazione mediante autoclave. Tipologie di pretrattamento meno comuni sono l'ozonizzazione, che sfrutta l'azione battericida e virucida dell'ozono, con conseguente incremento della produzione di biomassa e di efficienza della rimozione degli inquinanti (Cheng et al., 2016), o la combinazione di strippaggio

dell'ammoniaca e adsorbimento su carbone attivo per ridurre sia la concentrazione di ammoniaca sia la torbidità del mezzo (Marazzi et al., 2017). Una diluizione importante del digestato (in cui il digestato rappresenta fino al 5% v/v) facilita la penetrazione della luce nella coltura, incrementando la produzione di lipidi e il profilo degli acidi grassi (Sepulveda et al., 2015) (Tabella 1). Il carico organico viene riportato prevalentemente come massa di COD su volume (mg l^{-1} o g l^{-1}) ed ha una variazione abbastanza ampia in base alla tipologia di digestato: dai 210 mgCOD l^{-1} del digestato proveniente da reflui municipali (Uggetti et al., 2014) ai 33 gCOD l^{-1} del digestato di origine agro-zootecnica (Franchino et al., 2013).

Tabella 1: Tipologie di digestato anaerobico per coltivazione microalgale e relativi pretrattamenti.

Specie	Processo	Tipo digestato	Pretrattamenti	Carico Organico	REF	Anno
<i>Chlorella sorokiniana</i>	batch	macrofite acq.	filtrazione	245-512 mg DOC l ⁻¹	Kimura et al.	2019
<i>Chlorella</i> PY-ZU1	batch	alimentare	ozonizzazione	3108 mg COD l ⁻¹	Cheng et al.	2016
<i>Nannochloropsis</i>	batch	agricolo	diluizione, sedimentazione, setacciatura, filtrazione membrana	-	Silkina et al.	2017
<i>Chlorella minutissima</i>	batch	allevamento	centrifugazione	891-876 mg TOC l ⁻¹	Singh et al.	2011
<i>Scenedesmus</i> sp. AMDD	batch	allevamento	diluizione	-	Bjornsson et al.	2013
<i>Chlorella vulgaris</i>	batch	reflui agricoli	centrifugazione, filtrazione	18 ± 4 g COD l ⁻¹	Zuliani et al.	2016
<i>Chlorella vulgaris</i>	batch	allevamento	diluizione	17.6 g COD l ⁻¹	Franchino et al.	2016
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	batch	fanghi depurazion	centrifugazione e filtrazione	1.92 ± 0.05 g TOC l ⁻¹	Tan et al.	2020
<i>Chlorella sorokiniana</i>	batch	borlanda	centrifugazione, diluizione. recupero struvite	9.29 ± 0.36 g COD l ⁻¹	Sayed et al.	2020
<i>Chlorella vulgaris</i>	batch	agrozootecnico	diluizione	32.9 g COD l ⁻¹	Franchino et al.	2013
<i>Nannochloropsis oculata</i>	batch	centrale biogas	filtrazione	562 ± 58 mg COD l ⁻¹	Parsy et al.	2020
<i>Parachlorella kessleri</i>	batch	agro-industriale	centrifugazione e filtrazione	11.87 ± 0.12 g COD l ⁻¹	Koutra et al.	2017
<i>Chlorella vulgaris</i>	batch	agro-industriale	centrifugazione e filtrazione	11.34 ± 0.04 g COD l ⁻¹	Koutra et al.	2018
<i>Chlorella</i> sp.	batch	allevamento	diluizione e filtrazione	23.76 g COD l ⁻¹	Wang et al.	2010
<i>Chlorella vulgaris</i>	batch	alimentare	centrifugazione e filtrazione	1.45 g COD l ⁻¹	Zhu et al.	2019
<i>Scenedesmus</i> sp.	batch	reflui municipali	diluizione	210 mg COD l ⁻¹	Uggetti et al.	2014
<i>Scenedesmus obliquus</i>	batch	allevamento	sedimentazione e filtrazione	3200-400 mg COD l ⁻¹	Xu et al.	2015
Chlorellaceae	semi-continuo	agricolo	centrifugazione e diluizione	1.52 ± 0.22 g COD l ⁻¹	Pizzera et al.	2019
<i>Scenedesmus</i> sp.	semi-continuo	industria tessile	centrifugazione e diluizione	3-7 g COD l ⁻¹	T.Nguyen et al.	2019
<i>Chlorella</i> sp.	semi-continuo	allevamento	centrifugazione, stripping/adsorbimento con carbone attivo	6.3 ± 4 g COD l ⁻¹	Marazzi et al.	2017
<i>Chlorella</i> sp.	semi-continuo	allevamento	centrifugazione, filtrazione con membrana	37.64 ± 0.23 gCOD l ⁻¹	Ledda et al.	2015
<i>Chlorella</i> sp.	semi-continuo	allevamento	filtrazione	97–220 mg NPTOC l ⁻¹	Ayre et al.	2017

Sono ancora pochi gli studi che analizzano la coltivazione di microalghe su digestato in modalità semi-continuo; ancora meno sono gli studi che utilizzano *Chlorella vulgaris* o consorzi *Chlorella* sp.-batteri (Tabella 2).

Ledda et al. (2015) analizza la crescita di *Chlorella* sp. coltivata in semi-continuo su digestato da allevamento sottoposto a due pretrattamenti differenti, centrifugazione e ultrafiltrazione. La caratterizzazione chimica del digestato riporta valori di COD di $17.77 \pm 0.19 \text{ g l}^{-1}$ per il digestato centrifugato e $2.90 \pm 0.08 \text{ g l}^{-1}$ per il digestato ultrafiltrato. È evidente che questa differenza di valori sia dovuta al diverso pretrattamento applicato. In seguito a diluizione il carico organico risulta $1.09 \pm 0.01 \text{ g COD l}^{-1}$ nel digestato centrifugato e $0.18 \pm 0.01 \text{ g COD l}^{-1}$ nel digestato ultrafiltrato. Per quanto riguarda l'ammonio, le concentrazioni iniziali nel digestato sono le stesse per il centrifugato e l'ultrafiltrato ($2.02 \pm 0.01 \text{ g l}^{-1}$ e $2.01 \pm 0.01 \text{ g l}^{-1}$, rispettivamente). In seguito a diluizione si ottengono valori di $124.03 \pm 0.68 \text{ mg NH}_4^+ \text{ l}^{-1}$ e $124 \pm 0.80 \text{ mg NH}_4^+ \text{ l}^{-1}$. In generale in questo studio è stata riscontrata una crescita migliore su digestato ultrafiltrato ($0.22 \pm 0.01 \text{ g l}^{-1}\text{d}^{-1}$ rispetto a $0.17 \pm 0.02 \text{ g l}^{-1}\text{d}^{-1}$) grazie ai valori inferiori di COD dovuti al differente pretrattamento, molto simili ai valori di questa tesi ($0.18 \pm 0.05 \text{ g COD l}^{-1}$).

Chu et al. (2015) analizza la crescita di *Chlorella pyrenoidosa* in semi-continuo in fotobioreattore *outdoor* applicando diversi HRT (2 e 10 giorni) su digestato da reflui di lavorazione dell'amido sottoposto a sedimentazione e filtrazione. Considerando i valori da lui ottenuti nella stagione estiva, la concentrazione di biomassa è risultata maggiore con HRT di 10 giorni ($1.82 \pm 0.11 \text{ g l}^{-1}$ rispetto a $0.79 \pm 0.06 \text{ g l}^{-1}$ in HRT di 2 giorni). In questo studio è stato applicato anche un HRT di 20 giorni durante la stagione invernale, potenzialmente comparabile con l'HRT di RUN 1 di questa tesi, ma purtroppo le condizioni climatiche hanno molto limitato la crescita della biomassa (0.6 g l^{-1}).

Wang et al. (2010) analizza la crescita di *Chlorella vulgaris* in digestato da allevamento applicando diversi HRT (10 e 20 giorni) allo scopo di ottenere una rimozione completa di NH_4^+ . Con HRT di 10 giorni la percentuale di rimozione riscontrata è 58%, con HRT di 20 giorni ottiene un valore di 100%.

Sebbene l'utilizzo di digestato per la coltivazione di microalghe sia molto promettente, prima di poter implementare il processo su larga scala ci sono diversi punti da risolvere: l'identificazione di un tipo di microalga resistente e produttiva, in grado di utilizzare fonti di carbonio sia organico che inorganico, resistente alle variazioni di coltura (i.e. pH e temperatura) e in grado di produrre alte percentuali di lipidi e/o carboidrati e/o metaboliti di interesse, inoltre vi è la necessità di ridurre i costi delle operazioni più onerose, come la raccolta della biomassa (Pittman et al., 2011).

Tabella 2: Stato dell'arte della coltivazione di *Chlorella* in semi-continuo su digestato.

Specie	HRT	Reattore	Digestato	Pretrattamenti	Carico Organico	N-NH ₄ ⁺	Biomassa	REF	anno
<i>Chlorella</i> sp.	-	PBR (300ml)	allevamento	centrifugazione	1.09 ± 0.01 g COD l ⁻¹	124.03 ± 0.68 mg l ⁻¹	0.17 ± 0.02 g l ⁻¹ d ⁻¹	Ledda et al.	2015
<i>Chlorella</i> sp.	-	PBR (300 ml)	allevamento	ultrafiltrazione	0.18 ± 0.01 g COD l ⁻¹	124 ± 0.80 mg l ⁻¹	0.22 ± 0.01 g l ⁻¹ d ⁻¹	Ledda et al.	2015
<i>Chlorella</i> sp.	10 d	PBR (150 ml)	agricolo	centrifugazione	4.0 ± 6 g COD l ⁻¹	1.2 ± 0.5 g l ⁻¹	0.7 g l ⁻¹	Marazzi et al.	2017
<i>Chlorella</i> sp.	5 d	open pond (50 l)	allevamento	nessuno	-	240-690 mg l ⁻¹	0.97 g l ⁻¹	Ayre et al.	2017
<i>Chlorella</i> sp.	5 d	PBR (2.5 l)	allevamento	ultrafiltrazione	1.7 ± 0.15 g COD l ⁻¹	-	1.67 g l ⁻¹	Salati et al.	2017
<i>Chlorella vulgaris</i>	10 d	PBR (1 l)	allevamento	diluizione (20x)	10.32 g COD l ⁻¹	1.55 g l ⁻¹ (58% _{rimossa})	1.35 g l ⁻¹	Wang et al.	2010
<i>Chlorella vulgaris</i>	20 d	PBR (1 l)	allevamento	diluizione (20x)	10.32 g COD l ⁻¹	1.55 g l ⁻¹ (100% _{rimossa})	1.35 g l ⁻¹	Wang et al.	2010
consorzio	10 d	open pond (880 l)	agricolo	diluizione	21-41 mg COD l ⁻¹ d ⁻¹	23-36 mg N l ⁻¹ d ⁻¹	0.5 ± 0.03 g l ⁻¹	Pizzera et al.	2019
consorzio	-	open pond	allevamento	-	-	0.89 g l ⁻¹	0.7 g l ⁻¹	Nwoba et al.	2016
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	10 d	PBR (820 l)	reflui amido	sedim e filtr	75.2 mgTOC l ⁻¹	-	1.82 ± 0.11 g l ⁻¹	Chu et al.	2015
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2 d	PBR (820 l)	reflui amido	sedim e filtr	140.6 mgTOC l ⁻¹	-	0.79 ± 0.06 g l ⁻¹	Chu et al.	2015

1.1.8 Biodiesel di terza generazione

La capacità delle microalghe di essere coltivate in digestato o in acque reflue è un indice del loro potenziale come materie prime per biocarburanti coltivate su mezzo di crescita sostenibile (Pittman et al., 2011). Esistono quattro tipologie di biocarburanti: quelli di prima generazione vengono prodotti a partire da biomassa ad uso alimentare (mais, frumento, canna da zucchero), quelli di seconda generazione derivano da biomassa legnosa di uso non alimentare, come legname e residui agricoli, quelli di terza generazione derivano da microrganismi, quelli di quarta generazione derivano da modificazioni genetiche di microrganismi (Alalwan et al., 2019).

Il biodiesel da colture oleaginose e il bioetanolo da canna da zucchero vengono proposte come alternative *green* e sostenibili ai carburanti fossili; tuttavia la loro produzione in ampia scala non è sostenibile (Chisti, 2007). Un'alternativa è rappresentata dalle microalghe, che con la loro maggiore resa produttiva l'anno per unità di area, il loro maggiore contenuto in lipidi e la possibilità di essere coltivate in terre non produttive hanno ricevuto molte attenzioni in qualità di materia prima per la produzione di biocarburanti di terza generazione, tra cui biodiesel, bioidrogeno, bioetanolo e biometano (Zhu et al., 2016). Chisti (2007) nei suoi studi ha confrontato varie fonti di biodiesel, come mostrato in Tabella 3.

Tabella 3: Confronto tra varie fonti di biodiesel in termini di resa in olio ($l\ ha^{-1}$) e richiesta di terreno (Mha) per incontrare il 50% della richiesta di carburanti per trasporti negli Stati Uniti.

Coltura	Resa in olio ($l\ ha^{-1}$)	Richiesta terreno (Mha)
Mais	172	1540
Soia	446	594
Canola	1190	223
Jatropha	1892	140
Cocco	2689	99
Palma	5950	45
Microalghe (70% olio dw)	1369000	2
Microalghe (30% olio dw)	58700	4.5

Dalla tabella si evince che le microalghe rappresentano la migliore biomassa per la produzione di biodiesel in quanto hanno la maggiore resa produttiva di olio, espressa in litri di olio su ettaro impiegato per la coltivazione. Secondo lo studio condotto da Chisti (2007), l'uso di biodiesel da microalghe negli Stati Uniti porterebbe a una riduzione del 50% dell'uso di combustibili fossili per i trasporti utilizzando per la coltivazione solo un 2-3% dell'area coltivabile esistente negli Stati Uniti. La capacità di adattarsi a varie condizioni colturali è un vantaggio delle microalghe che non deve essere trascurato: considerando che due terzi della superficie del pianeta sono ricoperti da laghi e oceani, la possibilità di coltivare microalghe sia in acque dolci che in acque salate le rende una risorsa rinnovabile con un elevato potenziale (Razzak et al., 2013).

Il biodiesel prodotto da microalghe presenta molti vantaggi rispetto a quello di origine fossile: è una risorsa rinnovabile, biodegradabile, e quasi *carbon-neutral* con produzione sostenibile, non è tossico e contiene bassi livelli di particolato, monossido di carbonio, idrocarburi e ossidi di zolfo (Brennan et al., 2010). Il biodiesel da biomassa microalgale, rispetto a quello di prima generazione, è più adatto all'uso nell'industria aeronautica in cui un basso punto di congelamento rappresenta un fattore chiave (Jet fuel from microalgal lipids. National Renewable Energy Laboratory; 2006). Un altro importante vantaggio è dato dalla possibilità di ridurre le emissioni di CO₂ fino al 78% rispetto a quelle dovute alla produzione di diesel fossile (Sheehan et al., 1998). Inoltre, dopo l'estrazione dell'olio, la biomassa rimanente (ricca di proteine, carboidrati e altri nutrienti) può essere convertita in bioetanolo o biometano o essere utilizzata come mangime per bestiame o come fertilizzante organico grazie al suo elevato rapporto N:P, o può essere semplicemente bruciata per produrre elettricità e calore con cogenerazione elettrica (Sanchez-Miron et al., 2003; Wang et al., 2008). A seconda della specie microalgale, possono essere estratti anche altri composti con diverse applicazioni in vari settori industriali, compresa una vasta gamma di prodotti (sia *fine chemicals* che *bulk chemicals*) come grassi, acidi grassi polinsaturi, coloranti naturali, pigmenti, antiossidanti o composti bioattivi di alto valore aggiunto (Raja et al., 2008). Proprio grazie a questa ampia varietà di prodotti biologici di alto valore aggiunto con varie possibili applicazioni commerciali, le microalghe hanno il potenziale di rivoluzionare vari settori delle biotecnologie, come quello di biocarburanti, cosmetici, prodotti farmaceutici, acquacoltura e prevenzione dell'inquinamento (Rosenberg et al., 2008).

Le microalghe sono in grado di accumulare un notevole quantitativo di lipidi, che sono una fonte rinnovabile da cui si può produrre biodiesel perché la composizione degli acidi grassi è simile a quella degli oli vegetali. Un confronto tra il contenuto di lipidi prodotto da varie specie e generi microalgali viene riportato in Tabella 4 (Chisti, 2007).

Tabella 4: Confronto tra il contenuto percentuale di olio in varie specie o generi microalgali.

Microalga	Contenuto in olio (%)
<i>Chlorella</i> sp.	28-32
<i>Nannochloris</i> sp.	20-35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31-68
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23
<i>Schizochytrium</i> sp.	50-77
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54

Oltre alla tipologia di mezzo colturale, ci sono altri parametri che influenzano la produzione di lipidi e il profilo degli acidi grassi nelle colture microalgali, tra cui la temperatura, il pH, l'integrazione di CO₂, la concentrazione dell'inoculo, gli eventuali pretrattamenti del digestato, e il metodo colturale (batch, fed-batch, continuo o semi-continuo) (Dickinson et al., 2015; Ji et al., 2015; Massa et al., 2017). Le interazioni

tra alghe e batteri sembrano facilitare la produzione di lipidi in quanto la presenza dei batteri permette di evitare gli effetti negativi di accumuli di ossigeno nei fotobioreattori (Erkelens et al., 2014); altri studi hanno analizzato l'effetto di consorzi microalgali nella produzione di lipidi e hanno osservato non solo una produzione più elevata ma anche tolleranza a valori di pH più alti (Bohutskyi et al., 2016; Nwoba et al., 2016).

Il profilo degli acidi grassi rappresenta un fattore essenziale che determina le proprietà del biodiesel (Koutra et al., 2018). In genere, gli acidi grassi più abbondanti nelle alghe sono l'acido oleico (C18:1) e l'acido palmitico (C16:0). L'acido oleico viene consumato durante la divisione cellulare (Razzak et al., 2013). Per ottenere un biodiesel di alta qualità, si preferiscono catene alifatiche a 16-18 atomi che presentano un'alta percentuale di acidi grassi saturi o monoinsaturi, ad esempio acido palmitico o acido oleico (Kim et al., 2015; Yu et al., 2017). Tuttavia, è necessario che il biodiesel soddisfi determinati standard qualitativi per poter essere utilizzato. Nell'Unione Europea esistono due standard differenti: lo Standard EN 14214 riguarda il biodiesel per i veicoli, mentre lo Standard EN 14213 quello per olio riscaldante (Knothe, 2006). Nel biodiesel derivato da microalghe solitamente si riscontrano alte percentuali di acido linolenico (C18:3) che però in base allo standard Europeo EN 14214 non possono essere superiori al 12% del totale degli acidi grassi in quanto troppo suscettibile all'ossidazione (Shin et al., 2015). Entrambi gli standard richiedono che il valore di iodio non sia superiore a $120 \text{ g g}_{\text{biodiesel}}^{-1}$ e $130 \text{ g g}_{\text{biodiesel}}^{-1}$, rispettivamente per la norma EN 14214 e EN 14213. Inoltre, entrambi gli standard limitano il contenuto di FAME (esteri metilici degli acidi grassi) con quattro o più doppi legami a un massimo dell'1% mol (Chisti, 2007).

Tutti i metodi di produzione di biodiesel da microalghe esistenti includono un'unità produttiva in cui le cellule vengono coltivate, seguita da raccolta della biomassa e successiva estrazione dei lipidi. In seguito, viene prodotto il biodiesel, generalmente tramite reazione di transesterificazione (Mata et al., 2010).

La lavorazione e l'estrazione dei componenti lipidici rappresentano la fase più onerosa in termini economici sia per ottenere materie prime a basso costo, sia per ottenere composti ad alto valore aggiunto (Mata et al., 2010). Nel caso della produzione di biodiesel, la biomassa viene comunemente sottoposta a disidratazione con varie metodologie, le più comuni sono l'essiccazione a spruzzo (*spray-drying*), la liofilizzazione o l'essiccazione al sole; quest'ultima però ha una bassa efficienza dovuta all'alto contenuto idrico della biomassa microalgale, mentre la prima ha dei costi troppo elevati. Pertanto, si preferisce la liofilizzazione. Dopo l'essiccazione si procede con la rottura della cellula per il recupero dei lipidi intracellulari. L'estrazione dei lipidi da materiale biologico può essere svolta con metodi chimici o fisici, o con una combinazione dei due (Chisti, 2007). Per l'estrazione su larga scala di lipidi da microalghe di solito si procede con la distruzione meccanica della cellula e successiva estrazione chimica con solventi, in genere esano o etanolo (96%), o una soluzione dei due. Lo svantaggio dell'uso di etanolo per l'estrazione degli oli

risiede nel rischio di estrarre anche altri composti cellulari non desiderati, come zuccheri o amminoacidi (Richmond et al., 2004).

Tra le metodologie fisiche di estrazione si possono utilizzare ad esempio gli ultrasuoni (Converti et al., 2009), il sonicatore con bagnetto termico (Neto et al., 2013) o congelamento seguito da estrazione con CO₂ supercritica (Gouveia et al., 2007). Alcuni studi sostengono che l'estrazione di lipidi che sfrutta gli ultrasuoni consenta di ridurre sia i tempi di estrazione che il consumo di solventi, grazie alla migliore penetrazione di questi nella struttura della cellula (Mercer et al., 2011). L'estrazione di lipidi con metodi chimici prevede l'utilizzo di solventi, che possono essere polari o non polari. In laboratorio si può usare il metodo di Bligh e Dyer che prevede l'estrazione tramite cloroformio (non polare) e metanolo (polare) per ottenere lipidi dalle cellule (Bligh and Dyer, 1959) o il metodo Folch (1957) che sfrutta una soluzione cloroformio:metanolo in rapporto 2:1. In generale, l'estrazione chimica con solventi consente di ottenere rese più alte (Razzak et al., 2013). L'estrazione con CO₂ supercritica è un metodo che sta ricevendo sempre più attenzioni, perché si tratta di un metodo veloce ed efficiente che evita il consumo di grandi quantità di solventi organici (spesso costosi e potenzialmente dannosi) e non rilascia composti tossici (Halim et al., 2012). Mendes et al. (1995) ha studiato l'utilizzo di CO₂ supercritica per l'estrazione di lipidi da *Chlorella vulgaris* riportando che la biomassa frantumata meccanicamente fornisce più alte rese di estrazione rispetto ad altri metodi.

Il biodiesel è una miscela di esteri alchilici degli acidi grassi a lunga catena ottenuta tipicamente da risorse biologiche non tossiche, come gli oli vegetali. Queste materie prime sono composte per circa il 90-98% in peso da trigliceridi e piccole quantità di mono o di-gliceridi, acidi grassi liberi (1-5%) e quantità residue di fosfolipidi, caroteni, zolfo e tracce di acqua (Bozbas, 2008). Può essere ottenuto per conversione chimica tramite reazione di transesterificazione o di esterificazione, o per conversione biochimica tramite interesterificazione (Razzak et al., 2013).

La via più comune è rappresentata dalla transesterificazione, una reazione a tre step successivi in cui i trigliceridi sono convertiti in digliceridi, i quali poi vengono convertiti in monogliceridi, che vengono a loro volta convertiti in esteri (biodiesel) e glicerolo (sottoprodotto) (Mata et al., 2010).

In Figura 5 viene riportata la reazione di transesterificazione nel suo complesso; R1, R2 e R3 rappresentano le catene di acidi grassi.

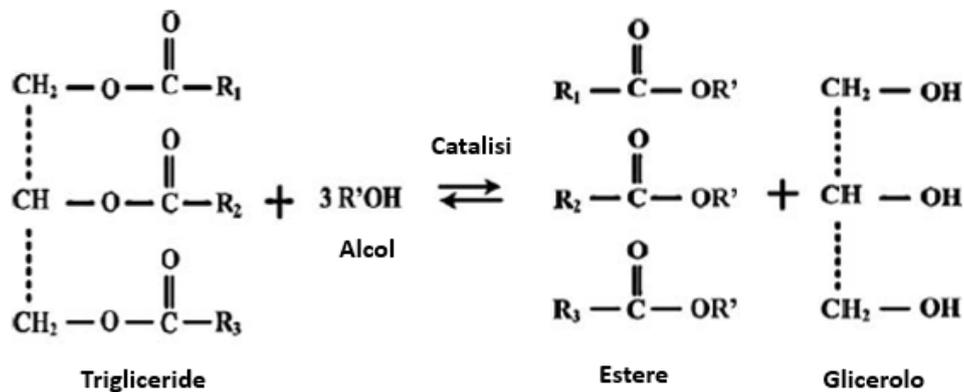


Figura 5: Reazione di transesterificazione. R1, R2 e R3 rappresentano le catene di acidi grassi.

La reazione di transesterificazione nel suo complesso avviene quando i trigliceridi vengono fatti reagire con un alcol (generalmente metanolo) in presenza di catalisi (generalmente NaOH). Il rapporto molare tra i due reagenti è teoricamente 3:1 (alcol:olio) ma nella pratica viene applicato un rapporto 6:1 per poter completare la reazione con precisione (Warabi et al., 2004). Questo tipo di catalisi può avere effetti corrosivi sulla strumentazione e può reagire con gli acidi grassi liberi (FFA) formando acqua e sapone; l'acqua inoltre può favorire la produzione di FFA idrolizzando i trigliceridi in digliceridi, e aumentando così la formazione di schiuma (Gerpen et al., 2004). È necessario pertanto inibire la reazione di saponificazione. Per ridurre la saponificazione, un approccio prevede l'uso di acido solforico come catalizzatore per convertire subito i FFA, successiva rimozione di acqua e poi conversione di trigliceridi e digliceridi in biodiesel con NaOH come catalizzatore (Kiss et al., 2006). Negli ultimi 15 anni, molti processi industriali sono passati dall'uso di catalisi acida liquida a catalisi acida solida (Wilson et al., 2000). Il catalizzatore dovrebbe essere tollerante all'acqua e stabile a temperature relativamente alte, oltre che efficiente e selettivo nell'evitare la formazione di acqua; infine, dovrebbe essere costituito di un materiale facilmente reperibile e non eccessivamente costoso. Il catalizzatore solido generalmente risponde a queste richieste. Kiss et al. (2006) ha testato vari tipi di catalizzatori solidi e ha individuato come alternativa più promettente zirconia solfata in base alle sue caratteristiche di stabilità.

Un altro metodo di conversione chimica per ottenere biodiesel è l'esterificazione. Il processo di esterificazione consiste in una reazione reversibile in cui gli acidi grassi liberi vengono convertiti in esteri alchilici tramite catalisi acida (generalmente con HCl o H₂SO₄) (Srivastava et al., 2000). Recentemente, si è posta l'attenzione anche su un metodo biochimico, l'intertransesterificazione enzimatica, per la sua alta resa in prodotto che non richiede operazioni ulteriori di purificazione (Modi et al., 2007). Questa reazione porta alla formazione di triacetina ed esteri metilici degli acidi grassi a lunga catena senza formazione di

glicerolo (Fukuda et al., 2001). Possono essere utilizzati sia le lipasi intracellulari che quelli extracellulari (Shimada et al., 2002). Gli svantaggi sono gli elevati costi degli enzimi e l'inibizione della reazione quando viene utilizzato metanolo (Nelson et al., 1996).

1.2 Digestato anaerobico da trattamento di scarti di lavorazione del vino

L'effluente di digestione anaerobica trattato in questa tesi e utilizzato come mezzo colturale per la crescita del consorzio microalghe-batteri proviene da scarti di lavorazione del vino, nello specifico feccia ottenuta da produzione di vino bianco. Di seguito sono indicate le fasi del processo di produzione vinicola e i relativi scarti di lavorazione, la digestione anaerobica e il digestato.

1.2.1 Processo produttivo del vino

Il vino viene definito come "il prodotto ottenuto esclusivamente dalla fermentazione alcolica, totale o parziale, di uve fresche, pigiate o non, oppure di mosto di vino" (Regolamento CE n. 1493/1999). Secondo i dati della International Organization of Vine and Wine (OIV), nel 2016 in Italia sono stati prodotti 50.92 milioni di ettolitri di vino. Si distinguono due tipologie di processo di vinificazione in base al prodotto che si vuole ottenere, vino bianco o vino rosso. Nella vinificazione del bianco, l'uva proveniente dall'azienda agricola viene scaricata in apposite vasche e in seguito alla pestata viene effettuata la classificazione fitosanitaria, la stima del grado zuccherino e dell'acidità.

La fase seguente consiste nella pigiatura, che prevede la rottura meccanica degli acini per far fuoriuscire il mosto, e nella separazione dei raspi. In questa prima fase abbiamo pertanto un notevole volume di scarti costituiti dalle vinacce e dai raspi stessi. Il mosto ottenuto in questa fase viene sottoposto a fermentazione alcolica operata da *Saccharomyces* che si trovano sulla buccia dell'uva (Eq 7).



Nella reazione di fermentazione alcolica si ha la trasformazione di uno zucchero esoso in anidride carbonica ed etanolo con produzione di energia. In questa fase si procede con l'eventuale aggiunta di anidride solforosa, bentonite per rendere la feccia più compatta o lieviti selezionati per migliorare le caratteristiche qualitative del vino.

Successivamente si hanno le fasi di travaso e torchiatura, ovvero l'estrazione del mosto rimasto nelle vinacce. In questa fase si aggiunge acido tartarico come correttore di acidità. I sottoprodotti della torchiatura sono vinaccia fermentata e feccia di fermentazione.

A questo punto si è ottenuto un vino giovane e si può procedere con maturazione e successiva filtrazione. Questa fase è necessaria per rimuovere la feccia di vinificazione. Il processo di vinificazione termina con l'imbottigliamento del prodotto finale.

1.2.2 Scarti di lavorazione del vino

Il processo di produzione del vino produce un elevato volume di scarti di lavorazione, che includono materia organica, acque reflue ed emissioni gassose. In particolare, si hanno:

- i raspi, che corrispondono alla parte legnosa dei grappoli;
- le vinacce, che sono ciò che resta degli acini d'uva una volta che viene eliminata la polpa. Solitamente queste vengono inviate alle distillerie per la produzione di grappa;
- la feccia, definita come residuo melmoso che si deposita nei recipienti dopo la fermentazione, durante l'immagazzinamento o dopo trattamenti autorizzati, così come i residui di filtrazione o centrifugazione di questo prodotto (Regolamento CEE n.337/79). Pertanto, è costituita principalmente da cellule di lievito, batteri, sali tartarici, residui di cellule vegetali ed etanolo (Bai et al., 2008; Naziri et al., 2012). Si distingue in pesante o leggera in base al tipo di decadimento, e rappresenta mediamente il 2-6% del vino prodotto (Alanon et al., 2017);
- le acque reflue, che rappresentano lo scarto più ingente, costituite dalle acque di lavaggio di taniche, attrezzature e pavimenti (Ioannou et al., 2015). La loro quantificazione può variare molto in base alla tecnologia adottata e alle dimensioni della cantina; in generale la quantità di acque reflue può variare da 0.7 a 14 l per litro di vino prodotto (Andreottola et al., 2009).

In molti casi gli scarti del processo di vinificazione sono gestiti e smaltiti nella maniera sbagliata; questo rappresenta una sfida per questo tipo di industria in termini di sostenibilità (Ahmad et al., 2020). Questi effluenti sono caratterizzati da un'alta concentrazione di COD, per la maggior parte solubile e altamente biodegradabile grazie alla presenza di etanolo, zuccheri e acidi organici (Beck et al., 2005). Uno dei metodi per trattare questa tipologia di refluo è la digestione anaerobica, che oltre a produrre biogas e digestato riutilizzabile in vari modi elimina patogeni e polifenoli, con efficacia variabile in base alle condizioni operative, in particolare temperatura (Cavinato et al., 2014). In particolare, la feccia vinicola rappresenta un substrato molto interessante per la digestione anaerobica grazie alla sua degradabilità e disponibilità durante l'anno. Studi precedenti utilizzano la feccia come co-substrato insieme a fanghi di depurazione civile in condizioni sia mesofile che termofile, con rese di biogas simili ($0.4 \text{ m}^3/\text{kgCOD}_{\text{aggiunto}}$) (Da Ros et al., 2014). L'efficienza della produzione di biogas tramite digestione anaerobica in condizioni termofile di scarti vinicoli può essere incrementata aumentando l'HRT e utilizzando co-substrati. Lempereur e Penavayre (2014) hanno applicato l'analisi del ciclo di vita di questo processo utilizzando indicatori inerenti agli impatti

ambientali, il cambiamento climatico, la salute umana e lo sfruttamento di risorse; la digestione anaerobica risulta essere più compatibile a livello ambientale rispetto ad altre tecnologie.

Secondo dati ANPA (1999) il bilancio di massa del processo di vinificazione può essere descritto come riportato in Tabella 5.

Tabella 5: Bilancio di massa del processo di vinificazione.

	Tipologia di materiale	Quantità (kg)
Flusso in entrata	Uva	100
	Acqua	141
Flusso in uscita	Acque reflue	143
	Vinacce	13
	Fecce e fanghi di filtrazione	3.6
	Raspi	2.2
	Vini di torchiatura	5
	Vetro	0.2
	Vino	74

Studi precedenti affermano che per la produzione di 1 l di vino vengono consumati 2.3 l di acqua con una produzione media di acque reflue di 1.8 l, e che per ogni quintale di uva lavorata si generano 144 l di acque reflue (Bonari et al., 2007).

1.2.3 Trattamento acque reflue di cantina

La normativa relativa alla gestione delle acque reflue è disciplinata dal D.Lgs.152/2006, in particolare dalla parte terza. L'articolo 74 di questo decreto definisce "acque reflue industriali" qualsiasi tipo di acque reflue scaricate da edifici o impianti in cui vengono svolte attività commerciali o di produzione di beni.

La caratterizzazione chimica dei reflui da cantina dipende dalla composizione dell'uva stessa. In genere un refluo da cantina presenta le caratteristiche chimico-fisiche riportate in Tabella 6.

Tabella 6: Caratteristiche chimico-fisiche di un refluo da cantina (Marchetti, 1994).

pH	5.7
Conducibilità a 20°C ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	3170
COD (mg l^{-1})	7500
BOD (mg l^{-1})	4350
Cl (mg l^{-1})	250
SO_4^{2-} (mg l^{-1})	275

Il trattamento delle acque reflue prevede diverse fasi. In primo luogo, si hanno i pretrattamenti con lo scopo di rimuovere i solidi di dimensioni elevate, sabbia e altre sostanze inerti, oli e grassi attraverso i processi di grigliatura, dissabbiatura ed equalizzazione. In seguito, si ha il trattamento primario che consiste nella sedimentazione primaria, da cui risulta il fango primario costituito per il 97-99% di acqua e sostanza organica molto putrescibile (Appels et al., 2008).

Il trattamento secondario prevede invece la rimozione biologica dei nutrienti e della sostanza organica e successiva sedimentazione secondaria. In questo modo si ottiene la separazione della frazione liquida del fango che si deposita sul fondo della vasca, e che proseguirà il trattamento insieme al fango primario andando incontro a pre-ispessimento, digestione anaerobica e post-ispessimento (linea fanghi). Le acque surnatanti vengono invece sottoposte a trattamento terziario, subendo un processo di filtrazione e disinfezione fino ad ottenere l'effluente finale.

1.2.4 Digestione anaerobica

La digestione anaerobica è una biotecnologia che consente di trattare reflui ad alto contenuto organico per produrre energia rinnovabile (Xu et al., 2015). Si tratta di un processo biologico che si verifica quando il materiale organico si decompone in condizioni di anaerobiosi, cioè in assenza di ossigeno, e viene svolto da microrganismi anaerobi che convertono la biomassa in biogas (costituito per il 65-70% da metano e per il restante 30-35% da CO₂). L'effluente del processo di digestione anaerobica (digestato) è ricco di nutrienti che possono essere utilizzati per concimazione o alimentazione di microalghe (Sheets et al., 2015).

La digestione anaerobica avviene in quattro fasi: idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi. Il processo dipende dalle interazioni tra le diverse categorie di microrganismi responsabili dei vari stadi del processo di degradazione (Verma et al., 2002). Le fasi della digestione anaerobica e i relativi prodotti sono riportati in Figura 6.

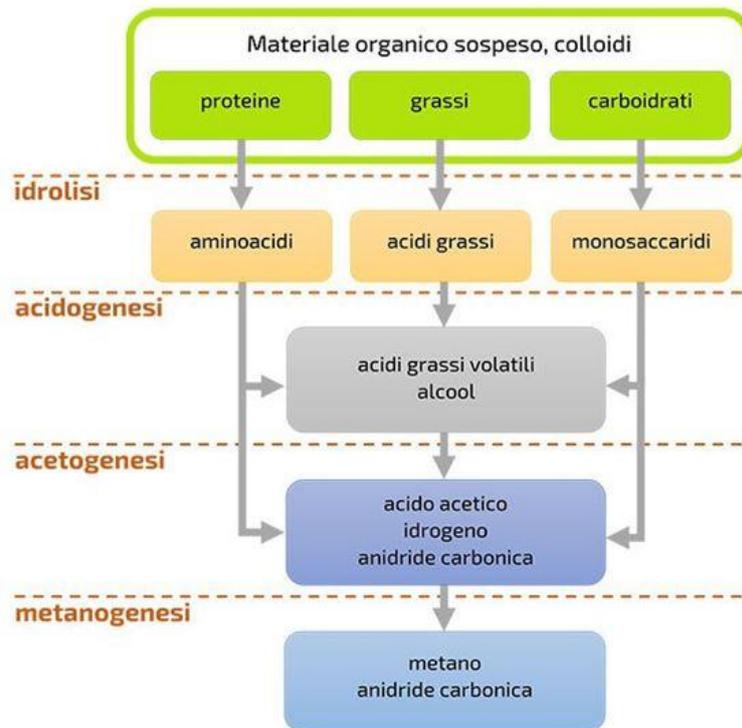


Figura 6: Schema delle fasi del processo di digestione anaerobica.

I microrganismi idrolitici hanno la funzione di decomporre la sostanza organica costituita da polimeri complessi in monomeri solubili che possono essere utilizzati dai batteri acidogenici. Ciò avviene grazie alla secrezione di enzimi idrolitici extracellulari che convertono carboidrati complessi, lipidi e proteine in zuccheri semplici, acidi grassi a lunga catena e amminoacidi (Li et al., 2011). Le condizioni ottimali per il processo di idrolisi sono 30-50°C di temperatura e pH di 5-7 (Azman et al., 2016).

Nella fase di acidogenesi (o fermentazione acidogenica), i batteri convertono i monomeri solubili in VFA (acidi grassi volatili) e altri prodotti. Gli acidi grassi volatili rappresentano il substrato di partenza per la produzione di biometano da parte dei batteri metanogeni. Gli acidi grassi volatili a catena corta maggiormente prodotti sono acido acetico e acido propionico, anche se è l'acido acetico il substrato diretto per la produzione di metano (Li et al., 2019). Al termine dell'acetogenesi, i prodotti finali che si hanno sono l'acetato e l'idrogeno molecolare (Hansen et al., 2013).

La metanogenesi converte i prodotti intermedi in metano grazie ai microrganismi metanogeni, che sono anaerobi obbligati (Ferry et al., 2010). Questi tendono a preferire condizioni di pH più alto rispetto ai microrganismi che operano nelle fasi precedenti, e ciò ha causato notevoli problemi nella coltivazione in laboratorio (Wolfe et al., 2011). Allo stesso tempo, presentano un tempo di rigenerazione più lento rispetto agli altri microrganismi della digestione anaerobica, fino a 5-16 giorni, determinando quindi la velocità di tutto il processo (Deublein et al., 2008). La metanogenesi può avvenire secondo due percorsi: acetoclastica

e idrogenotrofa. Nel primo caso, otteniamo metano e anidride carbonica dall'acido acetico; nel primo caso, la CO₂ viene ridotta a metano con H₂ come donatore di elettroni. Tipicamente, la via acetoclastica fornisce circa due terzi del metano totale che viene prodotto, mentre quella idrogenotrofa il restante terzo (Belay et al., 1986).

1.2.5 Digestato

L'effluente del processo di digestione anaerobica è denominato "digestato". Il digestato è costituito da biomassa microbica e materia non digerita. In genere, il digestato viene separato meccanicamente in fase liquida (che costituisce circa 80-90% del totale) e frazione solida (per il restante 10-20%) utilizzando presse, setacci, centrifughe e decantatori per gestirne meglio lo stoccaggio e il trasporto. La frazione liquida contiene alti valori di N e K, mentre la frazione solida è più ricca in P e fibre residue (Monlau et al., 2015). La composizione del digestato liquido può variare molto in funzione del substrato utilizzato per l'alimentazione del sistema di digestione anaerobica, della comunità microbica, dei parametri di controllo della digestione anaerobica (temperatura, carico organico, fornitura di oligoelementi) e della configurazione del processo (batch o continuo, con coltivazione a uno o due stadi) (Xia et al., 2016). L'utilizzo di digestato come fonte di carbonio e nutrienti per le microalghe può incrementarne la produzione di biomassa riducendo notevolmente i costi di produzione e l'impatto ambientale di coltivazione (Uggetti et al., 2014). In condizioni di mixotrofia o di eterotrofia, le microalghe possono rimuovere azoto e fosforo, ottenendo una riduzione importante delle concentrazioni di nutrienti presenti nell'effluente (Xia et al., 2016) e la produzione di biomassa ricca di lipidi per la produzione di biodiesel (Liu et al., 2013).

Il digestato presenta un'elevata torbidità, dovuta alla presenza di solidi sospesi, e un alto contenuto di ammonio che viene prodotto durante la digestione anaerobica (conversione dell'azoto organico in condizioni anaerobiche); queste due caratteristiche in particolare possono determinare l'inibizione della crescita delle microalghe. Infatti, l'elevato contenuto di ammonio può avere effetto tossico (>100mg N-NH₄⁺ l⁻¹) (Källqvist et al., 2003), mentre l'alta torbidità può ridurre la penetrazione della luce. Per ovviare a questi problemi spesso il digestato viene pretrattato o eventualmente diluito, in modo tale da ridurre la possibilità di inibizione della crescita della biomassa microalgale (Hajar et al., 2016) (Tabella 1). Come già indicato in precedenza, molti studi sono stati effettuati circa l'utilizzo del digestato nella coltivazione microalgale, dal digestato da reflui di allevamento (Franchino et al., 2013; Wang et al., 2010) al digestato da reflui municipali (Uggetti et al., 2014) o fanghi di depurazione (Zuliani et al., 2016; Tan et al., 2020), ma poche sono le esperienze riportate in condizioni di semi-continuo in sistemi chiusi (Tabella 2). Nessuno tra questi studi considera il trattamento di digestato che deriva da processi di trattamento di reflui vinicoli.

2. Scopo

Lo scopo dello studio sperimentale è l'ottimizzazione del processo in semi-continuo in fotobioreattore tubolare di una coltura *Chlorella vulgaris*-batteri fatta crescere su digestato da reflui vinicoli come mezzo di coltura, al fine di ottenere prodotti secondari ad alto valore aggiunto (biodiesel).

Al fine di ottimizzare il processo sono stati testati due diversi tempi di ritenzione idraulica (47 giorni e 10 giorni). L'andamento del processo viene valutato sia in termini di rimozione di contaminanti dal digestato sia in termini di crescita e composizione della biomassa microalgale (contenuto di lipidi, proteine ed amido).

Il potenziale utilizzo della biomassa prodotta per la produzione di biocarburanti di terza generazione è stato valutato analizzando la frazione lipidica in termini di composizione e confrontandola con gli Standard Europei EN14213 e EN14214.

Nello specifico, gli obiettivi posti sono tre:

- ottimizzazione dei parametri di processo per massimizzare la crescita microalgale;
- valutazione del contenuto e caratterizzazione di lipidi nella biomassa microalgale;
- rese di rimozione dei contaminanti presenti nel digestato.

3. Materiali e Metodi

3.1 Monitoraggio e caratterizzazione della biomassa

Il consorzio microalghe-batteri usato nelle sperimentazioni è stato ottenuto mediante l'uso del ceppo microalgale *Chlorella vulgaris*, fornito dalla collezione ACUF (*Algal Collection of University of Federico II*, Napoli, Italia), in re-inoculi seriali su surnatante di digestato vinicolo (Università Ca' Foscari di Venezia, Italia) non sterilizzato. Il mezzo di crescita utilizzato per il mantenimento della coltura microalghe-batteri in condizione mixotrofica è il mezzo sintetico BG11 (Tabella 7).

Tabella 7: Concentrazioni delle differenti soluzioni stock per la preparazione del mezzo sintetico BG11.

Soluzioni stock		BG11	Quantità di soluzione stock (per 100 ml)
Composto	Quantità (per 100 ml)	NaNO ₃	0.22 ml
NaNO ₃	15 g	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	1 ml
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.4 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.75 g	CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 ml
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.36 g	Acido citrico	1 ml
Acido citrico	0.06 g	Citrato di ferro ammoniacale	1 ml
Citrato di ferro ammoniacale	0.06 g	EDTA	1 ml
EDTA	0.01 g	Na ₂ CO ₃	1 ml
Na ₂ CO ₃	0.2 g	Sol. Micronutrienti	0.1 ml
Soluzione micronutrienti	Quantità (in 1l)		
H ₃ BO ₃	61 mg		
MnSO ₄ · H ₂ O	169 mg		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287 mg		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.5 mg		
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	12.5 mg		

Il monitoraggio della crescita microalgale è stato eseguito mediante analisi del peso secco, conta cellulare, quantificazione e caratterizzazione dei lipidi, quantificazione proteine, amido, clorofille e carotenoidi come di seguito brevemente riportate e approfondite in Appendice 1 (APHA 2012):

Analisi del peso secco

L'analisi del peso secco consente di monitorare la crescita della coltura microalgale misurando il quantitativo di biomassa secca residua dopo 24 ore in forno a 105°C su filtro in acetato di cellulosa. L'allontanamento della frazione liquida, ottenuto prima tramite pompa a vuoto e in seguito tramite passaggio in forno consente di determinare la quantità di biomassa in g l⁻¹ presente all'interno del fotobioreattore. Il valore del peso secco è determinato dall'equazione seguente (Eq 8):

$$\text{Peso secco (g l}^{-1}\text{)} = \frac{(P_1 \text{ (g)} - P_0 \text{ (g)})}{V \text{ (l)}} \quad \text{Eq 8}$$

Dove:

P_1 = peso del filtro con campione dopo passaggio in forno;

P_0 : peso del filtro vuoto.

Conta cellulare

La conta cellulare permette di determinare il numero di cellule per unità di volume di liquido (milioni di cellule ml^{-1}) tramite di camera di conta di Bürker (Figura 7) utilizzando il microscopio ottico da banco con ingrandimento 40X.

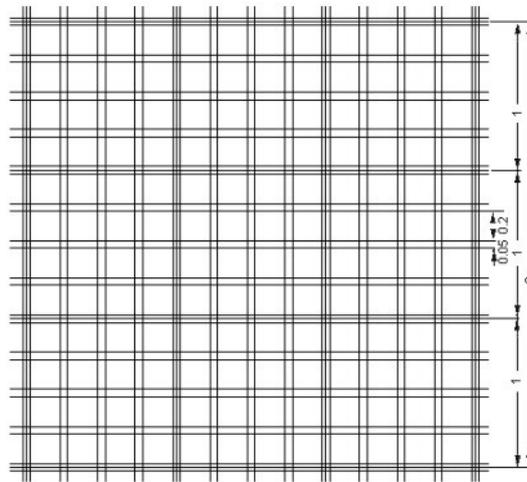


Figura 7: Camera di conta Bürker.

La camera di conta di Bürker è composta da un reticolo di 9 quadrati delimitati da doppia riga; ogni quadrato è suddiviso in ulteriori 16 quadrati più piccoli. La conta viene effettuata in 3 dei quadrati più grandi e in 8 delle doppie linee totali. L'equazione che consente di determinare il numero di cellule è la seguente (Eq 9):

$$\text{Milioni di cellule ml}^{-1} = \text{Somma delle cellule contate nei tre quadrati} * 3 * V_{\text{campione}} \quad \text{Eq 9}$$

Quantificazione dei lipidi totali

L'analisi di estrazione e quantificazione dei lipidi totali viene effettuata seguendo il Metodo Folch (1957). Questo metodo si avvale dell'uso di una soluzione cloroformio:metanolo in rapporto 2:1 come solvente e viene effettuato su un campione di biomassa liofilizzata e finemente tritata. In seguito a centrifugazione, il surnatante viene lavato con acqua e NaCl. L'analisi gravimetrica si avvale di palloni in vetro per RotaVapor e il quantitativo totale di lipidi viene calcolato secondo la seguente equazione (Eq 10):

$$\text{Lipidi totali (\%)} = ((P_1 - P_0) / g_{\text{biomassa pesata}}) * 100 \quad \text{Eq 10}$$

Dove:

P_1 = peso del pallone con il campione dopo passaggio in RotaVapor;

P_0 = peso del pallone vuoto.

Caratterizzazione della frazione lipidica

L'analisi di caratterizzazione della frazione lipidica (effettuata con GC-MS) consente di ottenere il profilo degli acidi grassi che compongono l'olio microalgale. Questa analisi serve a verificare la compatibilità dell'olio microalgale con l'utilizzo per la produzione di biodiesel, in quanto gli Standard Europei EN14214 e EN14213 richiedono una concentrazione di C18:3 (acido linolenico) inferiore al 12%.

Quantificazione Clorofille a e b e Carotenoidi

Le clorofille e i carotenoidi sono dei pigmenti fotorecettori responsabili della cattura dell'energia luminosa che consente alle cellule microalgali di svolgere il processo fotosintetico, in particolare la clorofilla a. Le due tipologie di clorofilla esistenti (a e b), differiscono nella composizione della catena laterale: la prima presenta un gruppo metilico (-CH₃) mentre la seconda presenta un gruppo aldeidico (-CHO). Ciò si traduce in diversi spettri di assorbimento della luce: la clorofilla a infatti presenta i picchi di assorbimento della luce approssimativamente a 430 nm e 662 nm, mentre la clorofilla b a 453 nm e 642 nm. Clorofilla b e carotenoidi svolgono soprattutto il ruolo di pigmenti accessori; con questo termine vengono indicati i pigmenti che assorbono lunghezze d'onda che la clorofilla a assorbe di meno. Il monitoraggio della concentrazione dei pigmenti nei microrganismi fotosintetici può evidenziare eventuali condizioni di stress colturale, che influenzerebbero anche la produzione di lipidi e proteine (Chen et al., 2013). L'analisi prevede l'utilizzo di metanolo come solvente. I quantitativi di clorofilla a e b e carotenoidi possono essere definiti tramite analisi spettrofotometrica a 665.2 nm, 652.4 nm e 470 nm. Di seguito sono riportate le equazioni di calcolo (Eq 11, 12 e 13):

$$Ch\ a\ (\mu g\ ml^{-1}) = \frac{(16.72 * OD_{665.2}) - (9.16 * OD_{652.4})}{V_{campione}} \quad Eq\ 11$$

$$Ch\ b\ (\mu g\ ml^{-1}) = \frac{(34.09 * OD_{652.4}) - (15.28 * OD_{665.2})}{V_{campione}} \quad Eq\ 12$$

$$Carotenoidi\ totali\ (\mu g\ ml^{-1}) = \frac{(1000 * OD_{470}) - (1.63 * Ch\ a) - (104.96 * Ch\ b)}{221 * V_{campione}} \quad Eq\ 13$$

Quantificazione delle proteine totali

Questa analisi consente di determinare il quantitativo di proteine totali presenti nella biomassa microalgale. Eventuali cambiamenti nella concentrazione delle proteine possono riflettere il tasso di attività metabolica di cellule microalgali attive e in fase di crescita. Questa analisi si avvale di una soluzione NaOH 0.5 M e del Kit Buiuret (reagente a base di solfato di rame). Il principio del metodo è che le proteine in

ambiente basico e in presenza di Cu^{2+} formano un complesso di colore violetto che si misura allo spettrofotometro a 540 nm. La retta di taratura viene fatta con albumina bovina.

Analisi dell'amido totale

Attraverso questa analisi è possibile determinare il quantitativo di amido presente nella biomassa microalgale. Questo metodo prevede l'utilizzo dell'enzima α -amilasi che consente di ottenere maltodestrine in seguito a bagno riscaldato a 100°C . Le maltodestrine vengono idrolizzate in D-glucosio tramite aggiunta di AMG (amiloglucosidasi). Di fatto, questa analisi determina il contenuto di D-glucosio nel campione, che è stechiometrico rispetto alla quantità di amido. La formula per ottenere il valore percentuale di amido è la seguente (Eq 14 e 15):

$$\text{Starch, \%} = (A - A^B) \times F \times \frac{EV}{0.1} \times D \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \quad \text{Eq 14}$$

$$F = \frac{100}{\left(\frac{F^1 + F^2 + F^3 + F^4}{4}\right)} \quad \text{Eq 15}$$

Dove:

F = fattore che converte i valori di assorbanza in μg di glucosio;

EV = volume di campione estratto in ml [$2.5 \text{ ml} + 0.025 \text{ ml} + 0.025 \text{ ml} = 2.55 \text{ ml}$];

0.1 = volume di campione analizzato in ml;

D = fattore di diluizione;

1/1000 = conversione da μg a mg;

100/W = conversione a 100 mg;

W = peso del campione in mg;

162/180 = fattore che converte il risultato da glucosio libero (determinato dal metodo) ad anidroglicio (amido).

3.2 Digestione anaerobica della feccia vinicola bianca e rossa e caratterizzazione del digestato

Il digestato vinicolo utilizzato per le sperimentazioni di alimentazione in semi-continuo proviene dall'impianto a scala laboratorio di digestione anaerobica di reflui vinicoli presente nello stesso laboratorio (Vega, edificio Ex-INCA) dell'Università Ca' Foscari di Venezia (Italia). Il sistema di digestione anaerobica è alimentato a feccia vinicola (inizialmente feccia bianca e successivamente feccia rossa) e fanghi attivi (waste activated sludge, WAS) entrambe provenienti dal sistema di trattamento delle acque presente all'interno della cantina di vinificazione (Nord Italia).

Il digestato uscente dal sistema di digestione anaerobica è stato caratterizzato periodicamente mediante analisi dei solidi totali e volatili (TS e TVS), alcalinità parziale e totale, pH, azoto ammoniacale e domanda chimica di ossigeno sulla frazione solubile (sCOD) usando il metodo di analisi delle acque reflue APHA (APHA, 2012) (Tabella 8). In Tabella 8 sono riportati anche i contenuti medi in termini di metalli pesanti (Da Ros et al., 2014). Per il digestato proveniente da feccia bianca il sistema di digestione anaerobica ha lavorato a stabilità per 175 giorni con un tempo di ritenzione idraulica (HRT) di 20 giorni, materiale organico solubile e particolato applicato (OLR) di $2.21 \text{ g COD m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, produttività di biogas di $4.92 \pm 0.15 \text{ l d}^{-1}$ e produzione specifica di biogas (SGP) di $0.39 \pm 0.01 \text{ m}^3_{\text{biogas}} \text{ kgCOD}^{-1}$. Il digestato usato nelle sperimentazioni è stato solamente centrifugato a 9000 rpm e filtrato su filtro a fascia nera per rimuovere la frazione solida per essere poi utilizzato direttamente per le sperimentazioni senza ulteriori pretrattamenti di sterilizzazione (i.e. filtrazione o autoclave).

Tabella 8: Caratterizzazione del digestato alimentato al fotobioreattore (dopo separazione solido-liquido).

TS (g l^{-1})	0.24 ± 0.16
pH	7.58 ± 0.07
Alcalinità totale ($\text{g CaCO}_3 \text{ l}^{-1}$)	1.96 ± 0.01
Alcalinità parziale ($\text{g CaCO}_3 \text{ l}^{-1}$)	1.45 ± 0.20
sCOD (g sCOD l^{-1})	0.18 ± 0.05
Na^+ (g l^{-1})	1.07 ± 0.97
NH_4^+ (g l^{-1})	0.71 ± 0.03
K^+ (g l^{-1})	0.83 ± 0.14
Mg^{2+} (g l^{-1})	0.82 ± 0.93
Ca^{2+} (g l^{-1})	2.12 ± 1.21
Cd ($\text{mg kg}_{\text{dw}}^{-1}$)	1.6 ± 0.3
Cr ($\text{mg kg}_{\text{dw}}^{-1}$)	48.4 ± 1.6
Cu ($\text{mg kg}_{\text{dw}}^{-1}$)	929.0 ± 319.6
Ni ($\text{mg kg}_{\text{dw}}^{-1}$)	25.8 ± 1.4
Pb ($\text{mg kg}_{\text{dw}}^{-1}$)	114.6 ± 32.2
Zn ($\text{mg kg}_{\text{dw}}^{-1}$)	1198.9 ± 76.9
Hg ($\text{mg kg}_{\text{dw}}^{-1}$)	0.4 ± 0.1

3.3 Disegno sperimentale

La sperimentazione ha utilizzato il consorzio microalghe-batteri coltivato su fotobioreattori tubolari verticali con volume utile di 4 litri (RUN 1, Figura 2) e su cilindri di vetro graduati con volume utile di 1 litro (RUN 2). Il sistema è stato mantenuto in condizione mixotrofica tramite illuminazione artificiale con lampade al neon ($10.17 \pm 1.12 \text{ klux}$) a luce bianca e aerazione (3.50 l min^{-1}) in continuo a temperatura ambiente (circa 20°C). La sperimentazione è stata divisa in due test: coltivazione su lungo periodo (RUN 1, 47 giorni di HRT) e su breve periodo (RUN 2, 10 giorni di HRT) qui di seguito descritti.

3.3.1 Coltivazione del consorzio microalghe-batteri su lungo periodo (RUN 1 con HRT = 47 giorni)

Il consorzio microalghe-batteri è stato coltivato in condizione di mixotrofia utilizzando un reattore dedicato alla condizione di controllo alimentata in semi-continuo con BG11 ed un reattore dedicato alla condizione sperimentale con alimentazione in semi-continuo con surnatante di digestato da feccia di vinificazione bianca. Il tempo di ritenzione idraulica (HRT espresso in giorni e calcolato come il rapporto tra il volume di reattore e la portata dell'influente) era inizialmente impostato a 28 giorni; questa condizione operativa è stata però successivamente modificata a causa dell'emergenza sanitaria. Infatti, la riduzione degli accessi ha condizionato il lavoro sperimentale, e si è scelto di operare considerando la disponibilità del digestato. L'alimentazione quindi è stata effettuata 3 volte a settimana, raggiungendo un HRT di 47 giorni. Il carico organico applicato (Organic Loading Rate OLR) è stato di $3.85 \text{ mg sCOD/l}_{\text{reattore}} \text{ d}$. Il tempo totale di sperimentazione è stato di 184 giorni in modo da completare quattro cicli di HRT. Le analisi di monitoraggio e caratterizzazione della biomassa e dell'*output* sono state effettuate in copia per ogni condizione sperimentale.

3.3.2 Coltivazione del consorzio microalghe-batteri su breve periodo (RUN 2 con HRT = 10 giorni)

Per la sperimentazione su breve periodo sono state mantenute le stesse condizioni operative di mixotrofia ed è stato applicato un HRT di 10 giorni (alimentando 5 giorni a settimana) usando digestato da feccia vinicola bianca e rossa uscente dal sistema di gestione anaerobica, per entrambe le copie sperimentali. La sperimentazione ha avuto una durata complessiva di 42 giorni in modo da completare quattro cicli di HRT. Il carico organico applicato (OLR) è stato di $18 \text{ mg sCOD/l}_{\text{reattore}} \text{ d}$. Le analisi di monitoraggio e caratterizzazione della biomassa e dell'*output* sono state effettuate in copia per ogni condizione sperimentale.

3.4 Caratterizzazione dell'effluente

L'effluente è stato prelevato dal fotobioreattore e conservato a -20°C durante il periodo di lock-down e successivamente caratterizzato. I parametri valutati sono riportati brevemente di seguito (e successivamente approfonditi in Appendice 1). Le analisi sono state effettuate mediante metodi analitici riportati negli standard methods per le acque (APHA 2012):

Determinazione del pH: Il pH è stato determinato giornalmente utilizzando pHmetro Hanna Instruments. La misurazione è stata effettuata su campioni filtrati a $0.45 \mu\text{m}$. Per ogni campione l'analisi è stata effettuata in duplicato. La taratura dello strumento veniva effettuata una volta a settimana.

Analisi del COD solubile: L'analisi del sCOD consente di quantificare la domanda chimica di ossigeno (COD) della frazione solubile presente nel campione. Pertanto, questa analisi è una misurazione indiretta della materia biologica ossidabile chimicamente in presenza di un forte ossidante in ambiente acido a

caldo. Seguendo gli standard methods (APHA 2012) è stato utilizzato dicromato di potassio come agente ossidante e acido solforico. La digestione viene eseguita a 150°C per due ore. Il quantitativo di sCOD presente nei campioni viene determinato dividendo il valore ottenuto dalla lettura allo spettrofotometro (600 nm) per il coefficiente 0.0004 ottenuto dalla retta di calibrazione. Per il calcolo della rimozione del sCOD viene utilizzata la stessa equazione descritta di seguito per calcolare la rimozione dei cationi (Eq 16).

Cromatografia ionica: La cromatografia ionica cationica consente di determinare il quantitativo di cationi (Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+}) in mg l^{-1} . Questa analisi è stata svolta sia sull'effluente prelevato dal fotobioreattore sia sul digestato utilizzato come mezzo colturale. Ciò ha consentito il monitoraggio quotidiano della concentrazione dei cationi e ha permesso di calcolare le rimozioni percentuali dei nutrienti presenti nel digestato, e di conseguenza la capacità fitodepurativa del consorzio microalghe-batteri.

Questo calcolo è stato fatto considerando la rimozione giornaliera di nutrienti dall'influente da parte del consorzio microalghe-batteri secondo la seguente equazione (Eq 16):

$$\% \text{ Rimozione} = \left(\frac{(Q_{in} * C_{in}) - (Q_{out} * C_{out})}{(Q_{in} * C_{in})} \right) \times 100 \quad \text{Eq 16}$$

Dove:

Q_{in} = Portata in ingresso al reattore;

C_{in} = Concentrazione del nutriente in ingresso al reattore;

Q_{out} = Portata in uscita dal reattore;

C_{out} = Concentrazione del nutriente in uscita dal reattore.

Nello specifico il calcolo è stato effettuato considerando la portata giornaliera di 0.0857 l d^{-1} per RUN 1 e 0.1 l d^{-1} per RUN 2. Infatti, dato che RUN 1 è stato alimentato tre volte a settimana con 200 ml e che RUN 2 è stato alimentato cinque volte a settimana con 140 ml, su base giornaliera si ottengono i valori sopra riportati.

4. Risultati e Discussione

4.1 Crescita microalgale e produzione biomassa

Nei seguenti paragrafi sono discussi separatamente i due periodi sperimentali.

4.1.1 Risultati RUN 1

Nella figura 8 è riportato l'andamento della concentrazione di biomassa in uscita dal fotobioreattore. I primi 2,5 HRT corrispondono al periodo di chiusura del laboratorio (da giorno 0 a 126), dove i campioni sono stati conservati a -20°C ed analizzati alla ripresa delle attività. Per tutta la durata della sperimentazione è stata monitorata la crescita del consorzio microalghe-batteri attraverso l'analisi del peso secco e la conta cellulare. L'analisi del peso secco della coltura ha mostrato un andamento della concentrazione di biomassa stabile a $2.2 \pm 0.13 \text{ g l}^{-1}$ nella condizione di stato stazionario ottenuta nell'ultimo HRT. La coltura alimentata con terreno sintetico BG11 (controllo) ha mostrato un andamento opposto a quello ottenuto dalla condizione sperimentale, evidenziando la prima fase esponenziale, poi stazionaria ed in fine di morte cellulare probabilmente associata alla carenza di vitamine assenti nel mezzo colturale (Tandon et al., 2017) (Figura 8).

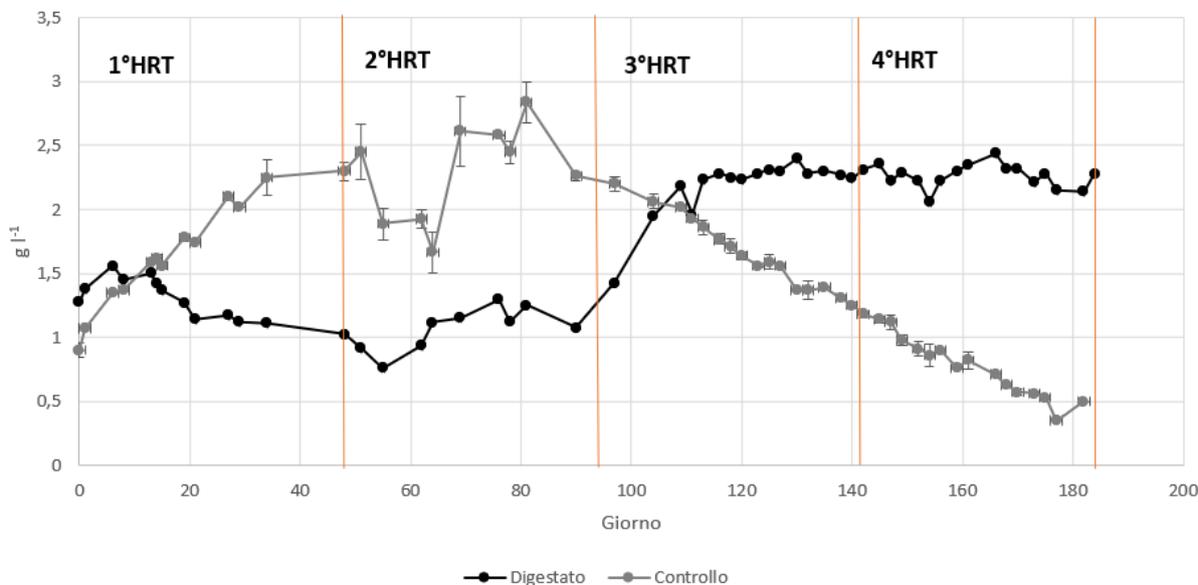


Figura 8: Analisi del peso secco della coltivazione del consorzio microalghe-batteri in RUN 1 per la condizione sperimentale (Digestato) e controllo (Controllo).

La stabilità del sistema, per la condizione sperimentale con digestato vinicolo, è stata riscontrata anche nell'analisi di conta cellulare, dove la coltura ha mostrato un valore medio di 763.5 ± 94 milioni di cellule ml^{-1}

¹, mentre nella condizione di controllo si ha una diminuzione progressiva verso le ultime fasi della sperimentazione. Il valore medio riscontrato per il controllo durante l'ultimo HRT è risultato di 166.69 ± 56.62 milioni di cellule ml^{-1} (Figura 9).

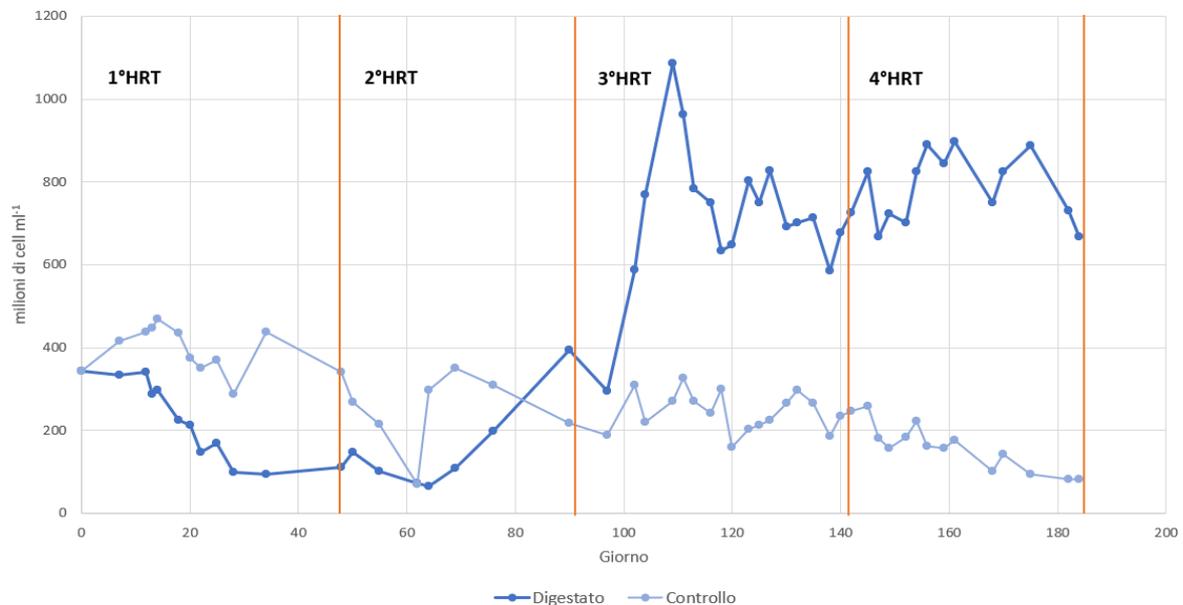


Figura 9: Analisi di conta cellulare della coltivazione del consorzio microalghe-batteri in RUN 1 per la condizione sperimentale (Digestato) e controllo (Control).

L'HRT è il parametro determinato dal rapporto tra il volume del reattore ed il volume giornaliero del mezzo colturale (digestato) utilizzato per l'alimentazione (Wang et al., 2010). Non ci sono in letteratura esempi di coltivazioni in semi-continuo di consorzi microalghe-batteri su digestato con tempi di ritenzione idraulica così lunghi; risulta pertanto complesso confrontare i risultati ottenuti in questa parte della sperimentazione con studi precedenti. Tuttavia, osservando insieme i dati ottenuti per il monitoraggio della conta cellulare e del peso secco, si può osservare un *trend* confrontabile.

Per le coltivazioni in semi-continuo per il trattamento del digestato viene solitamente applicato un HRT più basso, ad esempio 7 giorni (Amini et al., 2020) o 10 giorni (Marazzi et al., 2019; Pizzera et al., 2019); in questo caso, nonostante la portata del refluo trattata sia molto diluita (con un conseguente carico organico di $3.85 \text{ mg sCOD l}^{-1}\text{d}^{-1}$) è stato appurato che il sistema si stabilizza comunque ad alti valori di crescita microalgale. Se quindi da un lato applicando un HRT alto si ha un aumento dei tempi di trattamento del refluo, con conseguente aumento dei costi, dall'altro si ottiene produzione di biomassa elevata e stabile nel lungo periodo.

4.1.2 Risultati RUN 2

La seconda fase della sperimentazione (RUN 2) ha previsto l'applicazione di un HRT inferiore (10 giorni). Il monitoraggio della crescita della biomassa attraverso le analisi del peso secco e della conta cellulare è stato effettuato giornalmente. Come si evidenzia nelle Figure 10 e 11, vi è stata una diminuzione della biomassa prodotta rispetto alla coltivazione nel RUN 1. Durante il periodo di stato pseudo-stazionario considerato, coincidente con il terzo HRT, la concentrazione di biomassa media ottenuta è stata di $0.94 \pm 0.06 \text{ g l}^{-1}$, con una densità cellulare di 75.83 ± 19.71 milioni di cellule ml^{-1} .

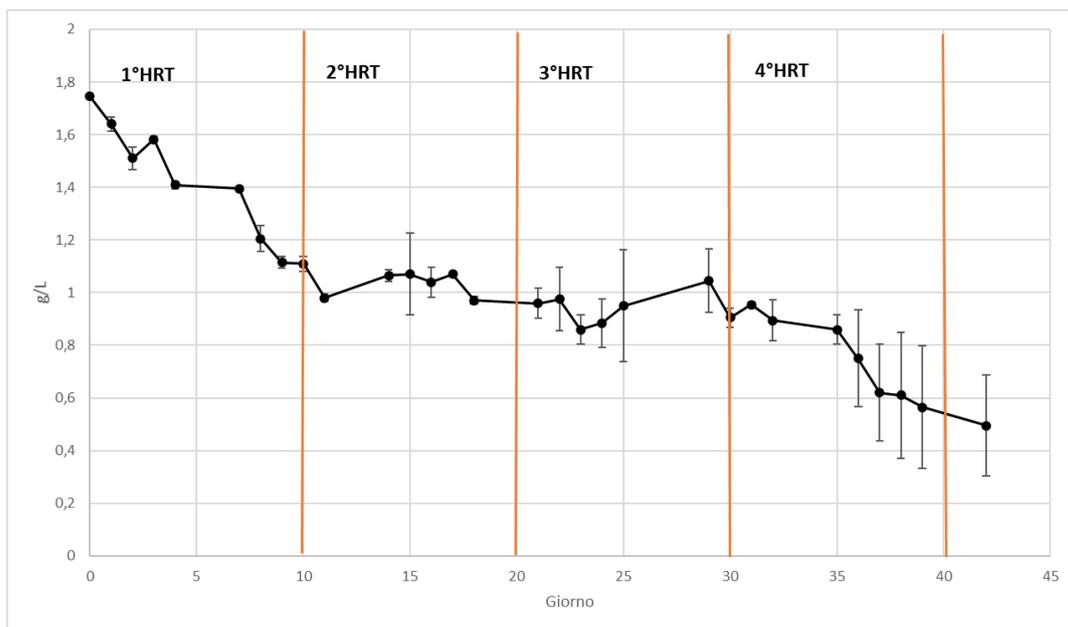


Figura 10: Analisi del peso secco della coltivazione del consorzio microalga-batteri in RUN 2.

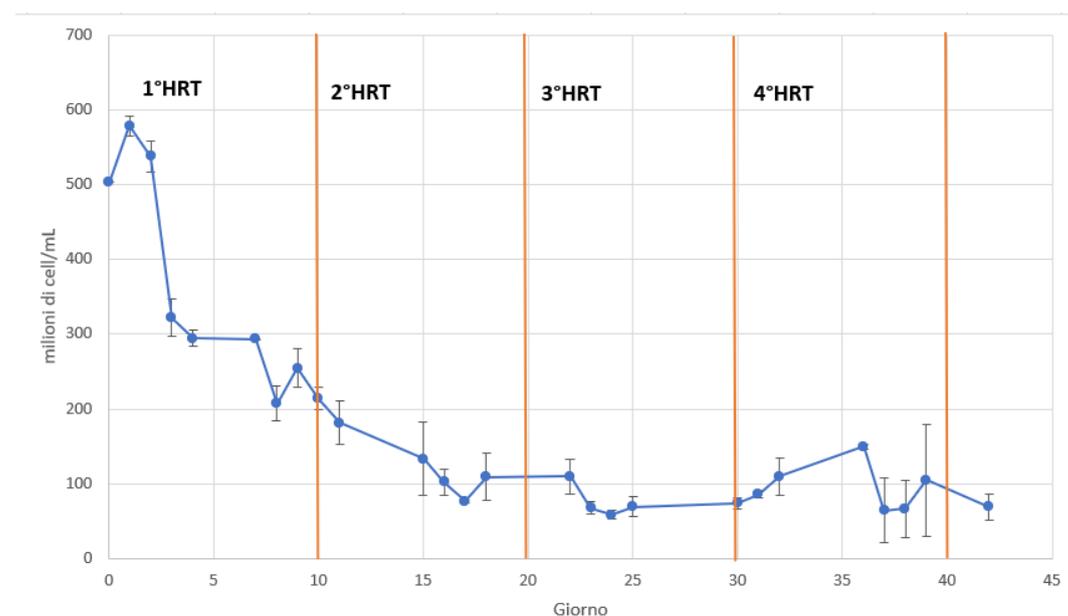


Figura 11: Analisi della conta cellulare della coltivazione del consorzio microalga-batteri in RUN 2.

Questi risultati sono confrontabili con quanto riportato da Marazzi et al. (2019), con una concentrazione di biomassa di $0.8 \pm 0.06 \text{ g l}^{-1}$ per *Chlorella* sp. coltivata in semi-continuo su reflui da allevamento con HRT di 10 giorni, con una densità cellulare inferiore rispetto a questa sperimentazione (9.17 ± 1.27 milioni di cellule ml^{-1}). Lo studio condotto da Pizzera et al. (2019) riporta una concentrazione di biomassa di $0.5 \pm 0.3 \text{ g l}^{-1}$ per un consorzio microalghe-batteri coltivato in *open pond* e alimentato con digestato agricolo, anche in questo caso con HRT di 10 giorni. Chu et al. (2015) dimostra il potenziale di una coltivazione microalgale in semi-continuo a lungo termine, analizzando la crescita di *Chlorella pyrenoidosa* su digestato da reflui di lavorazione dell'amido e confrontando diversi HRT. Nello specifico ottiene una concentrazione di biomassa di $0.79 \pm 0.06 \text{ g l}^{-1}$ con HRT di 2 giorni e $1.82 \pm 0.11 \text{ g l}^{-1}$ con HRT di 10 giorni.

Il rischio principale di coltivazioni in continuo o semi-continuo con bassi HRT (caratterizzati da volumi ingenti di biomassa allontanata dal sistema) è rappresentato dal *wash out* (Takabe et al., 2016). Questo termine indica la condizione che si verifica quando la velocità di estrazione della biomassa è superiore a quella di produzione di biomassa all'interno del fotobioreattore. Il problema delle coltivazioni in semi-continuo su acque reflue o digestato risiede proprio nel limitato range di HRT applicabile: con HRT troppo lunghi si ha un eccessivo aumento dei tempi (e di conseguenza dei costi) del trattamento e una riduzione dell'efficienza di rimozione dei nutrienti. Inoltre, lunghi HRT comportano reattori più grandi e di conseguenza una maggiore richiesta in termini di spazio. Dall'altro lato, l'applicazione di HRT troppo brevi può determinare una bassa produttività in termini di biomassa e il rischio di *wash out* del sistema. In questa sperimentazione, il *wash out* del sistema è stato identificato nel RUN 2 in corrispondenza del quarto HRT dove si evince un decremento della produzione di biomassa nelle ultime fasi della sperimentazione, con conseguente diminuzione di peso secco e conta cellulare i cui dati hanno mostrato anche elevata variabilità. In Tabella 9 viene riportata una sintesi dei dati ottenuti per quanto riguarda la crescita cellulare e la produzione di biomassa durante gli stati stazionario e pseudo-stazionario considerati per RUN 1 e RUN 2.

Tabella 9: Confronto dei risultati di peso secco e conta cellulare per RUN 1 e RUN 2.

	RUN 1	RUN 2
Peso secco (g l^{-1})	2.2 ± 0.13	0.94 ± 0.06
C. cell (milioni di cell ml^{-1})	763.5 ± 94	75.83 ± 19.71

Effettuando un confronto diretto tra le due sperimentazioni, risulta evidente che per ottenere un elevato e costante valore di produzione di biomassa sia conveniente applicare un HRT maggiore. Infatti, la coltura sperimentale alimentata con digestato vinicolo con HRT di 47 giorni si stabilizza al di sopra dei 2 g l^{-1} e ciò rappresenta un risultato ancora non riscontrato in letteratura. Tuttavia, dalla definizione stessa di HRT, rapporto tra volume del reattore e volume di alimentazione, risulta il limite di applicabilità di un alto HRT negli impianti di trattamento di reflui. Alti HRT non possono essere utilizzati nei grandi impianti di trattamento in quanto si allungherebbero i costi e le tempistiche di trattamento del digestato.

4.2 Rimozione nutrienti e fitodepurazione

Numerosi studi hanno evidenziato la possibilità di combinare la produzione di biodiesel da biomassa microalgale con la fitodepurazione delle acque reflue, rendendo il processo compatibile con l'ambiente (effettuando la fitodepurazione dei reflui), conveniente a livello economico e redditizia (Rawat et al., 2011; Li et al., 2011; Ahmad et al., 2013; Kligerman e Bouwer, 2015). L'applicazione delle microalghe al trattamento terziario dei reflui ha lo scopo principale di rimuovere N e P, responsabili del fenomeno di eutrofizzazione (Arbib et al., 2014). Per valutare la capacità di rimozione degli ioni durante le due sperimentazioni a differenti HRT, è stato monitorato l'effluente del sistema giornalmente.

Di seguito viene riportata la caratterizzazione dell'effluente prelevato dal per RUN 1 e RUN 2 in termini di pH, sCOD e cationi (Tabella 10).

Tabella 10: Caratterizzazione dell'effluente in condizioni di stato pseudo-stazionario per RUN 1 e RUN 2.

Caratterizzazione Effluente	RUN 1	RUN 2
pH	8.76 ± 0.34	9.03 ± 0.07
sCOD (g sCOD l ⁻¹)	0.24 ± 0.06	0.14 ± 0.01
Na ⁺ (g l ⁻¹)	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.00
NH ₄ ⁺ (g l ⁻¹)	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.00
K ⁺ (g l ⁻¹)	0.27 ± 0.01	0.32 ± 0.02
Mg ²⁺ (g l ⁻¹)	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Ca ²⁺ (g l ⁻¹)	0.01 ± 0.00	0.05 ± 0.00

Di seguito vengono riportati i valori di rimozione percentuale dei cationi monitorati (NH₄⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺) e del COD solubile per RUN 1 e RUN 2 (Tabella 11).

Tabella 11: Valori di rimozione percentuale dei cationi durante la condizione di stato pseudo-stazionario in RUN 1 e in RUN 2.

	RUN 1	RUN 2
Na ⁺ (%)	77.49 ± 7.76	96.82 ± 0.33
NH ₄ ⁺ (%)	98.97 ± 0.79	90.00 ± 2.31
K ⁺ (%)	93.19 ± 2.02	59.97 ± 6.76
Mg ²⁺ (%)	90.11 ± 4.63	98.57 ± 0.37
Ca ²⁺ (%)	96.60 ± 2.13	98.82 ± 0.20
sCOD (%)	-	27.96 ± 3.53

Per quanto riguarda RUN 1, i risultati mostrano valori di rimozione elevati per l'ammoniaca ($98.97 \pm 0.79\%$). Questo dato è confrontabile con altri valori riscontrati in letteratura. In particolare, Van Do et al. (2020) analizza la coltivazione di un consorzio *Chlorella variabilis*-batteri in semi-continuo su acque reflue di origine domestica e ottiene una rimozione di ammoniaca del 94.1%, mentre Ledda et al. (2015) coltivando *Chlorella pyrenoidosa* su digestato da reflui di lavorazione dell'amido ottiene 95% di rimozione di ammonio da digestato centrifugato e 98% da digestato ultrafiltrato. Durante la seconda fase della sperimentazione (RUN 2) l'efficienza di rimozione dell'ammoniaca presenta invece un valore medio di $90.00 \pm 2.31\%$. Questi risultati sono simili a quelli riportati da Amini et al. (2020) che, coltivando in semi-continuo un consorzio *Chlorella vulgaris*-batteri in acque reflue municipali, ottiene una rimozione di ammonio di $88.00 \pm 1.00\%$. Wang et al. (2010) analizza la crescita di *Chlorella vulgaris* coltivata in semi-continuo su digestato da allevamento confrontando diversi HRT e relativa efficienza di rimozione dei nutrienti. Nello specifico con un HRT di 20 giorni ottiene un'efficienza di rimozione dell'ammonio del 100%, mentre applicando un HRT di 10 giorni la percentuale scende al $58.30 \pm 1.00\%$, diversamente da quanto accade in questa sperimentazione. Tipicamente, la rimozione dell'ammonio è associata ad un effetto congiunto di strippaggio ed utilizzo da parte delle specie microalgali (Gao et al., 2016). La concentrazione di ione ammonio in RUN 2 ha manifestato un andamento altalenante (Figura 12.b) che può essere associato ad una variazione dell'ammonio fornito come *input* del sistema (quindi le fluttuazioni stesse del digestato uscente dal sistema di digestione anaerobica).

Al contrario di quanto riscontrato per l'ammonio, le rimozioni di sodio, magnesio e calcio risultano maggiori in RUN 2 rispetto che in RUN 1. Nello specifico, per quanto concerne la rimozione di Na^+ sono stati riscontrati valori medi di $77.49 \pm 7.76\%$ per RUN 1 e $96.82 \pm 0.33\%$ per RUN 2; la rimozione media di Mg^{2+} risulta essere $90.11 \pm 4.63\%$ per RUN 1 e $98.57 \pm 0.37\%$ per RUN 2, mentre per Ca^{2+} i valori sono di $96.60 \pm 2.13\%$ per RUN 1 e $98.82 \pm 0.20\%$ per RUN 2. La percentuale di rimozione del potassio presenta invece valori di $93.19 \pm 2.02\%$ per RUN 1 e $59.97 \pm 6.76\%$ per RUN 2. Questa differenza seppur modesta di rimozione ionica può essere associata alla crescita della biomassa: infatti, per quanto in RUN 2 si manifesti il fenomeno di *wash out*, la rigenerazione cellulare ha un'attività incrementata rispetto al sistema a lungo periodo (RUN 1) a causa del carico organico più elevato e questo si può evincere proprio dalla rimozione degli ioni essenziali per l'attività fotosintetica ed enzimatica (Yao et al. 2013; Talebi et al. 2013). Data la maggiore costanza di monitoraggio del contenuto ionico del reattore durante RUN 2, vengono riportati in Figura 12 i profili di concentrazione per i vari cationi relativi a questa fase della sperimentazione.

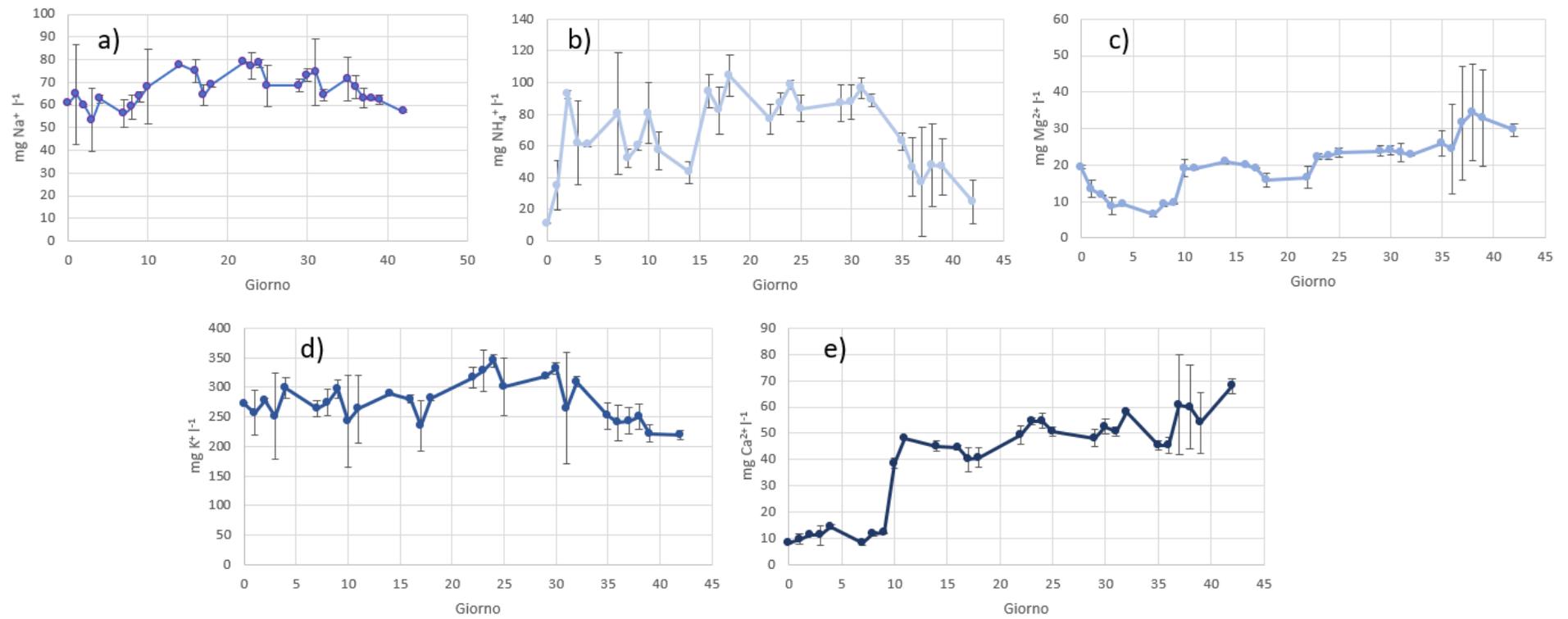


Figura 12: Andamento delle concentrazioni di Na⁺ (a), NH₄⁺ (b), Mg²⁺ (c), K⁺ (d) e Ca²⁺ (e) all'interno del fotobioreattore durante RUN 2 .

Per quanto riguarda la rimozione percentuale del COD solubile (sCOD), non è stata identificata nessuna rimozione durante RUN 1, mentre in RUN 2 è stata riscontrata una rimozione media percentuale del $27.96 \pm 3.53\%$. Questo valore risulta confrontabile con i dati ottenuti da Pizzera et al. (2019) che applicando un HRT di 10 giorni a un consorzio microalghe-batteri coltivato su digestato agricolo ottiene una rimozione di sCOD del $29 \pm 17\%$. I dati ottenuti da Pizzera et al. (2019) mostrano una deviazione standard elevata che può essere associata a vari fattori del sistema di digestione anaerobica, in quanto vengono utilizzati per l'alimentazione residui di tipologia stagionale che possono portare variazioni nel processo di digestione anaerobica (Scaglione et al., 2013). Inoltre, viene analizzato un consorzio microalghe-batteri, perciò la rimozione del sCOD può dipendere sia dal metabolismo mixotrofo delle microalghe sia da quello eterotrofo dei batteri; tuttavia i dati disponibili non sono sufficienti per distinguere i due contributi, così come in questo studio.

I dati di rimozione ionica ottenuti possono portare a due considerazioni per l'applicabilità del sistema a lungo e breve HRT applicato alla coltivazione di consorzi microalghe-batteri: se da una parte l'applicazione di un lungo HRT non risulta pienamente sostenibile su larga scala, mostra però un'elevata rimozione di ammonio ($98.97 \pm 0.79\%$) ed un'elevata e stabile produzione di biomassa ($2.2 \pm 0.13 \text{ g l}^{-1}$ in RUN 1 contro $0.94 \pm 0.06 \text{ g l}^{-1}$ per RUN 2) dalla quale è possibile ottenere prodotti secondari ad alto valore aggiunto. Alte quantità di biomassa vengono inoltre richieste per facilitare le modalità di raccolta dall'impianto, che come precedentemente sottolineato rappresenta il principale costo di produzione. La coltivazione in cui viene invece applicato un HRT breve mostra un forte effetto fitodepurativo del refluo, con alte rimozioni dei cationi in soluzione, ma necessita di reinserimento di biomassa mediante ricircolo per evitare l'effetto di *wash out* (Solmaz et al., 2020). Questo si potrebbe ottenere attraverso l'implementazione del PBR con una tecnologia a membrana (Honda et al., 2017).

4.3 Caratterizzazione della biomassa

Per entrambe le condizioni sperimentali è stata effettuata una caratterizzazione della biomassa uscente dal sistema in termini di composizione di proteine (%), lipidi (%), amido (%) e clorofilla a, b e carotenoidi totali ($\text{mg g}_{\text{biomassa}}^{-1}$) nelle condizioni di stato pseudo-stazionario considerato (corrispondenti al quarto HRT per RUN 1 e al terzo HRT per RUN 2) (Tabella 12). Nei paragrafi successivi sono riportate le discussioni dei risultati ottenuti per ogni singolo parametro.

Tabella 12: Confronto composizione della biomassa del consorzio microalghe-batteri in condizioni di pseudo-stabilità di RUN 1 e RUN 2.

	RUN 1	RUN 2
Lipidi (%)	20.00 ± 1.58	15.34 ± 5.00
Proteine (%)	44.39 ± 5.80	48.65 ± 5.33
Amido (%)	6.40 ± 0.60	5.73 ± 0.07
Clorofilla a ($\text{mg g}_{\text{biomassa}}^{-1}$)	3.86 ± 1.28	2.32 ± 0.26
Clorofilla b ($\text{mg g}_{\text{biomassa}}^{-1}$)	1.27 ± 0.20	0.68 ± 0.11
Carotenoidi ($\text{mg g}_{\text{biomassa}}^{-1}$)	1.72 ± 1.03	0.64 ± 0.15

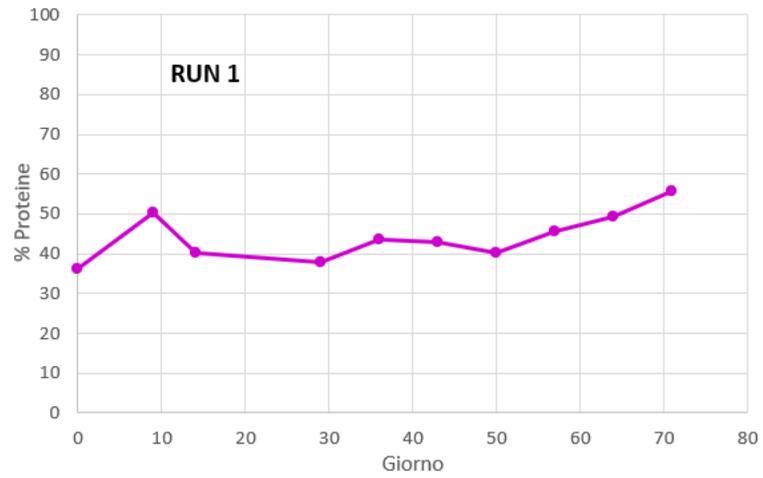
4.3.1 Proteine

Le analisi di caratterizzazione della biomassa alimentata con digestato vinicolo hanno mostrato un'alta percentuale di proteine per entrambe le condizioni sperimentali ($44.39 \pm 4.80\%$ per RUN 1 e $48.65 \pm 5.33\%$ per RUN 2) rispetto alla condizione di controllo relativa a RUN 1 alimentata con terreno sintetico BG 11 ($23.50 \pm 3.63\%$). I valori ottenuti sono confrontabili con i dati relativi alla coltivazione in semi-continuo di *Chlorella* sp. su reflui ad alto contenuto di ammonio che mostra una composizione percentuale in proteine compresa tra il 42% ed il 50% (Wang et al., 2020; He et al., 2013). I valori ottenuti risultano in linea anche con i dati riscontrati in letteratura (51-58%, Becker 2007). Arcila e Buitròn (2016) coltivano un consorzio microalghe-batteri in semi-continuo su acque reflue municipali applicando un HRT di 10 giorni e ottengono una percentuale di proteine di $58 \pm 3\%$, mentre Fernández-Linares et al. (2020) ottiene $59.5 \pm 7.5\%$ per un consorzio microalghe-batteri coltivato in semi-continuo in *open pond* su reflui da allevamento.

Per quanto riguarda la condizione di controllo la composizione percentuale di proteine risulta concorde con i dati ottenuti da Tan et al. (2020) del 25%. Tuttavia, in letteratura si possono trovare altri studi che riportano delle concentrazioni più elevate di proteine nella biomassa microalgale coltivata su mezzo sintetico: 38.9%, 40.5%, 41.3% e 39.8% per diverse specie del genere *Chlorella* sp. (Guccione et al., 2014). Ciò può dipendere dalle differenti condizioni di coltura, tra cui eventuali modificazioni del mezzo di crescita (utilizzo di urea come fonte di azoto invece che KNO_3), differenti prestazioni dei PBR, intensità luminosa, concentrazione dell'inoculo, tasso di aerazione (Tan et al., 2020). Più in generale, la produzione di proteine varia in base alle condizioni colturali, in particolare diminuisce quando la coltura è sottoposta a stress da

carenza di azoto, e si verifica invece un accumulo di lipidi. Questo dato emerge da varie sperimentazioni che analizzano la risposta a diverse condizioni colturali, in particolare carenza o presenza di azoto (Tan et al., 2020). Tuttavia, in questo caso l'alimentazione in semi-continuo non porta la coltura ad una condizione di carenze nutrizionali e quindi la percentuale di proteine risulta correttamente invariata come evidenziato dal monitoraggio temporale durante RUN 1 e RUN 2 (Figura 13). L'alto contenuto di proteine nella biomassa microalgale può comportare, tra le varie opportunità di utilizzo, la prospettiva della produzione di bioplastiche (Zeller et al., 2013) o integratori alimentari per l'acquacoltura e il bestiame (Laurens e McMillans, 2017).

a)



b)

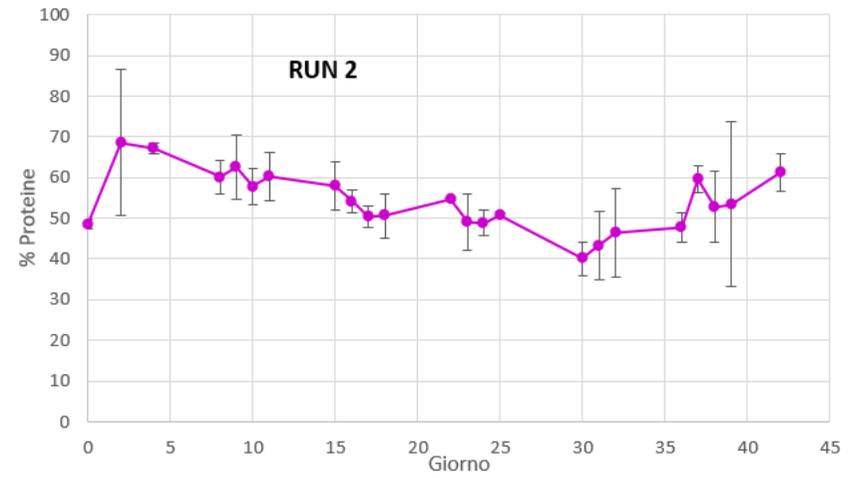


Figura 13: Quantitativo proteine totali (%) nella biomassa del consorzio microalghe-batteri in RUN 1 (a) e RUN 2 (b).

4.3.2 Amido

La composizione percentuale dell'amido totale sulla biomassa in uscita dal sistema in semi-continuo è stata effettuata solo sulle condizioni sperimentali e non sulla condizione di controllo data la quasi totale assenza di biomassa analizzabile. Nello specifico, il contenuto medio di amido nella biomassa del consorzio microalghe-batteri in condizioni stazionarie risulta essere di $6.40 \pm 0.60\%$ per RUN 1 e $5.73 \pm 0.07\%$ per RUN 2. I valori riscontrati sono inferiori rispetto ai dati presenti in letteratura, $10.7 \pm 3.60\%$, $16.8 \pm 2.80\%$ e 25% (Halfhide et al., 2014; Garcia-Cubero et al., 2018). A differenza di quanto accade nelle alghe rosse, nelle alghe verdi (Chlorophyta) l'amido viene sintetizzato esclusivamente nei cloroplasti con ADP-glucosio come donatore di glucosio, con lo stesso meccanismo in cui avviene nelle foglie delle piante superiori (Busi et al., 2014). Tale meccanismo dipende dalla disponibilità di carbonio, energia e nutrienti come azoto e fosforo. In condizioni di carenza di azoto a breve termine, in genere avviene un accumulo di amido. Alte disponibilità di fosforo invece determinano una diminuzione dell'accumulo di amido (Li et al., 2011). Allo stesso tempo, il *pathway* metabolico di sintesi dell'amido è strettamente associato al *pathway* di sintesi dei lipidi, infatti entrambi i prodotti secondari hanno un comune precursore: il gliceraldeide-3-fosfato. A livello molecolare, la sintesi dell'amido in condizione di stress culturale avviene prima della sintesi dei lipidi in quanto permette uno *storage* più veloce e semplice da utilizzare dal punto di vista energetico, e se le condizioni di stress permangono lo stesso amido degradato verrà utilizzato additionally alle altre fonti di carbonio per la sintesi e *storage* dei lipidi (Fan et al., 2012; Fernandes et al., 2013; Zhu et al., 2014). Date le condizioni sperimentali applicate con digestato vinicolo, probabilmente il basso accumulo di amido è legato alla non carenza di nutrienti nel mezzo di coltura. Sfortunatamente, la bassa concentrazione di amido riscontrata nella biomassa non permette il suo utilizzo come substrato di terza generazione per la produzione di bioetanolo o bioplastiche (Asada et al., 2012; Mathiot et al., 2020).

4.3.3 Lipidi

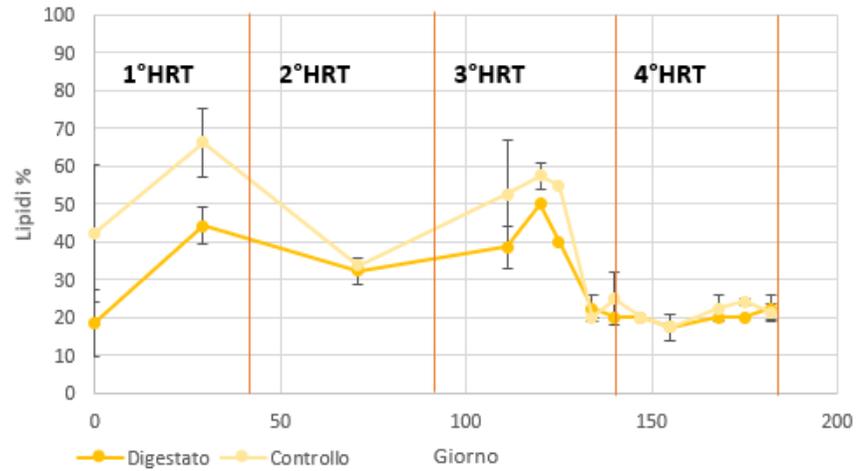
La quantificazione dei lipidi totali ha evidenziato un accumulo maggiore e più costante in RUN 1 ($20.00 \pm 1.85\%$) piuttosto che in RUN 2 ($15.34 \pm 5.00\%$). L'analisi per la quantificazione totale dei lipidi è stata svolta per tutta la durata di entrambe le fasi della sperimentazione, e il valore medio riportato è relativo allo stato stazionario (ultimo HRT per RUN 1) e pseudo-stazionario considerato (terzo HRT per RUN 2). Analizzando i dati relativi a RUN 1, si è evidenziato un accumulo importante di lipidi durante il terzo HRT, valore che poi è diminuito e si è stabilizzato durante lo stato stazionario (Figura 14.a). In RUN 2 invece l'accumulo di lipidi ha avuto un andamento differente in quanto è stata riscontrata una progressiva diminuzione della frazione lipidica. L'analisi visiva diretta al microscopio ottico con un ingrandimento 40X ha mostrato una variazione in dimensione delle cellule durante RUN 2; sovrapponendo il monitoraggio in dimensione con l'accumulo di

lipidi è possibile identificare una correlazione tra la diminuzione dell'accumulo di lipidi e le dimensioni cellulari (Figura 14.b). Per entrambe le fasi sperimentali (RUN 1 e RUN 2), il contenuto di lipidi a stabilità è concorde con i valori bibliografici (14-22%) riportati da Becker (2007) (Becker, 1994; Becker 2004) e anche con lo studio condotto da Chu et al. (2015) che riporta per *Chlorella pyrenoidosa* coltivata in semi-continuo su digestato proveniente da reflui di lavorazione dell'amido un contenuto di lipidi di $24.37 \pm 1.36\%$ con HRT di 20 giorni.

Arcila e Buitròn (2016) analizzano la crescita di consorzi microalghe-batteri a vari HRT per valutarne l'effetto sulla composizione della biomassa, identificando che con un HRT di 10 giorni la concentrazione di lipidi risulta del $9 \pm 2\%$. Tuttavia, secondo questo studio non è l'HRT a influire sul contenuto di lipidi, ma la concentrazione di azoto (Richardson et al., 1969). Questa ipotesi è stata indagata anche da altri studi, applicando sia quantitativi di azoto sufficienti che di deficit alle colture e differenti condizioni di coltura (i.e. temperatura, luce) ed è stato ottenuto che l'accumulo di lipidi è direttamente correlato al quantitativo di azoto disponibile per la cellula dove se è richiesta una produzione di lipidi elevata, si necessita di una condizione di limitazione di azoto (Loera-Quezada e Olguìn, 2010; González-Fernández et al., 2011). Pertanto, questi studi evidenziano come l'accumulo di lipidi nelle cellule microalgali sia correlato alla disponibilità di azoto nel mezzo colturale.

In generale, la coltivazione di microalghe in mixotrofia in condizione di stress da carenza di ammonio (ad esempio $20 \text{ mg l}^{-1} \text{ N-NH}_4^+$ (Feng et al. 2011)) porta tipicamente ad un accumulo maggiore di lipidi nella biomassa. Per quanto la percentuale di lipidi ottenuta in entrambe le fasi sperimentali risulti inferiore al 38% riportato da Feng et al. (2011), la frazione lipidica può comunque potenzialmente essere utilizzata per la produzione di biocarburanti unita all'effetto fitodepurativo sul refluo (Rawat et al., 2011; Salama et al., 2017; Fazal et al., 2018; Li et al., 2019). A questo proposito si è osservato un maggiore e soprattutto più costante accumulo di lipidi in RUN 1 ($20.00 \pm 1.58\%$ rispetto a $15.34 \pm 5.00\%$ di RUN 2) che può essere correlato alla maggiore efficienza di rimozione dell'azoto riscontrata in questa fase della sperimentazione ($98.97 \pm 0.79\%$ rispetto al $90.00 \pm 2.31\%$ in RUN 2) e anche al fatto che in RUN 1 l'alimentazione è stata fatta tre volte a settimana, in RUN 2 cinque volte a settimana. Questi due fattori possono aver comportato una condizione con azoto limitante nella coltura durante RUN 1 che ha determinato a sua volta una tendenza ad un accumulo di lipidi superiore nella biomassa del consorzio in RUN 1 piuttosto che in RUN 2.

a)



b)

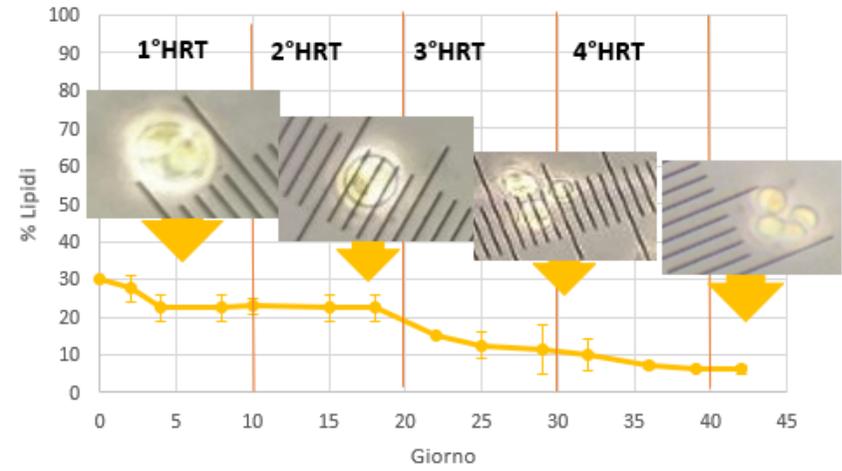


Figura 14: Monitoraggio del quantitativo di lipidi totali (%) nella biomassa del consorzio microalghe-batteri in RUN 1 (a) nelle condizioni sperimentali con digestato vinicolo (Digestato) e BG11 (Controllo) e in RUN 2 (b) con immagini dirette a microscopio ottico con ingrandimento 40X con micrometro.

4.3.4 Clorofille a e b e carotenoidi

La quantificazione di clorofilla a, b e carotenoidi totali è stata effettuata sulla biomassa uscente dal sistema di alimentazione in semi-continuo per la condizione di controllo e le condizioni sperimentali alimentate a digestato vinicolo (RUN 1 e RUN 2). La quantificazione dei pigmenti presenti all'interno della biomassa risulta un'analisi fondamentale se lo scopo della coltivazione è la produzione di biodiesel; l'eccessiva presenza di clorofille può influire negativamente sui processi di produzione (transesterificazione) e combustione del biodiesel prodotto, determinandone inoltre una colorazione opaca in quanto la metodologia di estrazione chimica degli oli comporta anche l'estrazione dei pigmenti (Li et al., 2016). Per ovviare quindi alla presenza di pigmenti fotosintetici all'interno dell'olio estratto sono state identificate diverse metodologie applicabili, come la saponificazione con NaOH prima dell'estrazione chimica con metanolo-cloroformio (Sandani et al., 2020). Le analisi hanno evidenziato in RUN 1 un notevole accumulo di tutti e tre i pigmenti analizzati ($8.50 \pm 1.28 \text{ mg l}^{-1}$ di Ch a, $2.80 \pm 0.20 \text{ mg l}^{-1}$ di Ch b e $3.78 \pm 1.03 \text{ mg l}^{-1}$ di carotenoidi totali). L'analisi dei pigmenti durante RUN 2 invece ha mostrato un andamento decrescente nel tempo (Figura 15) determinato probabilmente dalla condizione di *wash out* del sistema. Nello specifico i valori medi relativi allo stato pseudo-stazionario sono di $1.77 \pm 0.37 \text{ mg l}^{-1}$ di Ch a, $0.76 \pm 0.08 \text{ mg l}^{-1}$ di Ch b e $0.51 \pm 0.22 \text{ mg l}^{-1}$ di carotenoidi totali. Per quanto si abbia una diminuzione del quantitativo di clorofilla a, i valori di clorofilla b e carotenoidi totali risultano invece costanti nel tempo, confrontabili con i dati ottenuti da Nwoba et al. (2016), che riporta valori di $1.76 \pm 0.12 \text{ mg l}^{-1}$, $0.28 \pm 0.06 \text{ mg l}^{-1}$ e $0.03 \pm 0.08 \text{ mg l}^{-1}$ per clorofilla a, b e carotenoidi rispettivamente, in *Chlorella* sp. coltivata in semi-continuo su digestato da allevamento di suini in vasca aperta. La clorofilla a è il principale fotorecettore responsabile dell'assorbimento della radiazione luminosa, ma anche clorofilla b e carotenoidi hanno un ruolo importante nel processo fotosintetico (Hosikian et al., 2010). La curva relativa ai carotenoidi totali in RUN 2 non subisce grandi variazioni, mantenendo per tutta la durata della sperimentazione un andamento costante senza mostrare nessun accumulo. Queste analisi dimostrano che la coltura non ha subito particolari stress o effetti inibitori della crescita: infatti, condizioni di stress soprattutto dovute a carenza di nutrienti si manifestano con degradazione delle clorofille e accumulo di carotenoidi (Zuliani et al., 2016). Un confronto del quantitativo di pigmenti rispetto ai valori di peso secco ottenuti mostra che, applicando HRT brevi con condizione di *wash out*, vi è una correlazione tra le due serie di dati che mostrano lo stesso andamento, soprattutto per quanto riguarda la curva della Clorofilla a (Figura 15).

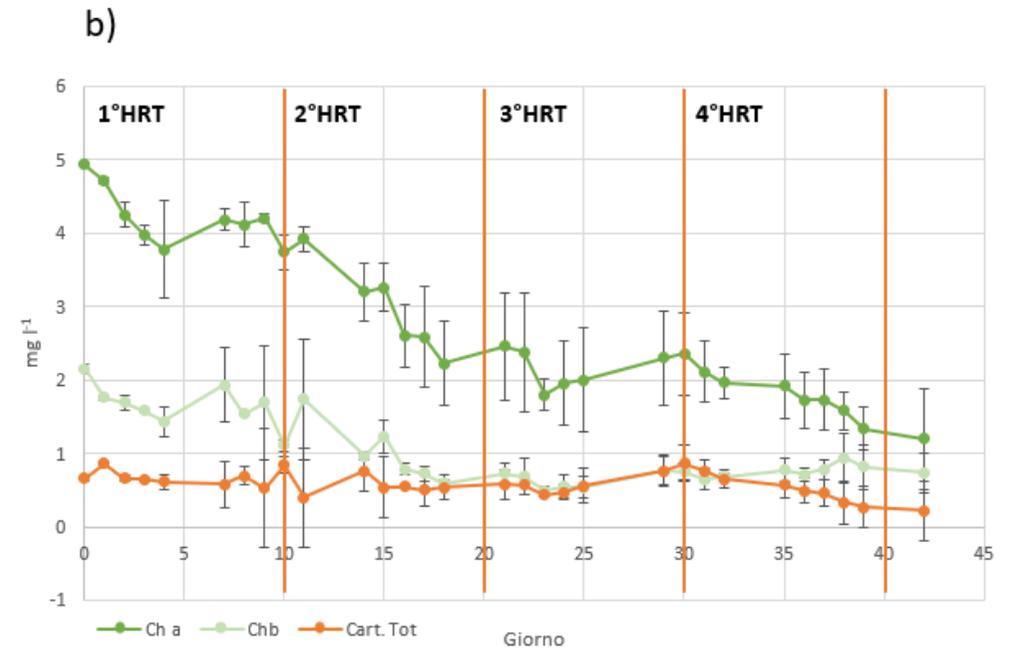
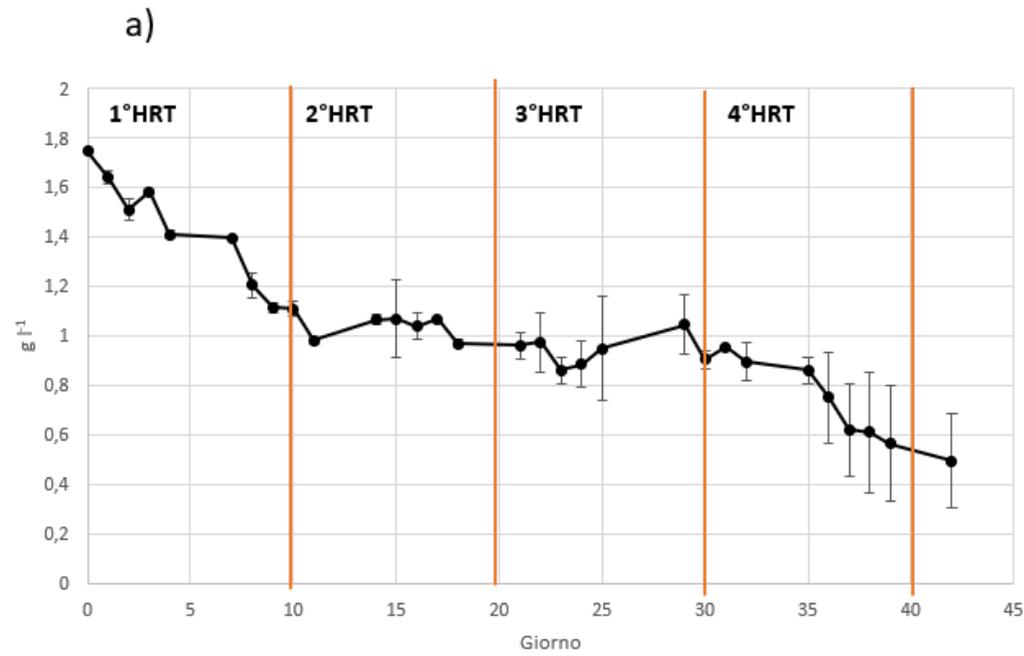


Figura 15: Quantitativo di clorofilla a (Ch a), clorofilla b (Ch b) e carotenoidi totali (Cart. Tot) nella biomassa del consorzio microalga-batteri in RUN 2 (b) confrontata con il grafico dell'analisi del peso secco di RUN 2 (a).

Tipicamente la misurazione delle clorofille ai loro picchi di assorbanza massima viene correlata al quantitativo di biomassa presente nel mezzo ma la correlazione può essere applicata correttamente solo se la coltura è in condizioni axeniche e stabili monitorate nel tempo. Ipotizzando che tutta la biomassa sia costituita da microalghe, otteniamo per RUN 1 valori medi relativi al periodo di stabilità di $3.86 \pm 1.28 \text{ mg g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ (Ch a), $1.27 \pm 0.20 \text{ mg g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ (Ch b) e $1.72 \pm 1.03 \text{ mg g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ (Car. Totali). Per RUN 2 invece i valori relativi al periodo di pseudo-stabilità considerato sono di $2.32 \pm 0.26 \text{ mg g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ (Ch a), $0.68 \pm 0.11 \text{ mg g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ (Ch b) e $0.64 \pm 0.15 \text{ mg g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ (Car. Totali) (Tabella 12). Nella sperimentazione effettuata la coltivazione non prevede l'utilizzo di colture axeniche di *Chlorella* sp., ma di un consorzio microalghe-batteri. La correlazione tra i dati ottenuti dall'analisi della clorofilla a ed il peso secco ci può suggerire che la coltura è composta principalmente dalla specie microalgale e solo in piccola percentuale da batteri provenienti dal sistema di digestione anaerobica. Futuri studi verranno applicati per la caratterizzazione delle specie presenti nel consorzio studiato.

4.4 Caratterizzazione della frazione lipidica

Effettuando una approfondita ricerca bibliografica si è evinto che l'applicazione di un sistema di alimentazione in semi-continuo viene richiesta come metodologia di coltivazione ottimale per la produzione di biodiesel da biomassa microalgale (Kaspar et al., 2014; Zhu et al., 2013; Yin et al., 2020). Tambiev et al. (1989) definisce che la percentuale di triacilgliceroli (TAG) sul totale dei lipidi accumulati nella biomassa varia a seconda delle specie microalgali e dello stato fisiologico della coltura, indicando un range compreso tra 38% e 65%. Il biodiesel è costituito da esteri metilici dei TAG ottenuti da oli animali o vegetali che vengono sottoposti a transesterificazione (biodiesel di seconda generazione). Petkov e Garcia (2007) hanno identificato che, per la specie *Chlorella vulgaris*, la composizione della frazione lipidica risulta conforme a quella ottenuta da oli di origine animale e vegetale, potendola quindi applicare per la produzione di biodiesel di terza generazione.

Gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) sono il substrato di partenza per la produzione di biodiesel. Non tutti i lipidi possono essere convertiti in FAME, pertanto un'analisi di caratterizzazione della frazione lipidica rappresenta un indicatore diretto del quantitativo di lipidi che può essere utilizzato per produrre biodiesel (Li et al., 2011). La caratterizzazione della frazione lipidica rappresenta il collo di bottiglia per la produzione di biodiesel di terza generazione poiché gli Standard qualitativi Europei (EN14214 e EN14213) richiedono un contenuto di C18:3 (acido linolenico) inferiore al 12% ed una concentrazione di acidi grassi con quattro o più doppi legami inferiore all'1% mol (Chisti, 2007).

La caratterizzazione della frazione lipidica della biomassa microalgale relativa a entrambe le fasi della sperimentazione (RUN 1 e RUN 2, Tabella 13) ha mostrato che l'olio estratto può essere utilizzato per la produzione di biodiesel di terza generazione in quanto conforme al EN14214 e EN14213 data la bassissima percentuale di acido linolenico ed acidi grassi con quattro o più doppi legami.

Tabella 13: Caratterizzazione della frazione lipidica del consorzio microalghe-batteri in RUN 1 e in RUN 2.

ACIDO GRASSO		RUN 1	RUN 2
A. miristico (%)	C14:0	0.87 ± 0.24	6.27 ± 2.88
A. palmitico (%)	C16:0	27.89 ± 3.41	27.45 ± 0.5
A. stearico (%)	C18:0	2.75 ± 0.73	25.75 ± 10.77
A. palmitoleico (%)	C16:1	4.48 ± 0.83	2.93 ± 0.57
A. oleico (%)	C18:1	7.83 ± 1.19	6.33 ± 1.24
FA C16:2 (%)	C16:2	3.28 ± 0.86	7.21 ± 1.38
A. linoleico (%)	C18:2	52.35 ± 4.43	23.37 ± 4.15
A. linolenico (%)	C18:3	0.53 ± 0.29	0.7 ± 0.04

Per la produzione di biodiesel di terza generazione sono preferibili alte concentrazioni di acidi grassi saturi e monoinsaturi, poiché gli acidi grassi poli-insaturi tendono a interferire negativamente con la stabilità del biocarburante (Greenwell et al., 2010). I dati di caratterizzazione ottenuti applicando HRT differenti hanno mostrato che la composizione della frazione lipidica risulta principalmente composta da acidi C16 e C18, come riportato da He et al. (2013). Differenza importante risulta nell'abbondanza di acido linoleico (C18:2) in RUN 1 (52.35 ± 4.43%) rispetto a RUN 2 (23.37 ± 0.04%) e rispetto ai dati riscontrati in letteratura. He et al (2013) analizza il profilo degli acidi grassi di *Chlorella vulgaris* coltivata in acque reflue e ottiene 28.2% di acido linoleico e 26.2% di acido palmitico. Yang et al. (2017) analizza la coltivazione in semi-continuo di *Chlorella* sp. su reflui municipali riprodotti artificialmente e ottiene 28.2% di acido linoleico e 34.4% di acido palmitico. La presenza di acido palmitico (C16:0) nella frazione lipidica riscontrata nelle condizioni sperimentali con digestato è stata identificata anche in altri studi relativi alla coltivazione di microalghe su acque reflue e digestato (Gupta et al., 2016; Kuo et al., 2015; Fernandez-Linares et al., 2020), coerentemente con i nostri risultati (27.89 ± 3.41% per RUN 1 e 27.45 ± 0.50% per RUN 2).

Interessante risulta la quasi assenza di acido linolenico (C18:3) ottenuta in entrambe le condizioni sperimentali: 0.53 ± 0.29% per RUN 1 e 0.7 ± 0.04% per RUN 2. Questi valori sono di molto inferiori rispetto a quelli riscontrati in letteratura. Chu et al. (2015) riporta per *Chlorella pyrenoidosa* coltivata in semi-continuo (HRT = 10 giorni) su digestato da reflui di lavorazione dell'amido una percentuale di acido linolenico di 11.37 ± 1.06%, durante l'estate. Questo studio è stato effettuato in fotobioreattori all'aperto per valutare anche l'effetto delle temperature; a tal proposito, dimostra che con la stagione invernale

aumentano le percentuali di acidi grassi insaturi, in particolare C18:2 e C18:3 ($24.57 \pm 0.77\%$ in inverno sempre con HRT = 10 giorni). Tan et al. (2018) analizza la coltivazione in semi-continuo di *Chlorella vulgaris* su compost di allevamento e ottiene 32.2% di acido linolenico. Fernandez-Linares et al. (2020) riporta una composizione di 26.03% di acido palmitico, 8.05% di acido oleico e 19.19% di acido linolenico per un consorzio microalgale coltivato in semi-continuo (con HRT=13 giorni) su acque reflue da allevamento in vasche aperte. Questi risultati (in cui il contenuto di acido linolenico risulta superiore al 12%) li obbligano a considerare dei pretrattamenti per la rimozione dell'acido linolenico in modo da rientrare negli Standard Europei. La necessità degli Standard Europei di limitare la concentrazione di acido linolenico riguarda la sua caratteristica chimica relativa alla presenza di due gruppi bi-allilici (cioè un atomo di carbonio adiacente a due doppi legami), che lo rendono particolarmente suscettibile all'instabilità ossidativa. La stabilità ossidativa è una delle proprietà più importanti del biodiesel, e serve ad evitare un aumento eccessivo della viscosità, la produzione di gomme, sedimenti o altri depositi (Knothe, 2005). Per aumentare la stabilità del biodiesel si può creare un *blend* di oli con valori diversi di stabilità ossidativa, o possono essere utilizzati degli additivi antiossidanti; nonostante molti oli vegetali contengano già delle sostanze antiossidanti (i.e. carotenoidi) si preferiscono antiossidanti sintetici in quanto ritenuti più efficaci (Hoekman et al., 2012).

4.5 Considerazioni sullo sviluppo del processo

Il processo di produzione di biodiesel da biomassa microalgale consiste in tre fasi principali: l'unità di produzione cellulare, la separazione delle cellule dal mezzo di crescita e l'estrazione degli oli. La prima fase prevede la selezione del tipo di microalga e la definizione dei parametri di coltivazione. Da questa sperimentazione emerge la validità della coltivazione in semi-continuo su digestato in condizioni di mixotrofia per la produzione di biodiesel di terza generazione e contemporanea fitodepurazione del refluo. L'utilizzo di acque reflue o digestato anaerobico come mezzo colturale consente di recuperare i nutrienti presenti nel mezzo da depurare e utilizzarli per la crescita delle microalghe. In questo modo, si ha il duplice beneficio di ridurre i costi di trattamento terziario del refluo, e di ridurre anche i costi colturali delle microalghe, che risulterebbero altrimenti non sostenibili. L'aspetto chiave della produzione di biodiesel da microalghe su larga scala risiede nello sviluppo di sistemi di coltivazione efficienti ed economici, nell'identificazione del mezzo colturale più appropriato, della tecnica di raccolta più conveniente e della specie che abbia la produttività di lipidi più idonea agli scopi.

L'implementazione del sistema di coltivazione microalgale può essere ottenuta attraverso l'utilizzo di un fotobioreattore a membrana (MPBR). Questa tecnologia combina un PBR chiuso con un sistema a micro o ultrafiltrazione tramite membrana (Luo et al., 2017). L'uso della membrana è finalizzato alla completa ritenzione della biomassa microalgale per evitare fenomeni di *wash out* del sistema che può verificarsi applicando HRT troppo brevi. Infatti, utilizzando un MPBR si possono controllare in maniera separata due parametri operativi: HRT (tempo di ritenzione idraulico) e SRT (tempo di ritenzione dei solidi), un valore associato alla concentrazione della biomassa (Honda et al., 2017). La presenza della membrana consente quindi di lavorare ad alti SRT, mantenendo alte concentrazioni di biomassa, e bassi HRT per ottimizzare la rimozione dei nutrienti dal refluo. Lo sdoppiamento di questi due parametri consente ai reattori a membrana di ottenere una produzione di biomassa microalgale anche 3.5 volte superiore rispetto a un semplice PBR (Marbelia et al., 2014). Studi precedenti riportano 18 giorni come SRT ottimale per *Chlorella* sp. (Honda et al., 2012).

La possibilità di coltivare e raccogliere microalghe in continuo risolve il problema dell'approvvigionamento delle materie prime stagionali per la produzione di biodiesel (i.e. soia, colza) (Mata et al., 2010). La raccolta rappresenta il 20-30% dei costi operativi totali (Molina Grima et al., 2003). La difficoltà di questa operazione è dovuta alle piccole dimensioni delle cellule microalgali (<20µm), alla densità simile a quella dell'acqua (1.08-1.13 g ml⁻¹) e carica superficiale fortemente negativa (Lavoie e de la Noue, 1987; Chen e Yeh, 2005). Ogni tecnologia presenta i suoi pro e contro, ed è quindi difficile individuare la tecnica migliore in assoluto: bisogna considerare le dimensioni delle cellule microalgali, la densità della coltura, le caratteristiche del prodotto che si vuole ottenere e l'eventuale riciclo del mezzo colturale. I metodi di raccolta più comuni prevedono sedimentazione, centrifugazione o filtrazione, talvolta associate a flocculazione chimica o

biologica per favorire la formazione di aggregati. Tuttavia, questi metodi sono poco convenienti a livello economico per trattare grandi volumi di biomassa. Studi precedenti hanno posto l'attenzione sulla flocculazione microbica (o autoflocculazione) come alternativa economicamente sostenibile ai metodi di raccolta tradizionale.

L'autoflocculazione consiste nell'aggregazione naturale delle cellule microalgali e formazione di colonie. Questo meccanismo dipende da vari fattori come pH, presenza di ioni, produzione di polisaccaridi, presenza di altre specie microbiche (batteri) e dimensioni delle cellule (Christenson e Sims, 2012). Ad alti valori di pH, la CO₂ consumata durante il processo di fotosintesi può precipitare come carbonato insieme alle cellule algali; pertanto, la coltivazione prolungata sotto la luce del sole con limitato apporto di CO₂ può favorire questo fenomeno e facilitare così la raccolta (Pragya et al., 2013). L'autoflocculazione può essere simulata in laboratorio aggiungendo NaOH per raggiungere il valore di pH desiderato (Chen et al., 2011). *Chlorella* sp. coltivata in acque reflue da produzione birraia ha dimostrato una tendenza significativa all'autoflocculazione (Farooq et al., 2013). Favorire la naturale aggregazione tra cellule microalgali è un'opzione molto valida per ridurre notevolmente i costi di raccolta della biomassa, e consentirebbe di ottenere sia un'alta qualità di trattamento del refluo sia una grande quantità di biomassa microalgale da cui ottenere prodotti secondari ad alto valore aggiunto. L'aggregazione di colonie microalgali e batteri del refluo per formare fiocchi (>500µm) può essere favorita attraverso il ricircolo della biomassa raccolta. È necessario comunque approfondire la conoscenza di questo fenomeno per capire attraverso quali altri parametri poterlo indurre.

L'estrazione degli oli vegetali dalla biomassa microalgale può essere ottenuta mediante metodi fisici o chimici, i quali prevedono l'utilizzo di solventi; in questo caso è stata utilizzata una soluzione di cloroformio e metanolo in rapporto 2:1. Il metodo ottimale di estrazione dei lipidi dovrebbe essere veloce, facilmente scalabile, efficiente e non dannoso per i lipidi estratti (Rawat et al., 2011). Tra le tecnologie *green* più studiate negli ultimi anni c'è l'estrazione con CO₂ supercritica. I fluidi supercritici sono quei fluidi che si trovano in condizioni di temperatura superiore alla loro temperatura critica e pressione superiore alla loro pressione critica. In queste condizioni le proprietà del fluido sono in parte analoghe a quelle di un liquido (i.e. densità) e in parte analoghe a quelle di un gas (i.e. viscosità). Questi fluidi trovano impiego come solventi industriali, in particolare la CO₂, che vanta condizioni critiche non drastiche (T_c=31.1°C, P_c=73.8 bar). Una tipica unità di estrazione con CO₂ supercritica è costituita da una pompa di alimentazione per la compressione e il trasporto della CO₂ liquida fino al recipiente dove avviene l'estrazione, situato all'interno di un forno, e da una valvola per depressurizzare la CO₂ allo stato supercritico in ingresso. Una volta che il forno è caldo, la CO₂ compressa entra nell'unità allo stato supercritico ed estrae i lipidi dalla biomassa microalgale. L'uso di questa tecnologia vanta un basso impatto ambientale e bassa tossicità. I principali svantaggi sono i costi operativi e infrastrutturali elevati (Halim et al., 2012). Spesso la biomassa residua

dall'estrazione della frazione lipidica viene riutilizzata come mangime per animali, in acquacoltura o come fertilizzante organico: la bassa tossicità associata all'utilizzo di CO₂ supercritica favorirebbe questo tipo di riutilizzo. In questa ottica sarebbe interessante sviluppare delle strutture idonee in cui poter sfruttare i fluidi supercritici per questo tipo di applicazioni riducendo gli oneri economici.

5. Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi è stata studiata l'ottimizzazione della coltivazione in fotobioreattore in semi-continuo di un consorzio microalghe-batteri con la doppia funzionalità di depurazione del refluo (digestato) e produzione di prodotti secondari ad alto valore aggiunto (nello specifico, lipidi per produzione di biodiesel). Le sperimentazioni attuate applicando due diversi HRT (47 giorni e 10 giorni) hanno portato alla conclusione che per ottenere una produzione di biomassa elevata e costante è consigliabile applicare HRT lunghi: infatti con HRT di 47 giorni (RUN 1) si è ottenuta una produzione di $2.2 \pm 0.13 \text{ g l}^{-1}$, mentre con HRT di 10 giorni (RUN 2) $0.94 \pm 0.06 \text{ g l}^{-1}$, entrambi allo stato stazionario. Per quanto riguarda la rimozione di nutrienti e l'utilizzo del consorzio studiato per la fitodepurazione, i dati ottenuti applicando un HRT lungo hanno mostrato un'elevata rimozione di ammonio, superiore a quella riscontrata applicando un HRT breve. La problematica riscontrata in RUN 2 è stato il *wash out* del sistema.

Per quanto riguarda la caratterizzazione della biomassa, i contenuti di proteine sono risultati elevati e stabili in entrambe le condizioni sperimentali ($44.39 \pm 5.8\%$ e $48.65 \pm 5.33\%$ per la biomassa per RUN 1 e RUN 2, rispettivamente) indicando la potenzialità di utilizzo di questo consorzio per la produzione di integratori per l'acquacoltura. L'amido presente nella biomassa del consorzio microalghe-batteri presenta concentrazioni costanti ma purtroppo non sufficienti per essere utilizzato come substrato per la produzione di bioplastiche o bioetanolo ($6.4 \pm 0.6\%$ e $5.73 \pm 0.07\%$ per RUN 1 e RUN 2, rispettivamente).

Valori interessanti sono stati ottenuti per la frazione lipidica, dove l'applicazione di un HRT elevato ha mostrato valori costanti di lipidi ($20.00 \pm 1.58\%$) contrariamente all'applicazione di HRT breve ($15.34 \pm 5.00\%$). La caratterizzazione in composizione della biomassa uscente dal sistema in semi-continuo ha risposto alla domanda relativa alla variazione in dimensione delle cellule durante la variazione degli HRT applicati, cioè quale composto venisse stoccato all'interno delle cellule che comportasse un aumento in dimensioni. Le analisi effettuate hanno evidenziato che i lipidi rappresentano il prodotto secondario con maggiore variazione e che probabilmente è proprio il loro accumulo a modificare morfologicamente le cellule microalgali (RUN 2).

Sicuramente un'applicabilità della biomassa ottenuta è l'uso come integratori alimentari per l'acquacoltura, data l'abbondanza di proteine legata all'alto consumo di azoto ammoniacale (Liu et al., 2019), ma anche la frazione lipidica può essere utilizzata per la produzione di biodiesel. Per valutare l'applicabilità dell'utilizzo dell'olio estratto dalla biomassa è stata effettuata una caratterizzazione della frazione lipidica. L'analisi di caratterizzazione della frazione lipidica per entrambe le condizioni sperimentali ha evidenziato il potenziale utilizzo per la produzione di biodiesel senza la necessità di pretrattamenti. In particolare, le concentrazioni di acido linolenico risultano molto inferiori ai limiti imposti dagli Standard Europei (12%w/w): nello specifico le concentrazioni ottenute risultano essere di $0.53 \pm 0.29\%$ in RUN 1 e $0.7 \pm 0.04\%$ in RUN 2.

Appendice 1 – Materiali e Metodi

Monitoraggio e caratterizzazione della biomassa

Analisi del peso secco

L'analisi del peso secco è stata effettuata utilizzando filtri in acetato di cellulosa con porosità di 0.45 µm (aggiungi Whatman). Prima dell'analisi il filtri venivano posti in forno a 105°C per almeno 24 ore, si effettuava la pesata del filtro vuoto secco (P_0) e successivamente venivano posti sul sistema di filtraggio tramite pompa a vuoto. Un'aliquota di campione veniva prelevata (V), filtrata e lavata con acqua distillata. Il filtro contenente il campione umido veniva posto nuovamente in forno a 105 °C per almeno 2 ore e successivamente pesato (P_1). Il valore di peso secco (espresso in $g\ l^{-1}$) è determinato dall'equazione 8:

$$Peso\ secco\ (g\ l^{-1}) = \frac{(P_1\ (g) - P_0\ (g))}{V\ (l)} \quad Eq\ 8$$

Dove:

P_1 = peso del filtro con campione dopo il passaggio in forno;

P_0 = peso del filtro vuoto.

Conta cellulare

La conta cellulare è stata effettuata utilizzando il microscopio ottico da banco con ingrandimento 40X tramite camera di conta Bürker. La struttura della camera di conta è definita da un reticolo di linee singole e doppie verticali e orizzontali che permettono di identificare 9 riquadri delimitati da una doppia linea. Prelevando 10 µl di campione opportunamente diluito e posizionandolo sulla camera di conta, coprendolo successivamente di un vetrino coprioggetto, si può effettuare la conta diretta delle cellule nella soluzione con una concentrazione definita come milioni di cellule ml^{-1} . La camera di conta di Bürker è composta da un reticolo di 9 quadrati delimitati da doppia riga; ogni quadrato è suddiviso in ulteriori 16 quadrati più piccoli. Tipicamente la conta diretta viene effettuata in più copie in modo da avere un'omogeneità del dato ottenuto e sulla camera vengono contate le cellule presenti all'interno di tre su nove dei grandi quadrati delimitati dalla doppia linea in diagonale. Onde evitare una sovrastima della conta, per il primo quadrato grande vengono contate tutte le cellule sia all'interno del quadrato che di tutte e quattro le doppie linee, per i successivi due si contano le cellule presenti all'interno del quadrato e solo due delle doppie linee. L'equazione che consente di quantificare le cellule è la seguente (Eq 9):

$$Milioni\ di\ cellule\ ml^{-1} = \text{Somma delle cellule contate nei tre quadrati} * 3 * V_{campione} \quad Eq\ 9$$

Quantificazione dei lipidi totali

La quantificazione dei lipidi totali (Folch et al., 1957) è stata effettuata pesando 0,02 g di campione liofilizzato e finemente tritato a cui vengono aggiunti 4 ml di soluzione cloroformio:metanolo (2:1). La soluzione viene posta in sonicatore per 1 ora ed al termine la soluzione viene recuperata e centrifugata per 5 minuti a 9000 rpm. Al termine della centrifuga viene recuperato il surnatante e la biomassa rimanente viene lavata con la soluzione cloroformio:metanolo, per poi essere ricentrifugata. Tutto il surnatante recuperato viene lavato con H₂O distillata a cui è stato aggiunto NaCl (un cucchiaino per 10 ml di acqua). Terminata la separazione di fase, l'acqua viene rimossa e alla fase organica vengono aggiunti 6-7 cucchiaini di magnesio-solfato (Sigma-Aldrich) in modo da eliminare completamente la frazione acquosa. Il campione contenente il magnesio solfato viene agitato energicamente e sottoposto a centrifuga per 5 minuti a 9000 rpm. Il surnatante viene recuperato e posto nei palloni di vetro da RotaVapor, precedentemente pesati da asciutti e vuoti (P₀). Il sale rimanente viene lavato con la soluzione cloroformio:metanolo e sottoposto a un altro ulteriore di centrifuga per 5 minuti a 9000 rpm per recuperare completamente l'estratto. Il surnatante recuperato dal lavaggio viene posto nel pallone di vetro insieme al resto del campione. Ogni pallone viene posto in RotaVapor a 30°C per 25 minuti. Al termine, il pallone viene asciugato accuratamente e ripeso con il campione essiccato all'interno (P₁). Il quantitativo di lipidi totali si ottiene mediante l'equazione 10:

$$\text{Lipidi totali (\%)} = ((P_1 - P_0) / g_{\text{biomassa pesata}}) * 100 \quad \text{Eq 10}$$

Dove:

P₁ = peso del pallone con campione dopo passaggio in RotaVapor;

P₀ = peso del pallone vuoto.

Caratterizzazione della frazione lipidica

0.2-0.3 mg di biomassa liofilizzata e finemente tritata sono stati utilizzati in duplicato per ogni caratterizzazione della frazione lipidica. In accordo con il metodo di derivatizzazione degli acidi grassi (Izzo et al., 2013; Fuster-López et al., 2016; Izzo et al., 2014; Fuster-López et al., 2018; Caravà et al., 2020; Izzo et al., 2017; Rigon et al., 2020) i lipidi contenuti nella biomassa liofilizzata sono stati trasformati nei loro corrispettivi metil-esteri tramite un singolo step di transesterificazione usando 50 µl di m(trifluorometilfenil)trimetilammonio idrossido, 2.5 % in metanolo, con un tempo di reazione di una notte a temperatura ambiente. Un microlitro di campione derivatizzato è stato iniettato automaticamente mediante autocampionatore AS 1310 (Thermoscientific) nel sistema Trace GC 1300 (Thermoscientific) accoppiato a uno spettrometro di massa con detector ISQ 7000 con analizzatore a quadrupolo (Thermoscientific). La separazione cromatografica è stata effettuata su base di legami chimici fusi alla colonna DB-5MS capillare in silicio (lunghezza 30m, 0.25 mm, 0.25 µm -5% fenil metil polisilossano) usando

elio come carrier (flusso a 1 ml min⁻¹). La temperatura di iniezione era di 280 °C e l'interfaccia MS a 280 °C. La linea di traferimento era a 280 °C e la temperatura alla fonte MS era di 300 °C. Il programma di temperatura era settato da 50 a 320 °C con una rampa di 10 °C min⁻¹, mantenendo la temperatura stabile per 5 minuti. L'MS ha corso in modalità Full Scan (m/z 40-650), 1.9 scans s⁻¹. L'energia di ionizzazione elettronica era di 70 eV. I composti sono stati identificati confrontando i dati ottenuti con le librerie NIST e MS Search 1.7 dello spettro di massa e una libreria creata degli autori. L'analisi quantitativa degli acidi grassi caratterizzati ha usato l'acido nonodecanoico come standard interno e una soluzione standard contenete acidi grassi saturi (miristico, palmitico e sterico) e insaturi (oleico, linoleico, linolenico, palmitoleico) e glicerolo. La quantificazione è stata riportata in concentrazione % w/w (percentuale di acido grasso su totale di lipidi estratti).

Quantificazione Clorofilla a e b e Carotenoidi totali

L'estrazione e quantificazione delle Clorofille a e b (Ch a e Ch b) e carotenoidi totali è stata effettuata su campione liquido (Lichtenthaler et al., 2001). Prelevata un'aliquota nota di campione (1 ml) contenente la biomassa, veniva centrifugato a 12000 rpm per 5 minuti e lavata la biomassa con acqua distillata e ricentrifugata. Il pellet così ottenuto poteva essere utilizzato per l'estrazione. L'estrazione è stata effettuata aggiungendo al pellet 2 ml di metanolo puro (Sigma-Aldrich) e posto in bagnetto termico a 60°C per 1 ora. Al termine, le eppendorf contenenti i campioni vengono centrifugate di nuovo per 5 minuti a 12000 rpm ed il surnatante viene prelevato per la lettura spettrofotometrica usando cuvette in vetro. Ai 2 ml di campione viene aggiunto 1 ml di metanolo puro prima della lettura spettrofotometrica. Le lunghezze d'onda utilizzate per la quantificazione di Ch a, Ch b e carotenoidi totali sono: 665.2 nm, 652.4 nm e 470 nm. Per la quantificazione si usano le seguenti equazioni (Eq 11, 12 e 13):

$$Ch\ a\ (\mu g\ ml^{-1}) = \frac{(16.72 * OD_{665.2}) - (9.16 * OD_{652.4})}{V_{campione}} \quad Eq\ 11$$

$$Ch\ b\ (\mu g\ ml^{-1}) = \frac{(34.09 * OD_{652.4}) - (15.28 * OD_{665.2})}{V_{campione}} \quad Eq\ 12$$

$$Carotenoidi\ totali\ (\mu g\ ml^{-1}) = \frac{(1000 * OD_{470}) - (1.63 * Ch\ a) - (104.96 * Ch\ b)}{221} \quad Eq\ 13$$

Quantificazione delle proteine totali

10 mg di biomassa liofilizzata e finemente tritata viene miscelata con 1 ml di soluzione NaOH 0.5 M, ottenuta con 14 g di NaOH in 1 litro di acqua distillata. I campioni vengono successivamente messi in un bagnetto termico a 80°C per 10 minuti e successivamente centrifugati per 5 minuti a 12000 rpm. Il surnatante viene recuperato e sugli stessi 10 mg di biomassa vengono effettuate altre due estrazioni. Successivamente tutto il surnatante viene posto nella stessa falcon (Safafar et al., 2016). In seguito, da

suddetta falcon viene estratto 1 ml e posto insieme a 2 ml di reagente Biuret in un'altra falcon da 15 ml; il campione viene agitato vigorosamente e lasciato reagire per 20 minuti a T_{ambiente} . Viene preparato anche un bianco con acqua distillata e reagente. Una volta avvenuta la reazione i campioni vengono letti allo spettrofotometro a 540 nm. La retta di taratura è stata preparata utilizzando albumina bovina a concentrazioni di 0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 e 2.0 mg ml⁻¹. La soluzione stock contiene 2.0 mg ml⁻¹ di albumina bovina.

Analisi dell'amido totale

L'estrazione dell'amido totale è stata effettuata tramite il kit di analisi Total Starch Kit Analysis – Megazyme. Vengono posti in vials di vetro 25 mg di biomassa liofilizzata finemente tritata. Per ogni campione devono essere preparate tre provette: replica¹, replica² e bianco. In tutte vengono messi 2.5 ml di buffer sodio acetato 100 mM pH 5.0 contenente CaCl₂ 5 mM. In seguito, nei campioni vengono aggiunti 25 µl di α-amilasi termostabile e nel bianco 25 µl dello stesso buffer utilizzato in precedenza. I tappi delle provette vengono chiusi senza stringere troppo e il contenuto viene mescolato con il vortex. Il tutto viene incubato nel bagnetto termico a 100°C per 15 minuti. Trascorsi i primi 2 minuti vengono stretti i tappi. Dopo altri 3 minuti, i campioni vengono mescolati con il vortex; lo stesso trascorsi 10 minuti totali e alla fine dei 15 minuti. In seguito, i campioni vengono fatti freddare in bagnetto termico a 50°C per 5 minuti. Nei campioni vengono aggiunti 25 µl di amiloglicosidasi AMG, e nel bianco 25 µl di buffer sodio acetato 100 mM pH 5.0 contenente CaCl₂ 5 mM. Dopo averli mescolati con il vortex per 3 secondi, i campioni vengono incubati nel bagnetto termico a 50°C per 30 minuti. Al termine dell'incubazione i campioni vengono tolti dal bagnetto termico e lasciati raffreddare a temperatura ambiente. Una volta raffreddati, si mescola il contenuto agitando delicatamente le provette. Dalle provette vengono trasferiti 2ml di campione in eppendorf che vengono centrifugate a 12000 rpm per 6 minuti. Il surnatante viene opportunamente diluito in base alla concentrazione attesa: per i campioni si effettua una diluizione 1:5 con 1ml di surnatante e 4 ml di buffer sodio acetato 100 mM pH 5.0 contenente CaCl₂ 5 mM; per il kit di controllo si effettua diluizione 1:11 con 1 ml di surnatante e 10 ml di buffer sodio acetato 100 mM pH 5.0 contenente CaCl₂ 5 mM; per il bianco non si effettua diluizione. Viene trasferito in provette di vetro 0.1 ml di campione diluito e di bianco, in duplicato. In quattro provette viene preparato lo standard di glucosio aggiungendo 0.1 ml di standard di glucosio, e in una provetta viene preparato il bianco del reagente con 0.1 ml di buffer sodio acetato 100 mM pH 5.0 contenente CaCl₂ 5 mM; in tutte le provette, sia campioni, che bianchi, che standard, vengono aggiunti 3 ml di reagente GOPOD. Tutte le provette vengono incubate nel bagnetto termico a 50°C per 20 minuti. Trascorso questo tempo, si effettua la lettura allo spettrofotometro a 510 nm utilizzando le cuvette in vetro. Lo zero dello strumento viene ottenuto con il bianco del reagente.

La formula per ottenere la % di amido totale è riportata in Eq 14 ed Eq 15:

$$Starch, \% = (A - A^B) \times F \times \frac{EV}{0.1} \times D \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \quad \text{Eq 14}$$

$$F = \frac{100}{\left(\frac{F^1 + F^2 + F^3 + F^4}{4}\right)} \quad \text{Eq 15}$$

Dove:

F = fattore che converte i valori di assorbanza in μg di glucosio;

EV = volume di campione estratto in ml [2.5 ml + 0.025 ml + 0.025 ml = 2.55 ml];

0.1 = volume di campione analizzato in ml;

D = fattore di diluizione;

1/1000 = conversione da μg a mg;

100/W = conversione a 100 mg;

W = peso del campione in mg;

162/180 = fattore che converte il risultato da glucosio libero (determinato dal metodo) ad anidrogucosio (amido).

Caratterizzazione dell'effluente

L'effluente è stato prelevato dal fotobioreattore e conservato a -15°C durante il periodo di lock-down e successivamente caratterizzato. I parametri valutati sono riportati di seguito, analizzati mediante metodi analitici riportati negli standard methods per le acque (APHA 2012):

Determinazione del pH

Il pH è stato determinato giornalmente utilizzando pHmetro Hanna Instruments. La misurazione è stata effettuata su campioni filtrati a $0.45 \mu\text{m}$. Per ogni campione l'analisi è stata effettuata in duplicato. La taratura dello strumento veniva effettuata una volta a settimana.

Analisi del COD solubile

L'analisi del sCOD consente di quantificare la domanda chimica di ossigeno (COD) della frazione solubile presente nel campione. Vengono prelevati 2.5 ml di campione (filtrato a $0.2 \mu\text{m}$) e posto in vials di vetro. Vi sono aggiunti 1.5 ml di soluzione ossidante (soluzione I) e 3.5 ml di soluzione catalizzante (soluzione II) (Open Reflux Method, APHA 2012). La miscela viene posta in fornello termico per due ore a 150°C e la lettura allo spettrofotometro avviene a 600 nm.

La soluzione I (ossidante) viene preparata mettendo 208 ml di $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1N in un matraccio da 1l che viene riempito per metà di acqua distillata; in seguito si aggiungono 167 ml di H_2SO_4 (96%) e 33.3 g di HgSO_4 ,

portando infine a volume con altra acqua distillata. La soluzione II (catalizzante) viene preparata mettendo 10 g di Ag_2SO_4 in un matraccio da 1l e portando a volume con H_2SO_4 (96%).

La retta di taratura è stata preparata utilizzando potassio ftalato monobasico a concentrazioni di 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 mgCOD l^{-1} .

Cromatografia ionica

La cromatografia cationica viene effettuata per determinare le concentrazioni di Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} in mg l^{-1} . Il macchinario utilizzato è il cromatografo ionico 25 (IC25) Dionex, composto da un sistema integrato costituito da: soluzione eluente (N_2SO_4 22mN), pompa a doppio pistone, valvola di iniezione a sei vie, comparto colonna (pre-colonna CG 12A 2x50 mm e colonna analitica CS 12A 2x250 mm) e detector a cella conduttometrica termostata. I moduli che costituiscono il cromatografo IC25 Dionex sono tre: il rivelatore elettrochimico ED 50, la pompa a gradiente GS 50 e il forno cromatografico L25). L'interfaccia di comunicazione con i moduli avviene attraverso il computer utilizzando il software Chromeleon 6.50. La fase mobile N_2SO_4 22mN viene preparata manualmente con 0.61 ml di H_2SO_4 18M Romil (super puro) portato a 1000 ml con acqua milliQ. Il soppressore utilizzato per la lettura dei cationi è CSRS a 4mm e 22mA di corrente. Tramite siringa da insulina vengono iniettati manualmente 0.5 ml di campione filtrato a 0.2 μm nel macchinario.

Il calcolo delle percentuali di rimozione dei cationi è stato fatto considerando la rimozione giornaliera di nutrienti dall'influente da parte del consorzio microalghe-batteri secondo la seguente equazione (Eq 16):

$$\% \text{Rimozione} = \left(\frac{(Q_{in} * C_{in}) - (Q_{out} * C_{out})}{(Q_{in} * C_{in})} \right) \times 100 \quad \text{Eq 16}$$

Dove:

Q_{in} = Portata in ingresso al reattore;

C_{in} = Concentrazione del nutriente in entrata al reattore;

Q_{out} = Portata in uscita dal reattore;

C_{out} = Concentrazione del nutriente in uscita dal reattore.

Nello specifico il calcolo è stato effettuato considerando la portata giornaliera di 0.0857 l d^{-1} per RUN 1 e 0.1 l d^{-1} per RUN 2. Infatti, considerando che RUN 1 è stato alimentato tre volte a settimana con 200 ml e che RUN 2 è stato alimentato cinque volte a settimana con 140 ml, su base giornaliera si ottengono i valori sopra riportati.

7. Bibliografia

Ahmad B., Yadav V., Yadav A., Rahman M.U., Yuan W.Z., Li Z., Wang X. Integrated biorefinery approach to valorize winery waste: a review from waste to energy perspectives. *Science of the Total Environment* 719, 137315. 2020.

Ahmad Farooq, Khan Amin U., Yasar Abdullah. The potential of *Chlorella vulgaris* for wastewater treatment and biodiesel production. *Park. J. Bot.* 45, 461-465. 2013.

Aketo Tsuyoshi, Hoshikawa Yumiko, Nojima Daisuke, Yabu Yusuke, Maeda Yoshiaki, Yoshino Tomoko, Takano Hiroyuki, Tanaka Tsuyoshi. Selection and characterization of microalgae with potential for nutrient removal from municipal wastewater and simultaneous lipid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2019.

Alalwan Hayer A., Alminshid Alaa H., Aljaafari Haydar A.S. Promising evolution of biofuel generations. Subject review. *Renewable Energy Focus* 28, 127-139. 2019.

Alanon M.E., Garcia-Ruiz A., Diaz-Maroto M.C., Perez-Coello M.S. Extraction of natural flavorings with antioxidant capacity from cooperage by-products by green extraction procedure with supercritical fluids. *Ind. Crop. Prod.* 103, 222-232. 2017.

Alejandro R.M., Mendoza-Espinosa L.G., Tom S. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewaters. *Bioresource Technology* 101, 58-64. 2010.

Amini Elham, Babaei Azadeh, Reza Mehrnia Mohammad, Shayegan Jalal, Safdari Mohammad-Saeed. Municipal wastewater treatment by semi-continuous and membrane algal-bacterial photo-bioreactors. *Journal of Water Process Engineering* 36, 101274. 2020.

Andreottola G., Foladori P., Ziglio G. Biological treatment of winery wastewater: an overview. *Water Science and Technology* 60.5, 1117-1125. 2009.

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater, 16th edition. American Public Health Association, Washington DC. 1985.

APHA/AWWA/WEF. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. Vol. 22nd ed. 2012.

Appels L., Baeyens J., Degève J., Dewil E. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science* 34, 755-781. 2008.

Arbib Zouhayr, Ruiz Jesus, Alvarez-Diaz Pablo, Garrido-Pérez Carmen, Perales José A. Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. *Water Research* 49, 465-474. 2014.

Arcila Juan S. e Buitròn Germàn. Microalgae-bacteria aggregates: effect of the hydraulic retention time on the municipal wastewater treatment, biomass settleability and methane potential. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91, 2862-2870. 2016.

Asada Chikako, Doi Keita, Sasaki Chizuru, Nakamura Yoshitoshi. Efficient extraction of starch from microalgae using ultrasonic homogenizer and its conversion into ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Natural Resources* 3, 175-179. 2012.

- Ashokkumar V., Agila E., Sivakumar P., Salam Z., Rengasamy R., Ani F.N.** Optimization and characterization of biodiesel production from microalgae *Botryococcus* grown at semi-continuous system. *Energy Conversion and Management* 188, 936-946. 2014.
- Aslan Sebnem, Kapdan Ilgi Karapinar.** Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering* 28, 64-70. 2006.
- Ayre J.M., Moheimani N.R., Borowitzka M.A.** Growth of microalgae on undiluted anaerobic digestate of piggery effluent with high ammonium concentrations. *Algal Research* 24, 218-226. 2017.
- Azman Samet.** Anaerobic digestion of cellulose and hemicellulose in the presence of humic acids. Wageningen University: Wageningen, The Netherlands, 2016.
- Bai Z., Jin B., Li Y., Chen J., Li Z.** Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *J. Environment. Sci.* 20, 353-358. 2008.
- Barbosa Maria J., Janssen Marcel, Ham Nienke, Tramper Johannes, Wijffels René H.** Microalgae Cultivation in Air-Lift Reactors: Modeling Biomass Yield and Growth Rate as a Function of Mixing Frequency. Food and Bioprocess Engineering Group, Wageningen University, Wiley Periodicals, The Netherlands. 2003.
- Barros Ana I., Gonçalves Ana L., Simões Manuel, Pires José C.M.** Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41, 1489-1500. 2015.
- Beck C., Prades C., Sadowski A-G.** Activated sludge wastewater treatment plants optimization to face pollution overloads during grape harvest period. *Water Science and Technology* 51, 81-88. 2005.
- Becker E.W.** Microalgae – Biotechnology a Microbiology. Cambridge: Cambridge University Press 1994.
- Becker E.W.** Microalgae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25, 207-210. 2007.
- Becker E.W.** Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond A, editor. *Handbook of Microalgae Culture. Biotechnology and Applied Phycology.* Oxford Blackwell Science, 312-351. 2004.
- Belay N., Sparling R., Daniels L.** Relationship of formate to growth and methanogenesis by *Methanococcus thermolithotrophicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 1080-1085. 1986.
- Bilad M.R., Discart V., Vandamme D., Foubert I., Muylaert K., Vankelekom I.F.J.** Coupled cultivation and pre-harvesting of microalgae in a membrane photobioreactor (MPBR). *Bioresource Technology* 155, 410-417. 2014.
- Björnsson Lovisa, Murto Marika, Jantsch Tor Gunnar, Mattiasson Bo.** Evaluation of new methods for the monitoring of alkalinity, dissolved hydrogen and the microbial community in anaerobic digestion. *Water Research* 35, 2833-2840. 2001.
- Bjornsson W.J., Nicol R.W., Dickinson K.E., McGinn P.J.** Anaerobic digestates are useful nutrient sources for microalgae cultivation: functional coupling of energy and biomass production. *J. Appl. Phycol.* 25, 1523-1528. 2013.
- Bligh E.G., Dyer W.J.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917. 1959.
- Bohutskyi Pavlo, Kligerman Debora Cynamon, Byers Natalie, Nasr Laila Khaled, Cua Celine, Chow Steven, Su Chunyang, Betenbaugh Michael J., Bouwer Edward J.** Effects of inoculum size, light intensity, and dose of anaerobic digestion centrate on growth and productivity of *Chlorella* and *Scenedesmus* microalgae and their poly-culture in primary and secondary wastewater. *Algal Research* 19, 278-290. 2016.

- Bonari E., Ercoli L., Silvestri N.** Acque reflue derivanti da attività di vinificazione. 2007.
- Boyle N.R., Page M.D., Liu B., Blaby I.K., Casero D., Kropat J., Cokus S.J., Hong-Hermesdorf A., Shaw J., Karpovicz S.J., Gallaher S.D., Johnson S., Benninfg C., Pellagrini M., Grossman A., Merchant S.S.** Three Acyltransferases and Nitrogen-responsive Regulator Are Implicated in Nitrogen Starvation-induced Triacylglycerol Accumulation in *Chlamydomonas*. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 15811-15825. 2012.
- Bozbas Kahraman.** Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 12, 542-552. 2008.
- Brennan Liam, Owende Philip.** Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 557-577. 2010.
- Burlew J.S.** Algal culture from laboratory to pilot plant. Carnegie Institution of Washington Publ. 1953.
- Busi M.V., Barchiesi J., Martìn M., Gomez-Casati D.F.** Starch metabolism in green algae. *Starch Stärke* 66, 28-40. 2014.
- Cai Ting, Ge Xumeng, Park Stephen Y., Li Yebo.** Comparison of *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Nannochloropsis salina* for lipid production using artificial seawater and nutrients from anaerobic digestion effluent. *Bioresource Technology*, 144, 255-260. 2013.
- Caravá S., Roldán García C., Vázquez de Agredos-Pascual M.L., Murcia Mascarós S., Izzo F.C.** Investigation of modern oil paints through a physico-chemical integrated approach. Emblematic cases from Valencia, Spain. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 240, 118633. 2020.
- Carvalho Ana P., Meireles Luís A., Malcata F. Xavier.** Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. *Biotechnol. Prog.* 22, 1490-1506. 2006.
- Cavinato C., Da Ros C., Pavan P., Cecchi F., Bolzonella D.** Treatment of waste activated sludge together with agro-waste by anaerobic digestion: focus on effluent quality. *Water Science and Technology* 69.3, 525-531. 2014.
- Chen C-Y., Yeh K.L., Aisyah R., Lee D-J., Chang J-S.** Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource Techonology* 102, 71-81. 2011.
- Chen J.J., Yeh H.H.** The mechanisms of potassium permanganate on algal removal. *Water Research* 39, 4420-4428. 2005.
- Chen Y., Vaidyanathan S.** Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae. *Analytica Chimica Acta* 776, 31-40. 2013.
- Chen Yi-di, Ho Shih-Hsin, Nagarajan Dillirani, Ren Nan-qi, Chang Jo-Shu.** Waste biorefineries — integrating anaerobic digestion and microalgae cultivation for bioenergy production. *Current opinion in Biotechnology* 50, 101-110. 2018.
- Chen Z., Shao S., He Y., Luo Q., Zheng M., Zheng M., Chen B., Wang M.** Nutrients removal from piggery wastewater coupled to lipid production by a newly isolated self-flocculating microalga *Desmodesmus* sp. PW1. *Bioresource Technology* 302, 122806. 2020.
- Cheng Jun, Huang Yun, Feng Jia, Sun Jing, Zhou Junhu, Cen Kefa.** Improving CO₂ fixation efficiency by optimizing *Chlorella* PY-ZU1 culture conditions in sequential bioreactors. *Bioresource Technology* 144, 321-327. 2013.

Cheng Jun, Ye Qing, Xu Jiao, Yang Zongbo, Zhou Junhu, Cen Kefa. Improving pollutants removal by microalgae *Chlorella* PY-ZU1 with 15% CO₂ from undiluted anaerobic digestion effluent of food wastes with ozonation pretreatment. *Bioresource Technology* 216, 273-279. 2016.

Chisti Yusuf. Biodiesel beats Bioethanol. *Trends in Biotechnology* 26, 126-131. 2007.

Chisti Yusuf. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25, 294-306. 2007.

Chiu Sheng-Yi, Kao Chien-Ya, Chen Tsai-Yu, Chang Yu-Bin, Kuo Chiu-Mei, Lin Chih-Sheng. Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. *Bioresource Technology* 184, 179-189. 2015.

Christenson Logan, Sims Ronald. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 29, 686-702. 2011.

Chu Hua-Qiang, Tan Xiao-Bo, Zhang Ya-Lei, Yang Li-Bing, Zhao Fang-Chao, Guo Jun. Continuous cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* using anaerobic digested starch processing wastewater in the outdoors. *Bioresource Technology* 185, 40-48. 2015.

Chuka-ogwude David, Ogbonna James, Moheimani Navid R. A review on microalgal culture to treat anaerobic digestate food waste effluent. *Algal Research* 47, art. 101841. 2020.

Converti Attilio, Casazza Alessandra A., Ortiz Erika Y., Perego Patrizia, Del Borghi Marco. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing* 48, 1146-1151. 2009.

Da Ros C., Cavinato C., Pavan P., Bolzonella D. Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of winery wastewater sludge and wine lees: an integrated approach for sustainable wine production. *Journal of Environmental Management* 203, 745-752. 2017.

Da Ros C., Cavinato C., Pavan P., Bolzonella D. Winery waste recycling through anaerobic co-digestion with waste activated sludge. *Waste Management* 34, 2028-2035. 2014.

de-Bashan L, Bashan Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology* 101, 1611-1627. 2010.

Deublein D., Steinhauser A. *Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction.* John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2008.

Dickinson K.E., Bjornsson W.J., Garrison L.L., Whitney C.G., Park K.C., Banskota A.H., McGinn P.J. Simultaneous remediation of nutrients from liquid anaerobic digestate and municipal wastewater by the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD grown in continuous chemostats. *Journal of Applied Microbiology* 118, 75-83. 2015.

Elser J.J. Phosphorus: a limiting nutrient for humanity? *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 833-838. 2012.

Eriksen Niels Thomas. The technology of microalgal culturing. *Biotechnol Lett* 30, 1525-1536. 2008.

Erkelens Mason, Ward Andrew J., Ball Andrew S., Lewis David M. Microalgae digestate effluent as a growth medium for *Tetraselmis* sp. in the production of biofuels. *Bioresource Technology* 167, 81-86. 2014.

Estevez Maria M., Linjordet Roar, Morken John. Effects of steam explosion and co-digestion in the methane production from *Salix* by mesophilic batch assays. *Bioresource Technology* 104, 749-756. 2012.

Fan J., Yan C., Andre C., Shanklin J., Schwender J., Xu C. Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology* 53, 1380-1390. 2012.

- Faried M., Samer M., Abdelsalam E., Yousef R.S., Attia Y.A., Ali A.S.** Biodiesel production from microalgae: processes, technologies and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 79, 893-913. 2017.
- Fazal Tahir, Mushtaq Azeem, Rehman Fahad, Khan Asad Ullah, Rashid Naim, Farooq Wasif, Rehman Muhammad Saif Ur, Xu Jian.** Bioremediation of textile wastewater and successive biodiesel production using microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 82, 3107-3126. 2018.
- Feng P., Yang K., Xu Z., Wang Z., Fan L., Qin L., Zhu S., Shang C., Chai P., Yuan Z., Hu L.** Growth and lipid accumulation characteristics of *Scenedesmus obliquus* in semi-continuous cultivation outdoors for biodiesel feedstock production. *Bioresource Technology* 173, 406-414. 2014.
- Feng Y., Li C., Zhang D.** Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresour. Technol.* 102, 101–105. 2011.
- Fernandes B., Teixeira J., Dragone G., Vicente A.A., Kawano S., Bisova K., Pribyl P., Zachleder V., Vitova M.** Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. *Bioresource Technology* 144, 268-274. 2013.
- Fernández-Linares Luis C., Gutiérrez-Márquez Alejandra, Guerrero-Barajas Claudia.** Semi-continuous culture of a microalgal consortium in open ponds under greenhouse conditions using piggery wastewater effluent. *Bioresource Technology Reports* 12, art 100597. 2020.
- Ferry J.G.** The chemical biology of methanogenesis. *Planet. Space Sci.* 58, 1775–1783. 2010.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H.** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. United States Public Health Service. 1957.
- Franchino Marta, Comino Elena, Bona Francesca, Riggio Vincenzo A.** Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere* 92, 738-744. 2013.
- Franchino Marta, Tigini Valeria, Varese Giovanna Cristina, Sartor Rocco Mussat, Bona Francesca.** Microalgae treatment removes nutrients and reduces ecotoxicity of diluted piggery digestate. *Science of the Total Environment* 569-570, 40-45 (2016).
- Fukuda Hideki, Kondo Akihiko, Noda Hideo.** Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92, 405-416. 2001.
- Fuster-López L., Izzo F.C., Damato V., Yusà-Marco D.J., Zendri E.** An insight into the mechanical properties of selected commercial oil and alkyd paint films containing cobalt blue. *J Cult Herit* 2019.
- Fuster-López L., Izzo F.C., Piovesan M., Yusà-Marco D.J., Sperti L., Zendri E.** Study of the chemical composition and the mechanical behaviour of 20th century commercial artists' oil paints containing manganese-based pigments. *Microchem J* 2016.
- Gao Feng, Li Chen, Yang Zhao-Hui, Zeng Guang-Ming, Mu Jun, Liu Mei, Cui Wei.** Removal of nutrients, organic matter, and metal from domestic secondary effluent through microalgae cultivation in a membrane photobioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* Wiley Online Library. 2016.
- García-Cubero Rafael, Moreno-Fernández José, Ación-Fernández F.G., García-Gonzalez Mercedes.** How to combine CO₂ abatement with starch production in *Chlorella vulgaris*. *Algal Research* 32, 270-279. 2018.
- Gerpen Van J.** Biodiesel processing and production. *Fuel Process Technol* 86, 1097–1107. 2004.
- Gnansounou Edgard, Raman Jegannathan Kenthorai.** Life cycle assessment of algae biodiesel and its co-products. *Applied Energy* 161, 300-308. 2016.

- González Luz Estela, Canizares Rosa Olivia, Baena Sandra.** Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology* 60, 259-262. 1997.
- González-Fernández Cristina, Molinuevo-Salces Beatriz, García-Gonzalez Maria Cruz.** Nitrogen transformation under different conditions in open ponds by means of microalgae-bacteria consortium treating pig slurry. *Bioresource Technology* 102, 960-966. 2011.
- Gouveia L., Nobre B.P., Marcelo F.M., Mrejen S., Cardoso M.T., Palavra A.F., Mendes R.L.** Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. *Food Chemistry* 101, 717-723. 2007.
- Greenwell H.C., Laurens L.M.L., Shields R.J., Lovitt R.W., Flynn K.J.** Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. *J.R. Soc. Interface* 7, 703-726. 2010.
- Grobbelaar, J.U.** In: Richmond, A. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 97-115. 2004.
- Guccione Alessia, Biondi Natascia, Sampietro Giacomo, Rodolfi Liliana, Bassi Niccolò, Tredici Mario R.** *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. *Biotechnology for Biofuels* 7, 84. 2014.
- Guedes A.C., Katkam N.G., Varela J., Malcata F.X.** Photobioreactors for cyanobacterial culturing. *Cyanobacteria: An Economic Perspective (capitolo 17)*. Winely Online Library. 2014.
- Gupta Prabuddha L., Choi Hee Jeong, Lee Seung-Mok.** Enhanced nutrient removal from municipal wastewater assisted by mixotrophic microalgal cultivation using glycerol. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 10114-10123. 2016.
- Gutzeit G., Lorch D., Weber A., Engels M., Neis U.** Bioflocculent algal-bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science & Technology* 52, 9-18. 2005.
- Hajar Husam A. Abu, Riefler R. Guy, Stuart Ben J.** Anaerobic digestate as a nutrient medium for the growth of the green microalga *Neochloris oleoabundans*. *Env. Eng. Res* 21, 265-275. 2016.
- Halfhide Trina, Akerstrom Anette, Lekang Odd Ivar, Gislerod Hans Ragnar, Ergas Sarina J.** Production of algal biomass, chlorophyll, starch and lipid using aquaculture wastewater under axenic and non-axenic conditions. *Algal Research* 6, 152-159. 2014.
- Halim R., Danquah M.K., Webley P.A.** Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnol. Adv.* 30, 709-732. 2012.
- Han F., Huang J., Li Y., Wang W., Wan M., Shen G., Wang J.** Enhanced lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* through the culture strategy of semi-continuous cultivation with lipid limitation and pH control by CO₂. *Bioresource Technology* 136, 418-424. 2013.
- Han S.F., Jin W.B., Tu R.J., Wu W.M.** Biofuel production from microalgae as feedstock: current status and potential. *Critical Reviews in Biotechnology* 35, 255-268. 2015.
- Han Songfang, Jin Wenbiao, Chen Yangguang, Tu Renjie, Abomohra Abd El-Fatah.** Enhancement of Lipid Production of *Chlorella Pyrenoidosa* Cultivated in Municipal Wastewater by Magnetic Treatment. *Appl Biochem Biotechnol* 180, 1043-1055. 2016.
- Hansen C.L., Cheong D.Y.** Agricultural Waste Management in Food Processing. In *Handbook of Farm, Dairy, and Food Machinery Engineering*; Academic Press: Cambridge, MA, USA. 2013.

- Hartmann H., Ahring B.K.** Strategies for the anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: An overview. *Water Sci. Technol.* 53, 7–22. 2006.
- He P.J., Mao B., Shen C.M., Shao L.M., Lee D.J., Chang J.S.** Cultivation of *Chlorella vulgaris* on wastewater containing high levels of ammonia for biodiesel production. *Bioresource Technology* 129, 177-181. 2013.
- Hill J., Nelson E., Tilman D., Polasky S., Tiffany, D.** Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 11206–11210. 2006.
- Ho Shih-Hsin, Chen Ching-Nen Nathan, Lai Yen-Liang, Lu Wei-Bin, Chang Jo-Shu.** Exploring the high lipid production potential of a thermotolerant microalga using statistical optimization and semi-continuous cultivation. *Bioresource Technology* 163, 128-135. 2014.
- Hoekman S. Kent, Broch Amber, Robbins Curtis, Cenicerros Eric, Natarajan Mani.** Review of biodiesel composition, properties and specifications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16, 143-169. 2012.
- Honda R., Boonnorat J., Chiemchaisri C., Chiemchaisri W., Yamamoto K.** Carbon dioxide capture and nutrient removal utilizing treated sewage by concentrated microalgae cultivation in a membrane photobioreactor. *Bioresource Technology* 125, 59-64. 2012.
- Honda R., Teraoka Y., Noguchi M., Yang S.** Optimization of hydraulic retention time and biomass concentration in microalgae biomass production from treated sewage with a membrane photobioreactor. *Journal of Water and Environment Technology* 15, 1-11. 2017.
- Hosikian Aris, Lim Su, Halim Ronald, Danquah Michael K.** Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. *International Journal of Chemical Engineering* 2010, 391632. 2010.
- Hu Xiaofang, Song Chunfeng, Mu Haonan, Luiu Zhengzheng, Kitamura Yutaka.** Optimization of simultaneous soybean processing wastewater treatment and flue gas CO₂ fixation via *Chlorella* sp. L166 cultivation. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8, art 103960. 2020.
- Huang B., Hong H.** Alkaline phosphatase activity and utilization of dissolved organic phosphorus by algae in subtropical coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 39, 205-211. 1999.
- Huesemann Michael H., Benemann John R.** Biofuels from microalgae: review of products, processes and potential with species focus on *Dunaliella* sp. *The Alga Dunaliella: biodiversity, physiology, genomics and biotechnology.* Science Publisher Book. 2009.
- Ioannou L.A., Puma G.L., Fatta-Kassinos D.** Treatment of winery wastewater by physicochemical, biological and advanced processes: a review. *Journal of Hazardous Materials* 286, 343-368. 2015.
- Izzo F.C., Ferriani B., Van den Berg K.J., Van Keulen H., Zendri E.** 20th century artists' oil paints: the case of the Olii by Lucio Fontana. *J Cult Herit* 2014.
- Izzo F.C., Zanin C., van Heulen H., de Roit C.** From pigments to paints: studying original materials from the atelier of the artist Mariano Fortuny y Madrazo. *Int J Conserv Sci* 8, 547-564. 2017.
- Izzo F.C., Zendri E., Bernardi A., Balliana E., Sgobbi M.** The study of pitch via gas chromatography-mass spectrometry and Fourier-transformed infrared spectroscopy: the case of the Roman amphoras from Monte Poro, Calabria (Italy). *J Archaeol Sci* 40, 595–600. 2013.
- Jankowska Ewelina, Sahu Ashish K., Oleskiewicz-Popiel Piotr.** Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 75, 692-709. 2017.

- Jenkins S. R., Morgan J. M., Sawyer C. L.** Measuring anaerobic sludge digestion and growth by a simple alkalimetric titration. *J. WPCF* 55(5), 448–453. 1983.
- Jet fuel from microalgal lipids.** National Renewable Energy Laboratory, 2006.
- Ji Fang, Zhou Yuguang, Pang Aiping, Ning Li, Rodgers Kibet, Liu Ying, Dong Renjie.** Fed-batch cultivation of *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater for improved nutrient removal and biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 184, 116–122. 2015.
- Jiménez Carlos, Cossío Belén R., Niell F. Xavier.** Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. *Acquaculture* 221, 331-345. 2003.
- Jouanneau S., Recoules L., Durand M.J., Boukabache A., Picot V., Primault Y., Lakel A., Sengelin M., Barillon B., Thouand G.** Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review. *Water Res.* 49, 62–82. 2014.
- Justo G.Z., Silva M.R., Queiroz M.L.** Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 23, 119–132. 2001.
- Källqvist T., Svenson A.** Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis*, Chlorophyta. *Water Res.* 37, 477–484. 2003.
- Kaspar Heinrich, Keys Elizabeth F., King Nick, Smith Kristy F., Kesarcodi-Watson Aditya, Miller Matthew R.** Continuous production of *Chaetoceros calcitrans* in a system suitable for commercial hatcheries. *Acquaculture* 420-421, 1-9. 2014.
- Kim Ga-Yeong, Yun Yeo-Myeong, Shin Hang-Sik, Kim Hee-Sik, Han Jong-In.** *Scenedesmus*-based treatment of nitrogen and phosphorus from effluent of anaerobic digester and bio-oil production. *Bioresource Technology* 196, 235-240. 2015.
- Kimura S., Yamada T., Ban S., Koyama M., Toda T.** Nutrient removal from anaerobic digestion effluents of aquatic macrophytes with the green alga, *Chlorella sorokiniana*. *Biochemical Engineering Journal* 142, 170-177. 2019.
- Kiss A.A., Dimian A.C., Rothenberg G.** Solid acid catalysts for biodiesel production – towards sustainable energy. *Advanced Synthesis & Catalysis* 348, 75–81. 2006.
- Kitada K., Machmudah S., Sasaki M., Goto M., Nakashima Y., Kumamoto S.** Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. *J Chem Technol Biotechnol* 84, 657–61. 2009.
- Kligerman Debora Cinamon, Bouwer Edward J.** Prospects of biodiesel production from algae-based wastewater treatment in Brazil: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52, 1834-1846. 2015.
- Knothe G.** Analyzing biodiesel: standards and other methods. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 83, 823-33. 2006.
- Knothe G.** Oxidative stability of biodiesel. *The biodiesel handbook*, AOCS Press Illinois. 2005.
- Koller Martin, Muhr Alexander, Braunegg Gerhart.** Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research* 6, 52–63. 2014.
- Kong F., Ren H-Y., Zhao L., Nan J., Ren N-Q., Liu B-F., Ma J.** Semi-continuous lipid production and sedimentation of *Scenedesmus* sp. by metal ions in the anaerobic fermentation effluent. *Energy Conversion and Management* 203, 112216. 2020.

Koutra Eleni, Grammatikopoulos George, Kornaros Michael. Microalgal post-treatment of anaerobically digested agro-industrial wastes for nutrient removal and lipid production. *Bioresource Technology* 224, 473-480. 2017.

Koutra Eleni, Grammatikopoulos George, Kornaros Michael. Selection of microalgae intended for valorization of digestate from agro-waste mixtures. *Waste Management* 73, 123-129. 2018.

Kuo Chiu-Mei, Chen Tsai-Yu, Lin Tsung-Hsien, Kao Chien-Ya, Lai Jinn-Tsyy, Chang Jo-Shu, Lin Chih-Sheng. Cultivation of *Chlorella* sp. GD using piggery wastewater for biomass and lipid production. *Bioresource Technology* 194, 326-333. 2015.

Lam M.K., Lee K.T. Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnol Adv* 30, 673–690. 2012.

Lardon Laurent, Hélias Arnaud, Sialve Bruno, Steyer Jean-Philippe, Bernard Oliver. Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. *Environmental Science Technology* 43, 6475-6481. 2009.

Laurens Lieve M, McMillans James D. State of Technology Review on Algal Bioenergy. IEA Bioenergy Task 39-led Intertask Strategic Project. 2017.

Lavoie A., de la Noue J. Harvesting of *Scenedesmus obliquus* in wastewater: auto- or bioflocculation? *Biotechnology and Bioengineering* 30, 852-859. 1987.

Ledda Claudio, Idà Antonio, Allemand Donatella, Mariani Paola, Adani Fabrizio. Production of wild *Chlorella* sp. cultivated in digested and membrane-pretreated swine manure derived from a full-scale operation plant. *Algal Research* 12, 68-73. 2015.

Lee S-A., Lee N., Oh H-M., Ahn C-Y. Stepwise treatment of undiluted raw piggery wastewater, using three microalgal species adapted to high ammonia. *Chemosphere* 263, 127934. 2021.

Lempereur V., Penavayre S.J.B. Grape Marc, Wine Lees and deposit of the must: how to manage oenological by-products. *BIO web of conferences* 3, 1011. 2014.

Li T., Wu H., Wang G., Dai S., Fan J., He H., Xiang W. A saponification method for chlorophyll removal from microalgae biomass as oil feedstock. *Marine Drugs* 14, 162-181. 2016.

Li X., Xu H., Wu Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 98, 764-771. 2007.

Li Yecong, Chen Yi-Feng, Chen Paul, Min, Zhou Wenguang, Martinez Blanca, Zhu Jun, Ruan Roger. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresource Technology* 102, 5138-5144. 2011.

Li Yue, Chen Yinguang, Wu Jiang. Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: A review. *Applied Energy* 240, 120-137. 2019.

Liang Yanna, Sarkany Nicolas, Cui Yi. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett* 31, 1043-1049. 2009.

Lichtenthaler H.K., Buschmann C. Extraction of Photosynthetic Tissues: Chlorophylls and Carotenoids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001.

Liu Shan, Elvira Perova, Wang Yongkang, Wang Wei. Growth and nutrient utilization of green algae in batch and semicontinuous autotrophic cultivation under high CO₂ concentration. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 188, 836-853. 2019.

Liu Xiaowei, Saydah Benjamin, Eranki Pragnya, Colosi Lisa M., Mitchell B. Greg, Rhodes James, Clarens Andres F. Pilot-scale data provide enhanced estimates of the life cycle energy and emissions profile of algae biofuels produced via hydrothermal liquefaction. *Bioresource Technology* 148, 163-171. 2013.

Loera-Quezada M.M., Olguin E.J. Oleaginous microalgae as source of biodiesel: challenges and opportunities. *Rev. Latinoam. Biotechnol. Amb. Algal* 1, 91-116. 2010.

Luo Y., Le-Clech P., Henderson R.K. Simultaneous microalgae cultivation and wastewater treatment in submerged membrane photobioreactor: a review. *Algal Research* 24, 425-437. 2017.

Lv Jiang-Ming, Cheng Li-Hua, Xu Xin-Hua, Zhang Lin, Chen Huan-Lin. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology* 101, 6797-6804. 2010.

Mallick Nirupama, Mandal Shovon, Singh Amit Kumar, Bishai Moumita, Dash Archana. Green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel. *J Chem Technol Biotechnol* 87, 137-145. 2011.

Marazzi F., Sambusiti C., Monlau F, Cecere S.E., Scaglione D., Barakat A., Mezzanotte V., Ficara E. A novel option for reducing the optical density of liquid digestate to achieve a more productive microalgal culturing. *Algal Research* 24, 19-28. 2017.

Marazzi Francesca, Bellucci Micol, Fornaroli Riccardo, Bani Alessia, Ficara Elena, Mezzanotte Valeria. Lab-scale testing of operation parameters for algal based treatment of piggery wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 95, 967-974. 2019.

Marbelia L., Bilal M.R., Passaris I., Discart V., Vandamme D., Beuckels A., Muylaert K., Vankelecom I.F.J. Membrane photobioreactors for integrated microalgae cultivation and nutrient remediation of membrane bioreactors effluent. *Bioresource Technology* 163, 228-235. 2014.

Marchetti R. Possibili utilizzi in agricoltura dei reflui e dei fanghi prodotti dagli stabilimenti enologici. *Ind. Delle Bevande* 23, 589-594. 1994.

Markou Giorgos, Vandamme Dries, Muylaert Koenraad. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research* 45, 186-202. 2014.

Martin C., de la Noue J., Picard G. Intensive cultivation of freshwater microalgae on aerated pig manure. *Biomass* 7, 245-259. 1985.

Martinez M.E., Sanchez S., Jimenez J.M., Yousfi F.E., Munoz L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresourc Technol* 73, 263–272. 1999.

Massa Marina, Buono Silvia, Langellotti Antonio Luca, Castaldo Luigi, Martello Anna, Paduano Antonello, Sacchi Raffaele, Fogliano Vincenzo. Evaluation of anaerobic digestates from different feedstocks as growth media for *Tetradismus obliquus*, *Botryococcus braunii*, *Phaeodactylum tricornutum* and *Arthrospira maxima*. *New Biotechnology* 36, 8-16. 2017.

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

Matamoros V., Gutierrez R., Ferrer I., Garcia J., Bayona J.M. Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: a pilot-scale study. *Journal of Hazardous Materials* 288, 34-42. 2015.

Mathiot Charlie, Ponge Pauline, Gallard Benjamin, Sassi Jean-Francois, Delrue Florian, La Moigne Nicolas. Microalgae starch-based bioplastics: screening of ten strains and plasticization of unfractionated microalgae by extrusion. *Carbohydrate Polymers*, Elsevier, 208, 142-151. 2020.

- Medina M., Neis U.** Symbiotic algal bacterial wastewater treatment: effect of food to microorganism ratio and hydraulic retention time on the process performance. *Water Science and Technology* 55, 165-171. 2007.
- Meegoda Jay N., Li Brian, Patel Kush, Wang Lily B.** A Review of the Processes, Parameters, and Optimization of Anaerobic Digestion. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15, art 2224. 2018.
- Mendes R.L., Fernandes H.L., Coelho J., Reis E., Cabra I.J., Novais J.** Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry* 53, 99–103. 1995.
- Mercer P., Armenta R.E.** Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 539–547. 2011.
- Miao X., Wu Q.** Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* 97, 841-846. 2006.
- Modi M.K., Reddy J.R.C., Rao B.V.S.K., Prasad R.B.N.** Lipase mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethylacetate. *Bioresource Technology* 98, 1260–1264. 2007.
- Moheimani N.R.** Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp. (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 25, 387-398. 2013.
- Moheimani N.R.** The culture of Coccolithophorid Algae for carbon dioxide bioremediation. PhD thesis. Murdoch University 2005.
- Molina Grima E, Ación Fernández FG, García Camacho F, Chisti Y.** Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J Biotechnol* 70, 231–247. 1999.
- Molina Grima E., Belarbi E-H., Ación Fernández F.G., Robles Medina A., Chisti Y.** Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* 20, 491-515. 2003.
- Monlau F., Sambusiti C., Ficara E., Aboulkas A., Barakat A., Carrère H.** New opportunities for agricultural digestate valorization: current situation and perspectives. *Energy and Environmental Science.* 8, 2600. 2015.
- Moreira J.B., Terra A.L.M., Costa J.A.V., Morais M.G.** Utilization of CO₂ in semi-continuous cultivation of *Spirulina* sp. and *Chlorella fusca* and evaluation of biomass composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 33, 691-698. 2016.
- Morimoto T., Nagatsu A., Murakami N., Sakakibara J., Tokuda H., Nishino H.** Anti-tumour-promoting glyceroglycolipids from the green alga, *Chlorella vulgaris*. *Phytochemistry* 40, 1433–1437. 1995.
- Moset V., Poulsen M., Wahid R., Højberg O., Møller H.B.** Mesophilic versus thermophilic anaerobic digestion of cattle manure: Methane productivity and microbial ecology. *Microb. Biotechnol.* 8, 787–800. 2015.
- Mulbry W., Kondrad S., Buyer J.** Treatment of dairy and swine manure effluents using freshwater algae: fatty acid content and composition of algal biomass at different manure loading rates. *J. Appl. Phycol.* 20, 1079–1085. 2008.
- Muñoz Raul, Guieysse Benoit.** Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research* 40, 2799-2815. 2006.
- Murto M., Björnsson L., Mattiasson B.** Impact of food industrial waste on anaerobic co-digestion of sewage sludge and pig manure. *Journal of Environmental Management* 70, 101-107. 2004.

- Muttamara S.** Wastewater characteristics. *Resour Conserv Recy* 16, 145–159. 1996.
- Narala R.R.** Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two-stage hybrid system. *Front. Energy Res.* 4 1-10. 2016.
- Naziri E., Mantzouridou F., Tsimidou M.Z.** Recovery of squalene from wine lees using ultrasound assisted extraction: a feasibility study. *J. Agric. Food Chem.* 60, 9195-9201. 2012.
- Nelson L.A., Foglia T.A., Marmer W.N.** Lipase-catalyzed production of biodiesel. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 311. 1191–1195. 1996.
- Neto A.M.P., Sotana de Souza R.A., Leon-Nino A.D., da Costa J.D.A., Tiburcio R.S., Nunes T.A.** Improvement in microalgae lipid extraction using sonication-assisted method. *Renewable Energy* 55, 525–531. 2013.
- Nwoba Emeka G., Ayre Jeremy M., Moheimani Navid R., Ubi Benjamin E., Ogonna James C.** Growth comparison of microalgae in tubular photobioreactor and open pond for treating anaerobic digestion piggy effluent. *Algal Research* 17, 268-276. 2016.
- Oliver R.L., Ganf G.G.** *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space.* Kluwer Academic Publishers, New York, 149-194. 2000.
- Palatsi J., Laurenzi M., Andrés M.V., Flotats X., Nielsen H.B., Angelidaki I.** Strategies for recovering inhibition caused by long chain fatty acids on anaerobic thermophilic biogas reactors. *Bioresource Technology* 100, 4588-4596. 2009.
- Parsy A., Sambusiti C., Baldon-Andrey P., Elan T., Périé F.** Cultivation of *Nannochloropsis oculata* in saline oil & gas wastewater supplemented with anaerobic digestion effluent as nutrient source. *Algal Research* 50, 101966. 2020.
- Patel Anil Kumar, Joun Jae Min, Hong Min Eui, Sim Sang Jun.** Effect of light conditions on mixotrophic cultivation of green microalgae. *Bioresource Technology* 282, 245-253. 2019.
- Perez-Garcia Octavio, Escalante Froylan M.E., de-Bashan Luz E., Bashan Yoav.** Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* 45, 11-36. 2011
- Petkov Georgi, Garcia Guillermo.** Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 281-285. 2007.
- Pittman Jon K., Dean Andrew P., Osundeko Olumayoma.** The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology* 102, 17-25. 2011.
- Pizzera A., Scaglione D., Bellucci M., Marazzi F., Mezzanotte V., Parati K., Ficara E.** Digestate treatment with algae-bacteria consortia: a field pilot-scale experimentation in a sub-optimal climate area. *Bioresource Technology* 274, 232-343. 2019.
- Posadas E., Bochon S., Coca M., Garcia-Gonzalez M.C., Garcia-Encina P.A., Muñoz R.** Microalgae-based agro-industrial wastewater treatment: a preliminary screening. *J. Appl. Phycol.* 26, 2335-2345. 2014.
- Posadas E., Morales M.M., Gomez C., Ación F.G., Muñoz R.** Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. *Chem. Eng. J.* 265, 239-248. 2015.
- Powell N., Shilton A., Chisti Y., Pratt S.** Towards a luxury uptake process via microalgae defining the polyphosphate dynamics. *Water Res.* 43 4207-4213. 2009.

- Powell N., Shilton A., Pratt S., Chisti Y.** Luxury uptake of phosphorus by microalgae in full-scale waste stabilisation ponds. *Water Sci. Technol.* 63, 704-709. 2011.
- Pragya N., Pandey K.K., Sahoo P.K.** A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 24, 159-171. 2013.
- Pribyl P., Cepak V., Zachleder V.** Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 94, 549–561. 2012.
- Raja R., Hemaiswarya S., Kumar N.A., Sridhar S., Rengasamy R.** A perspective on the biotechnological potential of microalgae. *Critical Reviews in Microbiology* 34, 77–88. 2008.
- Ramirez-Lopez Citlally, Perales-Vela Hugo Virgilio, Fernandez-Linares Luis.** Biomass and lipid production from *Chlorella vulgaris* UTEX 26 cultivated in 2m³ raceway ponds under semicontinuous mode during the spring season. *Bioresource Technology* 274, 252-260. 2019.
- Rawat I., Kumar R. Ranjith, Mutanda T., Bux F.** Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 88, 3411-3424. 2011.
- Razzak Shaik A., Hossain Mohammad M., Lucky Rahima A., Bassi Amarjeet S., de Lasa Hugo.** Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27, 622–653. 2013.
- Richardson B., Orcutt D.M., Schwertner N.A., Martinez C.L., Wickline H.E.** Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18, 245-250. 1969.
- Richmond A.** Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd. 2004.
- Richmond A.** Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Hydrobiologia* 512, 33–37. 2004.
- Rigon C., Izzo F.C., Vázquez De Ágredos Pascual M.L., Campíns-Falcó P., Van Keulen H.** New results in ancient Maya rituals researches: The study of human painted bones fragments from Calakmul archaeological site (Mexico). *J Archaeol Sci Reports* 32, 102418. 2020.
- Rittman B.E., McCarty P.L.** Environmental Biotechnology: principles and applications. McGraw-Hill Book Co, New York. 2001.
- Rosenberg J.N., Oyler G.A., Wilkinson L., Betenbaugh M.J.** A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 430–436. 2008.
- Ruiz-Marin Alejandro, Mendosa-Espinosa Leopoldo G., Stephenson Tom.** Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology* 101, 58-64. 2010.
- Ruiz-Martinez A., Garcia N.M., Romero I., Seco A., Ferrer J.** Microalgae cultivation in wastewater: nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresour. Technol.* 126, 247-253. 2012.
- Safafar H., Norregaard P.U., Ljubic A., Moller P., Holdt S.L., Jacobsen C.** Enhancement of Protein and Pigment Content in Two *Chlorella* Species Cultivated on Industrial Process Water. *Journal of Marine Science and Engineering* 4, 1-15. 2016.

- Safi Carl, Zebib Bachar, Merah Othomane, Pontalier Pierre-Yves, Vaca-Garcia Carlos.** Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35, 265–278. 2014.
- Salama El-Sayed, Kurade Mayur B., Abou-Shanab Reda A.I., El-Dalatony Marwa M., Yang Il-Seung, Min Booki, Jeon Byong-Hun.** Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 79, 1189-1211. 2017.
- Salati S., D'Imporzano G., Menin B., Veronesi D., Scaglia B., Abbruscato P., Mariani P., Adani F.** Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. *Bioresource Technology* 230, 82-89. 2017.
- Sánchez Mirón A., Cerón García M.C., Contreras Gómez A., García Camacho F., Molina Grima E., Chisti Y.** Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem Eng J* 16, 287–297. 2003.
- Sandani W.P., Nishshanka G.K.S.H., Premaratne R.G.M.M., Wijayasekera S.C.N., Ariyadasa T.U., Premachandra J.K.** Comparative assessment of pretreatment strategies for production microalgae-based biodiesel from locally isolated *Chlorella homosphaera*. *Journal of Bioscience and Biotechnology* 130, 295-305. 2020.
- Sayed F., Kermanshahi-pour A., He Q.S., Tibbetts S.M., Lalonde C.G.E., Brar S.K.** Microalgae cultivation in thin stillage anaerobic digestate for nutrient recovery and bioproduct production. *Algal Research* 47, 101867. 2020.
- Scaglione D., Tornotti G., Teli A., Lorenzoni L., Ficara E., Canziani R., Malpei F.** Nitrification denitrification via nitrite in a pilot-scale SBR treating the liquid fraction of co-digested piggery/poultry manure and agro-wastes. *Chemical Engineering Journal* 228, 935-943. 2013.
- Sepúlveda C., Ación F.G., Gómez C., Jiménez-Ruiz N., Riquelme C., Molina Grima E.** Utilization of centrate for the production of the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Algal Research* 9, 107-116. 2015.
- Serejo M.L., Posadas E., Bonez M.A., Blanco S., Garcia-Encina P.A., Muñoz R.** Influence of biogas flow rate on biomass composition during the optimization of biogas upgrading in microalgal-bacterial processes. *Environ. Sci. Technol.* 49, 3228-3236. 2015.
- Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P.** A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae. U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development, USA. 1998.
- Sheets J.P., Yang L., Ge X., Wang Z., Li Y.** Beyond land application: Emerging technologies for the treatment and reuse of anaerobically digested agricultural and food waste. *Waste Manage* 44, 94–115. 2015.
- Shimada Y., Watanabe Y., Sugihara A., Tominaga Y.** Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction oil processing. *Journal of Molecular Catalysis Enzymatic* 17, 133–142. 2002.
- Shimura H., Itoh K., Sugiyama A., Ichijo S., Ichijo M.** Absorption of radionuclides from the Fukushima nuclear accident by a novel algal strain. *PLoS ONE* 7, e44200. 2012.
- Shin D.Y., Cho H.U., Utomo J.C., Choi Y.-N., Xu X., Park J.M.** Biodiesel production from *Scenedesmus bijuga* grown in anaerobically digested food wastewater effluent. *Bioresour. Technol.* 184, 215–221. 2015.
- Shin Ye Sol, Choi Hong Il, Choi Jin Won, Lee Jeong Seop, Sung Young Joon, Sim Sang Jun.** Multilateral approach on enhancing economic viability of lipid production from microalgae: a review. *Bioresource Technology* 258, 335-344. 2018.

- Shlesinger Ami, Eisenstadt Doron, Bar-Gil Amicam, Carmely Hilla, Einbinder Shai, Gressel Jonathan.** Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production. *Biotechnology Advances* 30, 1023-1030. 2012.
- Shuba Eyasu Shumbulo, Kifle Demeke.** Microalgae to biofuels: 'Promising' alternative and renewable energy, review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 81, 743-755. 2018.
- Silkina A., Zacharof M-P., Hery G., Nouvel T., Lovitt R.W.** Formulation and utilization of spent anaerobic digestate fluids for the growth and product formation of single cell algal cultures in heterotrophic and autotrophic conditions. *Bioresource Technology* 244, 1445-1455. 2017.
- Singh M., Reynolds D.L., Das K.C.** Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestion. *Bioresource Technology* 102, 10841-10848. 2011.
- Solmaz A., İşik M.** Optimization of membrane photobioreactor; the effect of hydraulic retention time on biomass production and nutrient removal by mixed microalgae culture. *Biomass and Bioenergy* 142, 105809. 2020.
- Srivastava A., Prasad R.** Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 4, 111-133. 2000.
- Takabe Yugo, Hidaka Taira, Tsumori Jun, Minamiyama Mizuhiko.** Effects of hydraulic retention time on cultivation of indigenous microalgae as a renewable source using secondary effluent. *Bioresource Technology* 207, 399-408. 2016.
- Talebi A.F., Tabataei M., Mohtashami S.K., Tohidfar M., Moradi F.** Comparative salt stress study on intracellular ion concentration in marine and salt-adapted freshwater strains of microalgae. *Notula Scientia Biologicae*, 5 (3), 309-315. 2013.
- Tambiev A.H., Shelyastina N.N., Kirikova N.N.** Exometabolites of lipid nature from two species of marine microalgae. *Funct. Ecol.* 3, 245-247. 1989.
- Tan X.B., Lam M.K., Uemura Y., Lim J.W., Wong C.Y., Ramli A., Kiew P.L., Lee K.T.** Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* using chicken compost as nutrient source: optimization study and fatty acid composition analysis. *Energy Conversion and Management* 164, 363-373. 2018.
- Tan Xiao-Bo, Yang Li-Bin, Zhang Wen-Wen, Zhao Xian-Chao.** Lipids production and nutrients recycling by microalgae mixotrophic culture in anaerobic digestate of sludge using wasted organics as carbon source. *Bioresource Technology* 297, art 122379. 2020.
- Tandon Puja, Jin Qiang, Huang Limin.** A promising approach to enhance microalgae productivity by exogenous supply of vitamins. *Microbial Cell Factories* 16, 219. 2017.
- Thi Nguyen M-L., Lin C-Y., Lay C-H.** Microalgae cultivation using biogas and digestate carbon sources. *Biomass and Bioenergy* 122, 426-432. 2019.
- Tu R., Jin W., Wang M., Han S., Abomohra A.E-F., Wu W-M.** Improving of lipid productivity of the biodiesel promising green microalga *Chlorella pyrenoidosa* via low-energy ion implantation. *J. Appl. Phycol.* 28, 2159-2166. 2016.
- Uduman N., Qi Y., Danquah M.K., Forde G.M., Hoadley A.** Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable Sustainable Energy* 2, art. 012701. 2010.

- Uggetti Enrica, Sialve Bruno, Latrille Eric, Steyer Jean-Philippe.** Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresource Technology* 152, 437-443. 2014.
- Van Den Hende S., Vervaeren H., Boon N.** Flue gas compounds and microalgae: (Bio-)chemical interactions leading to biotechnological opportunities. *Biotechnol. Adv.* 30, 1405-1424. 2012.
- Van den Hoek C., Mann D., Jahns H.** *Algae: an introduction to phycology.* Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press. 1995.
- Van Do Thi Cam, Nguyen Thi Nham Tuat, Tran Dang Thuan, Le Truong Giang, Nguyen Van Tuyen.** Semi-continuous removal of nutrients and biomass production from domestic wastewater in raceway reactors using *Chlorella variabilis* TH03-bacteria consortia. *Environmental Technology & Innovation* 20, art 101172. 2020.
- Van Lier J.B., Mahmoud N., Zeeman G.** Anaerobic Wastewater Treatment. In *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*; International Water Association: London, UK. 401–442. 2008.
- Verma S.** *Anaerobic Digestion of Biodegradable Organics in Municipal Solid Wastes*; Columbia University: New York, NY, USA. 2002.
- Wang Bei, Li Yancun, Wu Nan, Lan Christopher Q.** CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 79, 707–718. 2008.
- Wang Liang, Li Yecong, Chen Paul, Min, Chen Yifeng, Zhu Jun, Ruan Roger R.** Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology* 101, 2623-2628. 2010.
- Wang Liang, Wang Yingkuan, Chen Paul, Ruan Roger.** Semi-continuous Cultivation of *Chlorella vulgaris* for Treating Undigested and Digested Dairy Manures. *Appl Biochem Biotechnol* 162, 2324-2332. 2010.
- Wang Q., Yu Z., Wei D.** High-yield production of biomass, protein and pigments by mixotrophic *Chlorella pyrenoidosa* through the bioconversion of high ammonium in wastewater. *Bioresource Technology* 313, 123499. 2020.
- Warabi Y., Kusdiana D., Saka S.** Reactivity of triglycerides and fatty acids of rapeseed oil in supercritical alcohols. *Bioresource Technology* 91, 283-287. 2004.
- Wilbanks T.J., Fernandez S.** *Climate Change and Infrastructure, Urban Systems, and Vulnerabilities: Technical Report for the US Department of Energy in Support of the National Climate Assessment*, Island Press. 2014.
- Wilson K.E., Huner N.P.A.** The role of growth rate, redox-state of the plastoquinone pool and the thylakoid pH in photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to growth irradiance and temperature. *Planta* 212, 93–102. 2000.
- Wolfe R.S.** *Techniques for Cultivating Methanogens in Methods in Enzymology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA. Volume 494, 1–22. 2011.
- Wu Yin-Hu, Hu Hong-Ying, Yu Yin, Zhang Tian-Yuan, Zhu Shu-Feng, Zhuang Lin-Lan, Zhang Xue, Lu Yun.** Microalgal species for sustainable biomass/lipid production using wastewater as resource: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33, 675-688. 2014.
- Xia Ao, Murphy Jerry D.** Microalgal Cultivation in Treating Liquid Digestate from Biogas Systems. *Trends in Biotechnology* 34, 264-275. 2016.

- Xin Bei, Lam Man Kee, Uemura Yoshimitsu, Lim Jun Wei, Wong Chung Yiin, Ramli Anita, Kiew Peck Loo, Lee Keat Teong.** Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* using chicken compost as nutrient source: growth optimization study and fatty acid composition analysis. *Energy Conversion and Management* 164, 363-373. 2018.
- Xu Jie, Zhao Yongjun, Zhao Guohua, Zhang Hui.** Nutrient removal and biogas upgrading by integrating freshwater algae cultivation with piggery anaerobic digestate liquid treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 6493-6501. 2015.
- Yamamoto M., Fujishita M., Hirata A., Kawano S.** Regeneration and maturation of daughter cellwalls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *J Plant Res* 117, 257–264. 2004.
- Yamamoto M., Kurihara I., Kawano S.** Late type of daughter cellwalls ynthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta* 221, 766–775. 2005.
- Yan Zhiying, Song Zilin, Yuan Yuexiang, Liu Xiaofeng, Zheng Tao.** The effects of initial substrate concentration, C/N ratio, and temperature on solid-state anaerobic digestion from composting rice straw. *Bioresource Technology* 177, 266-273. 2015.
- Yang Haijian, He Qiaoning, Hu Chunxiang.** Feasibility of biodiesel production and CO₂ emission reduction by *Monoraphidium dybowskii* LB50 under semi-continuous culture with open raceway ponds in the desert area. *Biotechnology for Biofuels* 11, 82-96. 2018.
- Yang Jia, Xu Ming, Zhang Xuezhi, Hu Qiang, Sommerfeld Milton, Chen Yongsheng.** Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Bioresource Technology* 102, 159-165. 2011.
- Yang Yi-Chun, Jian Zhong-Fu, Kuo Chiu-Mei, Zhang Wen-Xin, Lin Chih-Sheng.** Biomass and Lipid Production of *Chlorella* Sp. Using Municipal Wastewater under Semi-continuous Cultivation. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering* 101, 18-25. 2017.
- Yao Z., Ying C., Lu J., Lai Q., Zhou K., Wang H., Chen L.** Removal of K⁺, Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ from saline alkaline water using the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 31 (6), 1248-1256. 2013.
- Yin Zhihong, Zhu Liandong, Li Shaungxi, Hu Tianyi, Chu Ruoyu, Mo Fan, Hu Dan, Liu Chenchen, Li Bin.** A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. *Bioresource Technology* 301, art 122804. 2020.
- Yu Ze, Song Mingming, Pei Haiyan, Han Fei, Jiang Liqun, Hou Qingjie.** The growth characteristics and biodiesel production of ten algae strains cultivated in anaerobically digested effluent from kitchen waste. *Algal Research* 24, 265-275. 2017.
- Zahn J., Rong J., Wang Q.** Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *Int. J. Hydrogen Energy* 42, 8505–8517. 2017.
- Zeller M.A., Hunt R., Jones A., Sharma S.** Bioplastics and their thermoplastic blends from *Spirulina* and *Chlorella* microalgae. *Journal of Applied Polymer Science* 130, 3263-3275. 2013.
- Zheng Yang, Chen Zhaoan, Lu Hongbin, Zhang Wei.** Optimization of carbon dioxide fixation and starch accumulation by *Tetraselmis subcordiformis* in a rectangular airlift photobioreactor. *African Journal of Biotechnology* 10, 1888-1901. 2011.

Zhou W., Min M., Hu B., Ma X., Liu Y., Wang Q. Filamentous fungi assisted bio-flocculation: a novel alternative technique for harvesting heterotrophic and autotrophic microalgal cells. *Sep Purif Technol* 107, 158–165. 2013.

Zhu L.D., Li Z.H., Hiltunen E. Strategies for lipid production improvement in microalgae as a biodiesel feedstock. *BioMed Research International* 2016, 8792548. 2016.

Zhu Liandong, Wang Zhongming, Takala Josu, Hiltunen Erkki, Qin Lei, Xu Zhongbin, Qui Xiaoxi, Yuan Zhenhong. Scale-up potential of cultivating *Chlorella zofingiensis* in piggery wastewater for biodiesel production. *Bioresource Technology* 137, 318-325. 2013.

Zhu S., Huang W., Xu J., Wang Z., Xu J., Yuan Z. Metabolic changes of starch and lipid triggered by nitrogen starvation in the microalga *Chlorella zofingiensis*. *Bioresource Technology* 152, 292-298. 2014.

Zhu Shunni, Feng Siran, Xu Zhongbin, Qin Lei, Shang Changhua, Feng Pingzhong, Wang Zhongming, Yuan Zhenhong. Cultivation of *Chlorella vulgaris* on unsterilized dairy-derived liquid digestate for simultaneous biofuels feedstock production and pollutant removal. *Bioresource Technology* 285, art 121353. 2019.

Zuliani Luca, Frison Nicola, Jelic Aleksandra, Fatone Francesco, Bolzanella David, Ballottari Matteo. Microalgae Cultivation on Anaerobic Digestate of Municipal Wastewater, Sewage Sludge and Agro-Waste. *International Journal of Molecular Science* 17, art 1692. 2016.