



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale
in Scienze Ambientali

Tesi di Laurea

Valutazione della crescita di *Chlorella vulgaris* NIES-227 su effluente
liquido da co-fermentazione di rifiuti organici e fanghi di depurazione

Relatrice

Prof.ssa Cristina Cavinato

Correlatrice

Dott.ssa Alice Lanfranchi

Laureanda

Althea Fortina

870389

Anno accademico

2021/2022

INDICE

1.Introduzione	7
1.1 Processo di fermentazione anaerobica per la produzione di AGV	9
1.2 Le microalghe e la produzione di lipidi.....	15
1.2.1 Le Microalghe	17
1.2.2 Principali fattori che influenzano la crescita delle colture microalgali	19
1.3 Stato dell'arte sulla coltivazione di microalghe su AGV	25
1.4 Biodiesel di terza generazione	28
1.5 Scopo della tesi.....	33
2.Materiali e metodi	34
2.1 Ceppo microalgale e condizioni di coltivazione	34
2.2 Caratterizzazione del fermentato	36
2.3 Test di crescita microalgale su fermentato	37
2.3.1 <i>Fotoperiodo 24:0 con diluizione 1:2 e 1:5 (test 1)</i>	38
2.3.2 <i>Fotoperiodo 24:0 con diluizione 1:1 e 1:5 (test 2)</i>	39
2.3.3 <i>Fotoperiodo 12:12 con diluizione 1:2 (test 3)</i>	40
2.4 Monitoraggio e caratterizzazione della biomassa	41
3. Risultati e discussione	50
3.1 Fotoperiodo 24:0 con diluizione 1:2 e 1:5 (test 1)	50
3.2 Fotoperiodo 24:0 con diluizione 1:1 e 1:5 (test 2)	62
3.3 Fotoperiodo 12:12 con diluizione 1:2 (test 3).....	70
4.Conclusioni	83
Bibliografia	85

Indice delle figure

Figura 1. Fasi del processo di digestione anaerobica (Náthia-Neves et al., 2018).	9
Figura 2. Intervalli di temperatura della FA (Salbitani & Carfagna, 2021).	10
Figura 3. Curva di crescita batterica (Willey et., n.d.).	19
Figura 4. Principali generazioni di biofuels (Alam et al., 2015).	28
Figura 5. Percentuale di macromolecole presenti nelle microalghe (Uffenorde & Much, 1918).	30
Figura 6. Produzione di biodiesel e bioetanolo (Uffenorde & Much, 1918).	30
Figura 7. Reazione di transesterificazione (Mata et al., 2010).	31
Figura 8. <i>Chlorella vulgaris</i> NIES-227 (micropial.nl).	32
Figura 9. Condizioni test 1 con fotoperiodo 24:0.	38
Figura 10. Condizioni test 2 con fotoperiodo 24:0.	39
Figura 11. Condizioni test 3 con fotoperiodo 12:12.	40
Figura 12. Struttura interna camera di Bürker.	42
Figura 13. Camera di conta Bürker.	43
Figura 14. Liofilizzatore.	44
Figura 15. Biotage TurboVap.	45
Figura 16. Soluzione ossidante e catalizzante	47
Figura 17. Elettrodo (ISE HI4101).	48
Figura 18. Conta cellulare (A, C ed E) e peso secco (B, D, F e G) alle diverse diluizioni.	51
Figura 19. Tasso di crescita di <i>C. vulgaris</i> alle diverse diluizioni (A, B e C).	53
Figura 20. Consumo di AGV alle diverse diluizioni (A, B, C e D).	56
Figura 21. Efficienza di rimozione di sCOD con fotoperiodo 24:0.	58
Figura 22. Efficienza di rimozione di ammonio con fotoperiodo 24:0.	59
Figura 23. Conta cellulare (A, C ed E) e peso secco (B, D e F) alle diverse diluizioni.	62
Figura 24. Tasso di crescita del Controllo BG-11 (MX).	64
Figura 25. Consumo di AGV alle diverse diluizioni (A, B e C).	65
Figura 26. Efficienza di rimozione di sCOD con fotoperiodo 24:0.	66
Figura 27. Efficienza di rimozione di ammonio con fotoperiodo 24:0.	67
Figura 28. Conta cellulare (A, C ed E) e peso secco (B, D e F) alle diverse diluizioni.	70
Figura 29. Tasso di crescita di <i>C. vulgaris</i> alle diverse diluizioni.	72
Figura 30. Consumo di AGV alle diverse diluizioni.	75
Figura 31. Efficienza di rimozione di sCOD con fotoperiodo 12:12.	76

Figura 32. Efficienza di rimozione di ammonio con fotoperiodo 12:12.	78
---	----

Indice delle tabelle

Tabella 1. Composizione del terreno sintetico di coltura BG-11.	34
Tabella 2. Caratteristiche del fermentato.	36
Tabella 3. Caratteristiche dei test.	37
Tabella 4. Risultati riassuntivi del test 1.	61
Tabella 5. Risultati riassuntivi del test 2.	69
Tabella 6. Risultati riassuntivi del test 3.	79
Tabella 7. Riassunto dati.	81

Elenco Acronimi

COD (*Chemical Oxygen Demand*), AGV (*Acidi Grassi Volatili*), PS (*Peso Secco*), OGM (*Organismi Geneticamente Modificati*), HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), HRT (*Hydraulic Retention Time*), BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*), FA (*Fermentazione Anaerobica*), LED (*Light Emitting Diode*), DAH (*Dietil Ammino Etil Esanoato*), IAA (*Acido Indolacetico*), PHA (*Poliidrossialcanoati*), ROS (*Reactive Oxygen Species*), AE (*Abitanti Equivalenti*), DAD (*Diode Array Detector*), VS (*volatile solids*), TVS (*Solidi Totali Volatili*).

Abstract

Il presente lavoro di tesi ha valutato la crescita in batch di *Chlorella vulgaris* NIES-227 su fermentato non sterilizzato proveniente da scarti vegetali e fanghi di depurazione a diverse diluizioni (1:5, 1:2, 1:1) e fotoperiodi (24:0, 12:12), al fine di valutare la crescita microalgale, lo stoccaggio lipidico e la rimozione di ammonio e di sCOD.

Utilizzando un fotoperiodo 24h luce, è stato verificato che *C. vulgaris* è in grado di crescere su fermentato, ottenendo la concentrazione massima di biomassa, pari a $3,6 \pm 1,4 \text{ g L}^{-1}$, su fermentato tal quale. La percentuale maggiore di lipidi nella biomassa, pari al 65,9% è stata osservata su fermentato tal quale. La massima efficienza di rimozione di sCOD, pari all' 87,8% è stata ottenuta nel fermentato diluito 1:2, mentre per quanto riguarda la rimozione di ammonio tutti i test hanno presentato un ottimo *range*, compreso tra il 92,8% ed il 98,4%.

Nel fotoperiodo 12:12 la minore disponibilità di luce ha favorito la crescita dei microrganismi presenti nel fermentato, determinando il fallimento della coltura microalgale. E' stata comunque osservata una rimozione di sCOD e ammonio pari al 94,4% e all' 80,3% probabilmente dovuta alla comunità batterica del fermentato.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che microrganismi accumulatori di lipidi come *C. vulgaris* sono in grado di crescere su effluenti di fermentazione non sterilizzati con un fotoperiodo 24:0, esercitando contemporaneamente un effetto fitodepurativo grazie alla rimozione di ammonio e sCOD.

1.Introduzione

L'aumento della popolazione ha fatto insorgere problematiche relative all'aumento di rifiuti e reflui provenienti dalle attività antropiche. Inoltre ha portato ad un maggior consumo dei combustibili fossili in settori commerciali, domestici e industriali per produrre energia, generando un incremento dei gas serra in atmosfera ampliando ulteriormente l'attuale problema del cambiamento climatico e di conseguenza all'esaurimento della riserva dei combustibili fossili generando una crisi energetica (Liew et al., 2014).

Per risolvere questi problemi è nata la necessità di identificare e produrre combustibili sostitutivi con contenuto energetico sufficientemente elevato e allo stesso tempo rendere l'utilizzo del carburante più sostenibile, principalmente dal punto di vista ambientale ma anche economico e sociale. Una potenziale soluzione al problema è la produzione di biocarburante (o *biofuel*) di prima, seconda e terza generazione, in quanto è considerato una fonte di energia rinnovabile poiché viene prodotto da fonti rinnovabili come biomasse, grassi animali, piantagioni e oli usati (Liew et al., 2014).

Ad oggi, sono state condotte varie analisi sulla produzione di biocarburanti sulla base di diversi aspetti, tra i principali la performance economica, l'impatto ambientale e lo sviluppo sociale.

Le industrie che producono biocarburante iniziano ad espandersi con l'obiettivo di risolvere l'esaurimento dei combustibili fossili e i problemi ambientali generati dal loro utilizzo. Infatti, nell'ultimo decennio, la produzione di biocarburanti è aumentata rapidamente. Il Nord America produce più di 90.000 m³ di biocarburante/giorno, diventando così il più grande produttore mondiale di biocarburanti. Seguono l'America meridionale e centrale, l'Europa e l'Asia Pacifica. I biocarburanti come bioalcol, biogas, biodiesel, bioidrogeno e *pellet* possono essere in forma solida, liquida o gassosa e si differenziano per le materie prime e tecnologie di produzione, evolvendosi dalla prima alla terza generazione. I *biofuels* di prima e seconda generazione risultano a tutti gli effetti degli ottimi biocarburanti ma presentano alcune problematiche che verranno discusse nel paragrafo 1.4 (Liew et al., 2014).

Per questo, negli ultimi anni la ricerca si è orientata verso la produzione di biocarburanti di terza generazione che, a differenza delle prime due generazioni, derivano dalla biomassa algale e microalgale. Alghe e microalghe sono dotate di grandi potenzialità, al punto da essere considerate colture energetiche grazie alla loro efficienza fotosintetica pari al 10 % (contro il 5% delle piante superiori) (Di Caprio et al., 2019) e alla loro capacità di convertire l'energia solare in energia chimica,

immagazzinandola sotto forma di carboidrati (37-55%), lipidi (20-50%) e proteine (40-50%) (Uffenorde & Much, 1918) (Chen et al., 2013) (Soto-Sierra et al., 2018) . Le macromolecole stoccate possono essere quindi utilizzate per la produzione di bioidrogeno, bioetanolo, biodiesel e biometano.

Inoltre, le microalghe presentano molti altri vantaggi come: un rapido tasso di crescita (come *C.vulgaris*) che dipende e varia però in base alle condizioni di coltivazione, biomassa altamente biodegradabile, necessitano di un consumo minimo di acqua dolce e soprattutto agiscono come mezzo per il trattamento delle acque reflue, se coltivate su effluenti, rimuovendo sostanze organiche (sCOD) e nutrienti come azoto e fosforo (biorisanamento) (Di Caprio et al., 2019).

1.1 Processo di fermentazione anaerobica per la produzione di AGV

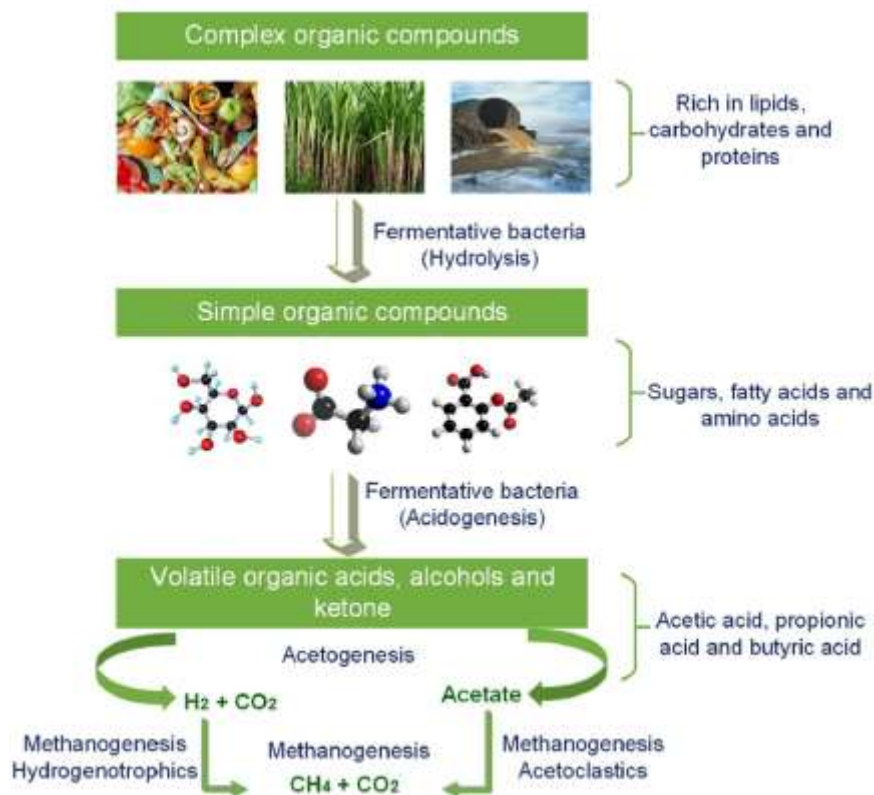


Figura 1. Fasi del processo di digestione anaerobica (Náthia-Neves et al., 2018).

La fermentazione anaerobica è un processo consolidato per la trasformazione biologica dei rifiuti organici in biogas e intermedi ricchi di nutrienti organici (Naresh Kumar et al., 2022). Il processo di fermentazione anaerobica (FA) consiste nella degradazione della sostanza organica in assenza di luce e di ossigeno molecolare (O_2) o legato ad altri elementi come i nitriti e nitrati (NO_2^- e NO_3^-). La FA avviene attraverso tre fasi principali: idrolisi, acidogenesi e acetogenesi. In condizioni idonee, la degradazione della sostanza organica può proseguire fino alla quarta e ultima fase, la metanogenesi, che genera un biogas composto per il 65% da metano (CH_4) e dal 35% da diossido di carbonio (CO_2) e digestato. Se il processo prosegue fino alla metanogenesi allora nel complesso si parlerà di digestione anaerobica (figura 1) se invece vengono considerate le prime tre fasi allora si farà riferimento al solo processo di fermentazione anaerobica (Krzysztof Ziemiński, 2012). Sostanzialmente la fermentazione anaerobica è parte della digestione anaerobica. Per poter separare metabolicamente le fasi è possibile agire sui carichi organici e gli HRT. Per favorire la

fermentazione anaerobica si applicano carichi organici alti (con un *range* che varia da 4.1 a 48.2 gVS L⁻¹ d⁻¹) e HRT bassi (<5 d) (Anukam et al., 2019).

Facendo un'approfondita ricerca bibliografica, generalmente il termine FA e *dark fermentation* vengono considerati sinonimi per indicare alcune fasi dello stesso processo ma in realtà sono caratterizzati da focus differenti. La fermentazione anaerobica ha come obiettivo la produzione di AGV, quindi si lascia perseguire la reazione fino alla fase di acetogenesi in cui l'idrogeno viene consumato, perciò comprende la fase di idrolisi, acidogenesi e acetogenesi. La *dark fermentation* è focalizzata sulla produzione di idrogeno (H₂), al termine della quale vengono prodotti anche AGV come co-metaboliti e comprende la sola fase di idrolisi e acidogenesi (Bastidas-Oyanedel et al., 2015). In questo caso, siccome l'obiettivo è la produzione di AGV viene considerata anche la fase acetogenica perciò il termine utilizzato al quale si farà riferimento in questo lavoro di tesi sarà "fermentazione anaerobica".

La fermentazione anaerobica dei rifiuti organici è un processo che coinvolge diversi gruppi di batteri tra i quali i batteri idrolitici, acidificanti, acetogeni (e metanogeni in caso di digestione anaerobica) (Krzysztof Ziemiński, 2012). Questi tipi di microrganismi possono operare a diversi intervalli di temperatura e per questo sono classificabili in tre principali categorie, ovvero microrganismi psicrofili (T<20°C), mesofili (20°C<T<40°C) e termofili (T>45°C) (figura 2) e a determinati intervalli di pH tipicamente tra 6.5 e 8 (Krzysztof Ziemiński, 2012). La fermentazione anaerobica avviene in un *range* di pH che varia da 5 a 10 a seconda dei prodotti desiderati. (Náthia-Neves et al., 2018).

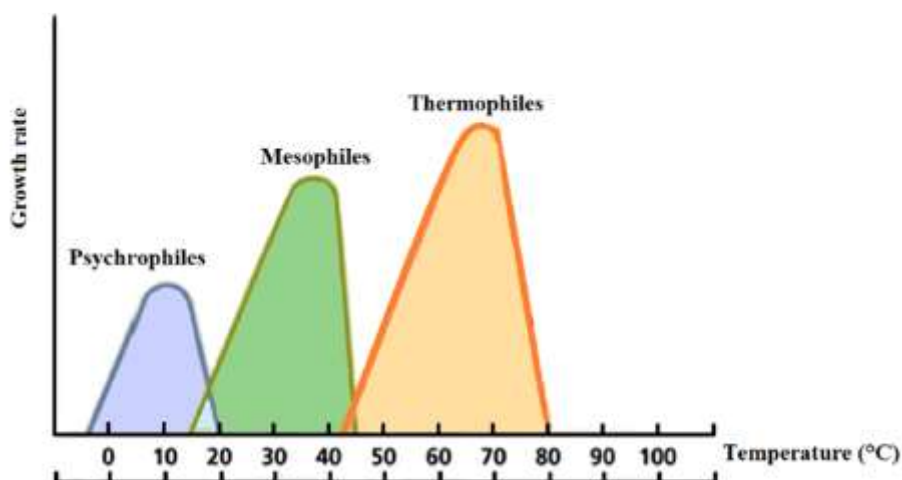


Figura 2. Intervalli di temperatura della FA (Salbitani & Carfagna, 2021).

Nel processo di fermentazione anaerobica l'intervallo di temperatura migliore viene scelto a seconda delle caratteristiche del substrato e del bilancio di energia richiesta e la resa di produzione di biogas (Cavinato et al., 2011). Le temperature mesofile sono le più utilizzate, perché consentono di ottenere una buona produttività di biogas con minori costi energetici oltre a fornire una maggiore stabilità al processo (Náthia-Neves et al., 2018).

Le fasi che caratterizzano il metabolismo del processo di produzione di AGV sono:

I. Idrolisi

Il primo passaggio del processo di fermentazione anaerobica è l'idrolisi, in cui i batteri grazie agli esoenzimi prodotti degradano substrati organici complessi come lipidi, le proteine, i carboidrati e i particolati, in molecole aventi struttura più semplice. (Bastidas-Oyanedel et al., 2015).

Ad esempio, i polisaccaridi vengono generalmente convertiti in zuccheri monomerici o dimerici: l'amido e la cellulosa vengono idrolizzati a glucosio, mentre l'emicellulosa viene degradata a galattosio, xilosio, mannosio e glucosio. Le proteine vengono scomposte in amminoacidi, piccoli peptidi, ammoniaca (NH_3) e anidride carbonica (CO_2) dalle proteasi. Infine, i lipidi vengono trasformati in acidi grassi a catena lunga e a catena corta. Gli oligomeri e i monomeri così ottenuti sono disponibili per il trasporto all'interno delle cellule dei microrganismi acidogenici fermentanti (Bastidas-Oyanedel et al., 2015).

II. Acidogenesi

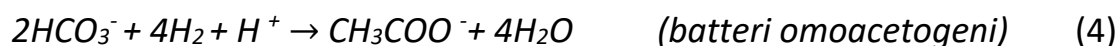
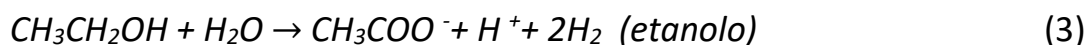
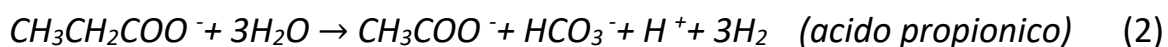
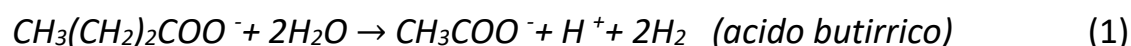
Durante questa fase, i batteri acidificanti convertono le sostanze chimiche idrosolubili compresi i prodotti di idrolisi, in acidi organici a catena corta (formico, acetico, propionico, butirrico, pentanoico), alcoli (metanolo, etanolo), aldeidi, anidride carbonica e idrogeno. Tra i fattori che influiscono sulla produzione di AGV in questa fase è il pH, uno dei più importanti. La fermentazione anaerobica avviene ad un pH di circa 6 e la produzione di AGV aumenta quando il pH del processo è maggiore di 5, mentre con pH inferiore è favorita la solventogenesi, ovvero la produzione di etanolo (Náthia-Neves et al., 2018).

III. Acetogenesi

Durante la fermentazione anaerobica la materia organica proveniente dai rifiuti viene convertita in idrogeno (H₂), anidride carbonica (CO₂), acetato (CH₃COO⁻) e acido formico (HCOOH) per via fermentativa da batteri acetogeni. Durante la formazione degli acidi acetico e propionico si forma una grande quantità di ioni idrogeno, provocando una diminuzione del pH del mezzo acquoso. Il pH ottimale per l'azione dei microrganismi acetogeni è intorno a 6 (Náthia-Neves et al., 2018).

Per questa terza fase si fa riferimento principalmente all'ossidazione anaerobica degli acidi grassi a catena lunga e corta (volatili) da parte dei batteri che producono idrogeno. Dunque i batteri acetogeni trasformano i prodotti formati nella fase di idrolisi e di acidogenesi in acido acetico (CH₃COOH), formico (HCOOH), diossido di carbonio (CO₂) ed idrogeno molecolare (H₂) (Gavala et al., 2003). Le reazioni biologiche che portano alla formazione di questi prodotti variano in base ai composti di partenza utilizzati dai batteri fermentanti per produrre acido acetico. E' possibile distinguere due tipologie di reazioni: quelle che avvengono per opera di batteri acetogeni che sono responsabili della produzione di idrogeno, che convertono gli AGV (come ad esempio acido butirrico e propionico) o alcoli (es. etanolo) in acido acetico, diossido di carbonio e idrogeno molecolare. La seconda categoria di reazioni, quelle che avvengono per opera di batteri omoacetogeni, che producono acido acetico a partire da diossido di carbonio e idrogeno molecolare (Anukam et al., 2019) (Bastidas-Oyanedel et al., 2015).

La FA avviene secondo le seguenti reazioni stechiometriche:



Tuttavia la produzione di idrogeno (H₂) e acetato (CH₃COO⁻) avviene anche nella fase precedente (acidogenesi) perciò è complesso tracciare una chiara discrepanza tra le due fasi (Anukam et al., 2019).

Produzione di acidi grassi volatili (AGV)

Il processo di fermentazione anaerobica illustrato nei paragrafi precedenti ha come prodotti principali il biogas e gli AGV. Gli AGV sono acidi grassi a catena corta lineare costituiti da un numero di atomi di carbonio che varia da due (acido acetico) a sei (acido esanoico) (Strazzera et al., 2018). Sono composti organici che possono essere prodotti o per via sintetica (da prodotti petrolchimici) o biologicamente utilizzando rifiuti organici come substrato attraverso un processo chiamato fermentazione anaerobica. I principali AGV sono: acido formico, acetico (etanoico), propanoico (propionico), butanoico (butirrico), pentanoico (valerico), esanoico (caproico) e eptanoico e vengono utilizzati per molti impieghi e applicazioni in vari settori. Ad esempio l'acido acetico viene utilizzato per la sintesi di pesticidi, gomme e plastiche, il propionico viene utilizzato per la conservazione di cibi, il butirrico nell'industria chimica è utilizzato come precursore per sintetizzare altri prodotti e allo stesso tempo può essere utilizzato come additivo per le materie plastiche e fibre tessili per il miglioramento della resistenza al calore e alla luce solare (Jiang et al., 2018). Possono anche essere utilizzati come materie prime per la sintesi di polimeri poliesteri come i poliidrossialcanoati (PHA).

Il processo di fermentazione anaerobica può essere accoppiato ad altri processi grazie alle potenzialità degli AGV di fungere da substrato per vari tipi di microrganismi. Uno di questi processi è la coltivazione di microalghe, microrganismi in grado di crescere anche su effluenti come ad esempio il fermentato prodotto dalla fermentazione anaerobica, che essendo ricco di acidi grassi volatili risulta una fonte ricca di carbonio, necessaria per la crescita microalgale. Una possibile soluzione proposta da Lacroux et al. (2020) è quella di accoppiare la coltura microalgale alla *dark fermentation* che risulta un processo efficace per trattare gli effluenti e fornisce substrati economici per colture eterotrofe e mixotrofiche, in quanto la domanda chimica di ossigeno (COD) viene recuperato nell'effluente sotto forma di AGV principalmente come acetato che è il substrato più adatto per la crescita per la maggior parte dei ceppi microalgali e il butirrato che non si degrada facilmente. Pertanto è stato dimostrato che la crescita delle microalghe su AGV dipende dalla forza dissociata e non dissociata degli acidi.

Gli AGV maggiormente assimilati dalle microalghe sono principalmente l'acetico per la semplicità all'assimilazione, dovuta alla struttura molecolare piuttosto semplice rispetto agli altri AGV (Bhatnagar et al., 2010) e il butirrato. Oltre a rimuovere il carbonio inorganico presente nei reflui, le microalghe possono rimuovere anche i nutrienti in eccesso come azoto e fosforo ma anche gli

inquinanti organici con ruolo di *bioremediation*, producendo di conseguenza metaboliti secondari ad alto valore aggiunto come carboidrati, proteine e lipidi e grazie alla produzione lipidica è possibile ricavare il bio-olio per sintetizzare biodiesel di terza generazione. Inoltre un altro parametro importante da monitorare perché un refluo risulti depurato è l'sCOD (COD solubile) che è parte del carbonio organico che per definizione è la quantità di ossigeno necessaria per ossidare tutta la sostanza organica presente nel refluo, che può essere rimossa da microrganismi ed è una misura indiretta del BOD₅, (Domanda Biochimica di Ossigeno), ovvero la quantità di ossigeno necessaria e richiesta dai microrganismi per degradare la sostanza organica presente nel refluo (Chalima et al., 2017).

1.2 Le microalghe e la produzione di lipidi

La crescente domanda di fonti di energia alternative sta determinando un continuo aumento dell'interesse per la produzione di biocarburanti al fine di ridurre l'impatto ambientale, ottenendo delle buone rese di produzione e allo stesso tempo, migliorare anche le performance dal punto di vista economico. Uno degli obiettivi di ricerca intrapresi è la produzione di biocarburanti da biomasse microalgali valutando delle principali strategie per aumentare la resa lipidica e i carboidrati e migliorare dunque l'efficacia dei costi. La ricerca negli ultimi anni propone nuove strategie e compromessi per le colture microalgali come i fitormoni (auxina e citochinine) che nelle microalghe svolgono un ruolo importante nelle vie metaboliche, in quanto hanno un effetto stimolante sulla crescita delle microalghe anche in condizioni sfavorevoli come siccità, elevata salinità e carenza di nutrienti e sulla produzione di metaboliti (carboidrati, lipidi, proteine e carotenoidi). Ad esempio Singh et al. (2016), ha riportato che il dietil ammino etil esanoato (DAH) e l'acido indolacetico (IAA), migliorano la crescita da 1.9 a 2.5 volte e il contenuto di acidi grassi polinsaturi dal 56% al 59%.

Un'altra strategia è quella di creare una combinazione di fattori di stress creando ad esempio una co-coltura caratterizzata da un sistema di microalghe-batteri. Attraverso alcuni esperimenti caratterizzati dalla crescita di consorzi microalghe-batteri coltivati su percolato di discarica, condotti da Singh et al., (2016) dimostrano una massima produttività di biomassa pari a $1,58 \text{ g L}^{-1}$ e una massima produttività lipidica pari a $24,8 \text{ mg L}^{-1}$.

Un altro metodo è quello di migliorare le condizioni di luce, utilizzando dei LED colorati in quanto l'intensità e la lunghezza d'onda della luce hanno grande influenza sulla crescita algale e sull'accumulo di lipidi. Atta et al.(2013) hanno studiato l'effetto del LED blu e delle luci bianche convenzionali sulla resa lipidica di *C.vulgaris*. La massima resa lipidica osservata era pari al 23,5% in 8 giorni di coltivazione con LED blu, mentre il contenuto lipidico era pari al 20,9% in 10 giorni di coltivazione con luce LED bianca.

Altri metodi sono l'aggiunta di additivi chimici oppure la modifica di alcuni ceppi di microalghe, per poter ottenere maggior produttività lipidica, creando degli OGM attraverso l'ingegneria genetica e metabolica (Singh et al., 2016).

Le microalghe hanno attirato un notevole interesse nella ricerca poiché sono una materia prima per la produzione di biodiesel di terza generazione grazie alla capacità di accumulare una notevole

quantità di lipidi normalmente compreso tra il 10% e il 50% del peso secco (Salbitani & Carfagna, 2021) , l'alto tasso di crescita e i benefici ambientali. Inoltre accumulano altri metaboliti secondari ad alto valore aggiunto, come i carboidrati, dai quali derivano il bioidrogeno e il bioetanolo. L'utilizzo delle microalghe a scopo di produrre biodiesel ha molti vantaggi poiché risulta un processo più "green" rispetto all'estrazione dei biocarburanti dal petrolio ma questo dal punto di vista commerciale risulta ancora una sfida soprattutto per l'alto costo di produzione. L'aumento del contenuto lipidico delle microalghe potrebbe renderle economicamente attraenti per la produzione di biodiesel in grande scala ed è tutt'ora oggetto di ricerca (Salbitani & Carfagna, 2021).

La biomassa microalgale può essere convertita in una varietà di biocarburanti. La conversione biochimica della biomassa attraverso il processo di fermentazione consente di produrre bioidrogeno e bioetanolo; la conversione termochimica produce bio-olio e conversione chimica dei lipidi mediante transesterificazione ne consente la trasformazione in biodiesel. La biomassa microalgale presenta diversi vantaggi rispetto alle biomasse vegetali tradizionalmente utilizzate per produrre energia (Krzemińska et al., 2014).

1.2.1 Le Microalghe

Le microalghe sono microrganismi unicellulari. Il termine “microalghe” viene utilizzato per indicare i microrganismi fotosintetici eucarioti mentre il termine “cianobatteri” indica tutti i microrganismi fotosintetici procarioti (es. alghe verdi-azzurre). Tipicamente con il termine microalghe si indicano anche i cianobatteri: ad esempio *Spirulina*, una delle microalghe più conosciute e commercializzate, è un cianobatterio (Di Caprio et al., 2019). Sono microrganismi ubiquitari, rinvenibili negli ecosistemi più diversi tra cui mari, acque dolci, laghi, fiumi, ghiacciai, sedimenti e acque reflue. E' stato stimato che possano esistere fino a 200.000 specie diverse di microalghe (Di Caprio et al., 2019).

Questi microrganismi possono utilizzare carbonio organico (es. glucosio e acetato) e inorganico come diossido di carbonio (CO_2), bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}), acqua e sali semplici per sintetizzare un'ampia varietà di molecole organiche, tra cui proteine, acidi grassi, polisaccaridi e carotenoidi. Queste molecole a loro volta possono essere utilizzate per varie applicazioni come biocarburanti, bioplastiche, mangimi e alimenti (Di Caprio et al., 2019).

Le microalghe, al giorno d'oggi, vengono utilizzate per molti impieghi grazie alle loro potenzialità. Le potenzialità delle microalghe sono dovute alle seguenti caratteristiche: elevata efficienza fotosintetica rispetto alle piante terrestri, una maggiore produttività di biomassa (circa 50 e 70 t/ ha anno), possono crescere su terreni non arabili e in mare, possono crescere in sistemi chiusi utilizzando acque reflue e salate riducendo il consumo d'acqua dolce. Inoltre vengono anche utilizzate per la per la fitodepurazione (o biorisanamento) degli effluenti in quanto le acque di scarico sono una risorsa ricca di nutrienti come azoto, fosforo, carbonio, e sostanze organiche (sCOD) per la crescita della biomassa microalgale (Di Caprio et al., 2019). Attraverso la fitodepurazione le microalghe possono rimuovere le molecole di scarto organiche ed inorganiche presenti nel refluo grazie all'azione di alcuni enzimi che sono in grado di trasformare la molecola in una molecola più semplice. Perciò portano ad un duplice vantaggio poichè le microalghe assimilano i nutrienti presenti per le funzioni metaboliche e allo stesso tempo rimuovono l'eccesso di nutrienti al fine di evitare il problema legato all'eutrofizzazione (Daliry et al., 2017).

Le microalghe possono avere tre tipi di metabolismo, a seconda della fonte di carbonio utilizzata:

- Autotrofico: consiste nell'utilizzo di carbonio inorganico (es. CO₂) e luce come fonte di energia per la fotosintesi. Questo porta ad una riduzione temporanea del diossido di carbonio (CO₂) presente in atmosfera. Quando adottano questo tipo di metabolismo, le microalghe hanno un'alta capacità di fissare la CO₂ e produrre ossigeno.
- Eterotrofico: utilizza il carbonio organico (es. glucosio e acetato) in assenza di luce per produrre energia necessaria per le funzioni della cellula.
- Mixotrofico: consiste nell'utilizzo di entrambe le fonti di carbonio organico e inorganico per svolgere i processi di fotosintesi e respirazione cellulare.

La mixotrofia sembrerebbe la condizione di coltura ottimale per il trattamento dei reflui con la specie *C. vulgaris* poiché rispetto alla condizione autotrofa ed eterotrofa quella mixotrofica porta ad una maggiore produttività di biomassa e di produttività lipidica utilizzando i nutrienti presenti all'interno dei reflui (Daliry et al., 2017). Questo tipo di metabolismo, grazie alle sue caratteristiche e potenzialità è la tipologia di metabolismo presa in considerazione per le sperimentazioni relative a questo lavoro di tesi. Una coltivazione mixotrofica consente rapidi aumenti di peso secco della biomassa microalgale. E' stato verificato che la strategia di coltivazione mixotrofica porta ad una produttività di biomassa di tre o cinque volte superiore rispetto alla coltivazione fotoautotrofica ed eterotrofica (Daliry et al., 2017).

1.2.2 Principali fattori che influenzano la crescita delle colture microalgali

I microrganismi come le microalghe hanno una specifica cinetica di crescita, che dipende dal tipo di coltura (autotrofica, eterotrofica e mixotrofica) ma anche da fattori esterni come i fattori ambientali e dalle caratteristiche del ceppo utilizzato. In generale ciò che queste diverse tipologie di colture hanno in comune sono le fasi di crescita che sono principalmente quattro (figura 3):

1. Fase di latenza: la prima fase della curva di crescita in cui le cellule si adattano al nuovo ambiente o substrato subendo cambiamenti intracellulari e fisiologici.
2. Fase di crescita esponenziale (o fase logaritmica): fase in cui il numero di cellule aumenta esponenzialmente fino all'esaurimento dei nutrienti presenti.
3. Fase stazionaria: questa terza fase inizia quando i nutrienti sono limitati o altre condizioni ambientali limitano il numero di cellule che possono essere supportate, portando ad un rallentamento della crescita fino al punto in cui il tasso di crescita equivale al tasso di morte cellulare.
4. Fase di morte: fase in cui il numero di cellule inizia a diminuire, perchè il numero di cellule morte è superiore a quelle in divisione o in fase di latenza. Questo si verifica quando l'ambiente circostante non può mantenere la popolazione (Yates & Smotzer, 2007).

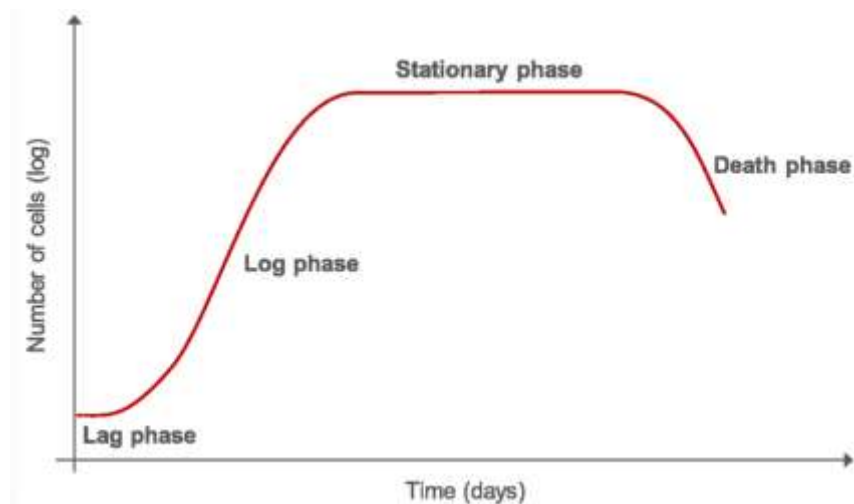


Figura 3. Curva di crescita batterica (Willey et., n.d.).

Ognuna di queste fasi ha una durata differente, che varia in base al tipo di microrganismo d'interesse ma anche in funzione di fattori nutrizionali e ambientali. In questo lavoro di tesi la fase che viene presa maggiormente in considerazione è la fase esponenziale in quanto durante questa fase le microalghe si riproducono raddoppiando il numero di cellule. Risulta la fase migliore in quanto utilizzare delle microalghe acclimatate in un inoculo in fase esponenziale e inocularle in un nuovo

substrato di crescita è possibile evitare una fase di latenza troppo lunga (Yu et al., 2022). Ultimamente, la ricerca si è rivolta allo sviluppo di modelli cinetici per la coltivazione e l'accumulo di lipidi in condizioni eterotrofiche e mixotrofiche, che possono essere utilizzati per prevedere la produzione di lipidi e di biomassa e a loro volta anche il volume del reattore e il tempo di ritenzione (HRT) della coltura (Yu et al., 2022).

I principali fattori che influenzano la crescita microalgale sono principalmente di due tipologie: i fattori nutrizionali e i fattori ambientali (Daliry et al., 2017). Tra i fattori nutrizionali si trovano: il carbonio, fonte di energia necessaria alla cellula (in base al tipo di metabolismo), il fosforo e l'azoto, fondamentali per la crescita cellulare, il metabolismo e per la produzione dei lipidi. Anche alcuni metalli essenziali come il ferro, il magnesio, lo zinco, il silicio e il rame assieme ad alcune tipologie di vitamine sono micronutrienti essenziali per la cellula. Per favorire una crescita microalgale ottimale è essenziale mantenere il più costante possibile il rapporto C:N:P, come definito da Hillebrand & Sommer, (1999), che deve essere 119:17:1.

Alcuni nutrienti hanno effetto sull'accumulo dei lipidi. Nutrienti come azoto, ferro, fosforo, magnesio e silicio sono molto importanti per meccanismi cellulari come la fotosintesi, la divisione cellulare, la respirazione e il trasporto intracellulare. Un concetto molto importante è che le microalghe in condizioni di stress tendono ad accumulare energia sotto forma di polisaccaridi e/o lipidi neutri. Quindi questo meccanismo di difesa della cellula microalgale è stato ampiamente sfruttato per la produzione di lipidi, carotenoidi, polisaccaridi e molti altri metaboliti.

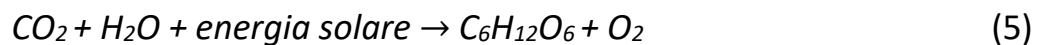
Anche la carenza di nutrienti può portare ad una bassa produzione di biomassa che di conseguenza provoca una diminuzione della produttività lipidica. Carbonio e azoto sono i nutrienti più importanti per la crescita microalgale, il carbonio è necessario principalmente per la moltiplicazione cellulare mentre l'azoto per la sintesi di amminoacidi. Perciò, per ottenere un soddisfacente tasso di crescita e allo stesso tempo una buona produttività lipidica le concentrazioni di carbonio e azoto devono garantire la produttività di biomassa e la produttività lipidica. Un metodo per bilanciare la produzione di biomassa e l'accumulo di lipidi, con un importante ruolo, è il rapporto C/N (Li et al., 2016). Per esempio, dagli esperimenti condotti da Silaban et al. (2014) è emerso che la condizione migliore di crescita con l'aggiunta di acetato di sodio (CH_3COONa) (mixotrofia) di *C. vulgaris* è con un rapporto C:N di 15:1, poichè ha dimostrato una maggior produttività di biomassa pari a $134 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ e una maggior produttività lipidica pari a $24,07 \text{ g m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.

La seconda categoria di fattori che influenzano la crescita sono i fattori ambientali, tra i quali il pH e la temperatura, l'intensità luminosa e l'intensità di aerazione del sistema (Daliry et al., 2017). Nonostante le microalghe siano in grado di sopravvivere in ambienti estremi, i fattori ambientali ottimali per la loro crescita e per la produzione di composti *target* ricadono in un intervallo specie-specifico. Generalmente in condizioni sfavorevoli hanno la tendenza ad accumulare lipidi neutri per proteggere la cellula dalla fotossidazione. Le strategie di potenziamento lipidico che comportano l'alterazione del regime nutritivo e delle condizioni di coltivazione sono ampiamente applicate nella coltivazione di microalghe, come riportate nel paragrafo 1.2.

Tra i fattori ambientali e nutrizionali che influenzano maggiormente la crescita delle microalghe in condizioni autotrofiche e mixotrofiche sono l'illuminazione e la fonte di azoto disponibile.

i. Illuminazione

La luce è caratterizzata da intensità luminosa e lunghezza d'onda. E' fondamentale per la fotosintesi perchè fornisce l'energia necessaria al metabolismo del carbonio (Daliry et al., 2017). Se da un lato una scarsa illuminazione può avere un effetto limitante sulla crescita delle microalghe, dall'altro un'illuminazione troppo elevata può avere un effetto inibitorio (Maltsev et al., 2021). La fotosintesi è influenzata dall'intensità della luce e avviene secondo la seguente reazione:



L'intensità luminosa, la durata dell'illuminazione (fotoperiodo) e la lunghezza d'onda influenzano il contenuto di lipidi, di carotenoidi e la composizione degli acidi grassi presenti nella biomassa microalgale. Maltsev et al. (2021) affermano che l'ottimale intensità della luce per la crescita delle microalghe è compresa in un intervallo che va da 24 a 400 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e che un aumento dell'intensità della luce porta ad un'attivazione della sintesi lipidica, generata dai ROS (*reactive oxygen species*), ovvero le specie reattive dell'ossigeno che può verificarsi durante per esempio durante la fotoinibizione che svolgono la funzione di segnalare all'organismo la presenza di un fattore di stress, innescando vari meccanismi per contrastare lo stress come la produttività lipidica. Alcune specie di microalghe per raggiungere la massima produttività lipidica necessitano di un'illuminazione da 60 a 700 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Specie diverse mostrano una diversa resistenza alla fotoinibizione. La fotoinibizione è un processo mediante il quale un eccesso di luce diminuisce il

tasso di fotosintesi negli organismi. Questo effetto è causato dalla reazione di fotossidazione all'interno della cellula poiché la luce non può essere più assorbita nell'apparato fotosintetico, per esempio in *C.vulgaris* la fotoinibizione si è verificata ad un'esposizione superiore a 100 e 150 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Maltsev et al., 2021).

Anche il fotoperiodo è di grande importanza, in quanto l'illuminazione deve garantire la massima produttività delle microalghe e allo stesso tempo ridurre al minimo i costi energetici durante la coltivazione. Oltre che sulle cinetiche di crescita, il fotoperiodo può influire sul contenuto cellulare di proteine, carboidrati e lipidi (Khoeyi et al., 2012). Una maggiore quantità di luce, aumenta il tasso di crescita (Krzemińska et al., 2014). Leong et al. (2022), afferma che in mixotrofia, maggior ore di esposizione alla luce, comporta un'elevata produzione di biomassa microalgale, mentre l'estensione delle ore di buio porta alla produzione di una maggior quantità lipidica. Comunque la produttività lipidica è influenzata anche dalla concentrazione dei nutrienti e non solo dal fotoperiodo e l'intensità luminosa (Daliry et al., 2017).

Dunque la qualità e la quantità della luce determinano la quantità di energia disponibile per le microalghe. Quando si valuta l'effetto delle condizioni di illuminazione sulla crescita e la produzione delle microalghe, viene posta l'attenzione anche alla densità cellulare nelle colture in quanto un'elevata densità cellulare impedisce la penetrazione della luce, riducendo la crescita della biomassa (Maltsev et al., 2021). Ogni specie microalgale risponde in modo diverso all'intensità della luce e al fotoperiodo, ciò significa che in base al tipo di ceppo e in base al fotoperiodo fornito e intensità luminosa fornita verranno prodotti quantità diverse di composti come carboidrati, lipidi e proteine. (Khoeyi et al., 2012).

Una tipologia di illuminazione che può essere utilizzata sono i diodi emittori di luce (LED) perché possono migliorare il tasso di crescita microalgale. Le microalghe tollerano un determinato *range* di lunghezza d'onda per crescere e rispondono diversamente alla lunghezza d'onda (λ) a seconda dei pigmenti acquisiti o persi (Schulze et al., 2014). La miglior luce per la crescita microalgale è la luce rossa a $\lambda=660$ nm, in quanto induce alti tassi di crescita e cellule più piccole accelerando il ciclo cellulare (Schulze et al., 2014). A seguire, è efficiente anche la luce LED blu in un *range* da ($\lambda= 420-470$ nm) ma induce un tasso di crescita più basso rispetto ai LED rossi.

Fu et al. (2012) ha migliorato la produzione biologica e densità cellulare di *Chlorella vulgaris* coltivata in acqua dolce utilizzando un fotobioreattore (PBR) batch da 80 L dotato di LED colorati. La produzione di biomassa è stata confrontata con lampada a fluorescenza con intensità equivalente. I diversi stadi di crescita delle microalghe richiedono un diverso requisito di illuminazione dovuto al

cambiamento della popolazione cellulare, età e torbidità all'interno del fotobioreattore. Utilizzando luci a LED in un rapporto 3:1 rosso: blu, sono state prodotte 178 mg/L giorno di alghe secche e 7 g di lipidi per 100 g secchi di biomassa, valori più elevati rispetto alla luce fluorescente con la quale è stato possibile ottenere al massimo 88 mg /L giorno di alghe secche e 1 g lipidi per 100 g di biomassa secca.

Tikoo et al. (1996) ha studiato la crescita di *Chlorella vulgaris* in presenza di LED rosso, blu e bianco e ha confrontato i dati con la crescita di microalghe coltivate con luce solare. E' stato rilevato che il tasso di crescita di *C. vulgaris* è aumentato del 5,31% con l'utilizzo di LED rossi, 3,72% nei LED blu e 6,31% con LED bianco rispetto alla coltivazione con luce solare. Inoltre è stato effettuato un ulteriore studio che mirava a valutare gli effetti della lunghezza d'onda, intensità, terreno di coltura e contenuto lipidico di *Chlorella vulgaris* coltivato in un fotobioreattore illuminato da LED. *C. vulgaris* è stata coltivata per 10 giorni con un fotoperiodo 18:6 (cicli di luce/buio) con diversi colori di luce bianco freddo, blu e rosso e intensità 50, 70, 90 e 110 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ad una temperatura di 25 °C. Dai risultati ottenuti è emerso che la biomassa secca massima pari a 1,35 g/L è stata ottenuta utilizzando luce bianca fredda di 110 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in 7 giorni con una produttività di biomassa secca pari a 117,23 $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$. Il più alto contenuto in lipidi pari a 34,06% è stato ottenuto con colore blu a 70 $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mentre utilizzando il LED con luci bianco freddo utilizzando 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ è stata ottenuta una produttività lipidica pari a 31,86 $\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$.

ii. Fonti di azoto

Tra tutti i nutrienti utilizzati, quello che innesca le strategie metaboliche messe a punto dalla microalga in fase di stress è l'azoto che può essere fornito come nitrati, urea e sali di ammonio. Grazie alla loro capacità di assimilare l'azoto per le funzioni metaboliche, le microalghe possono essere utilizzate per la sua rimozione dal mezzo di coltura (es. effluenti) (ruolo fitodepurativo delle microalghe).

Le microalghe hanno la capacità di utilizzare questo nutriente per la crescita e la sintesi di composti ad alto valore aggiunto, con tassi di rimozione compresi tra l'80 % e il 100 % di azoto. L'assorbimento e l'utilizzo dell'azoto da parte delle microalghe dipende dalla forma chimica in cui questo nutriente è presente.

L'ammonio (NH_4^+) è considerato la fonte di azoto più favorevole per il metabolismo microalgale in quanto non necessita di molta energia per essere scomposto e assorbito. Tuttavia l'ammonio, se

presente in elevate concentrazioni (superiore a 160 mg L^{-1}), può risultare tossico ed inibire la crescita, invece se presente in scarse quantità (minore di 50 mg L^{-1}) avviene un arresto della proliferazione della biomassa favorendo la produzione di lipidi. La tolleranza delle microalghe all'ammonio dipende dalla specie, con vari *taxa* che mostrano diverse soglie di tollerabilità e sintomi di tossicità. *C.vulgaris* è il ceppo che riesce a tollerare un'alta concentrazione di azoto che varia da 300 a $500 \text{ mgNH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ (Md. Shamim Parvez et al., 2018) (Di Caprio et al., 2019). Tuttavia non è possibile rilevare un valore unico di soglia limite in quanto ogni ceppo microalgale può tollerare diverse concentrazioni (Di Caprio et al., 2019).

iii. Temperatura

Anche la temperatura ha effetti nella produzione lipidica. Generalmente la maggior parte dei ceppi algali cresce bene nell'intervallo di temperatura tra i 25°C e i 30°C . E' stato documentato che un aumento della temperatura della coltura aumenta la percentuale degli acidi grassi saturi nelle microalghe, mentre una diminuzione della temperatura aumenta la composizione degli acidi grassi insaturi dei lipidi cellulari totali. Tuttavia l'effetto della temperatura sulle specie microalgali è specifico per ogni tipo di ceppo. E' stato studiato da (Singh et al., 2016) l'effetto della temperatura sulle rese lipidiche nei ceppi *Nannochloropsis* e *C.vulgaris*. Dai risultati ottenuti è risultato che un aumento della temperatura di 5°C da 20°C a 25°C ha portato un aumento di due volte della resa lipidica da 7,90-14,92% per *Nannochloropsis*, mentre per *C.vulgaris* l'aumento di temperatura ha ridotto la resa lipidica dal 14,71%-5,90% (Singh et al., 2016).

iv. Salinità

Infine, un altro fattore che influenza la produttività dei lipidi è la salinità, che è determinata dalla concentrazione di cloruro di sodio (NaCl). Un elevato aumento di salinità nel mezzo di coltura può causare un aumento del contenuto lipidico nelle microalghe. In quanto un'elevata salinità nel mezzo può indurre stress ossidativo alle cellule microalgali che può indurre quindi un aumento del contenuto lipidico. Per esempio un aumento della concentrazione di NaCl da 0,5 a 0,10 M ha portato ad un contenuto lipidico pari al 67% in *D.Salina* (Singh et al., 2016).

1.3 Stato dell'arte sulla coltivazione di microalghe su AGV

L'esaurimento dei combustibili fossili e le preoccupazioni sui cambiamenti climatici hanno sollevato interesse per le biotecnologie basate sulle microalghe, poiché possono accumulare dal 20-50% del loro peso secco come lipidi (acidi grassi) convertibili in biocarburanti così come altre molecole ad alto valore aggiunto come i carboidrati (Lacroux et al., 2020).

Le microalghe possono essere coltivate in coltura eterotrofica, mixotrofica o autotrofica ma la coltivazione in mixotrofia come quella in eterotrofia sono le condizioni di crescita migliori rispetto all'autotrofia in quanto portano ad una maggiore produttività di biomassa e produttività lipidica (Shen et al., 2019) . Tuttavia il glucosio deve essere sostituito da fonti di carbonio a basso costo proveniente ad esempio dai rifiuti. I seguenti esperimenti dimostrano che la crescita in condizioni mixotrofiche ed eterotrofiche utilizzando AGV come substrato organico determina una maggiore produttività di biomassa e lipidica.

Lo studio di Lacroux et al.(2020), consisteva nel valutare l'influenza del pH e della concentrazione del substrato sulla crescita mixotrofica di cinque specie di microalghe, in presenza di acetato o butirato, in condizioni sterili. Alcuni ceppi sono stati coltivati ad un pH che varia da 5 a 10. Ciò che è stato ottenuto è che l'acetato è stato assimilato efficientemente da tutti i ceppi mentre l'assorbimento del butirato dipendeva fortemente dal ceppo. Inoltre il valore di pH ha influenzato anche il tasso di crescita, in quanto a pH superiori a 8 sono risultati inferiori, mentre i valori inferiori a pH pari a 5 o 6, hanno inibito la crescita su acetato e butirato. Il più alto tasso di produzione di biomassa su acetato è stato ottenuto a pH 7 per la maggior parte dei ceppi pari a $1,17 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$. E' stato dunque dimostrato che il fattore principale che influenza la crescita delle microalghe in mixotrofia è la forma dell'acido non dissociata, che può essere controllato mediante aggiustamento del pH.

Dunque la coltivazione di microalghe in condizioni eterotrofiche o mixotrofiche a pH controllato potrebbe essere la migliore condizione operativa, massimizzando l'assorbimento di AGV , la resa della biomassa e l'efficienza energetica (Lacroux et al., 2020).

Con l'obiettivo di produrre lipidi in modo economico, Cho et al. (2015) hanno proposto un processo integrato che consiste in un sistema di fermentazione dei fanghi di depurazione che produce AGV e la coltivazione mixotrofica di *Chlorella vulgaris*. Quest' ultima è stata coltivata sull'effluente della fermentazione ad una concentrazione del 100%, 50% e del 15%. La più alta produttività della

biomassa è stata raggiunta nella coltura al 100% con un valore di $433 \pm 11,9$ mg/L/d mantenendo il pH a 7,0. I contenuti lipidici ottenuti, variano in media tra il 12,87% e il 20,01% nelle diverse concentrazioni di effluenti. Da questo risultato (Cho et al., 2015) conferma che la composizione di AGV di *C. vulgaris* cresciuti sugli effluenti ha soddisfatto i requisiti della produzione di biodiesel di alta qualità e che sono una fonte di carbonio favorevole per la coltivazione di *C. vulgaris*.

(Fei et.al., 2015) considerando sempre la crescita di microalghe utilizzando gli AGV come mezzo di crescita, afferma che in condizioni eterotrofe *Chlorella protothecoides* ha raggiunto una concentrazione massima di biomassa di $0,65$ g L⁻¹, con il 48% di lipidi, su una miscela di acido acetico, propionico, butirrico in rapporto 8:1:1 e alla concentrazione di 2 g L⁻¹. Risultati simili sono stati anche ottenuti a diversi rapporti (6:1:3 e 7:2:1). Nella miscela 6:1:3, una concentrazione di 8 g L⁻¹ è risultata essere completamente inibitoria. Questo test è stato effettuato in modalità *batch* con flaconi da 50 mL a temperatura ottimale di 25°C a pH 6,3 e con un contenuto di azoto pari a 20 mmol N L⁻¹.

Ren et al. (2017) hanno coltivato *C.vulgaris* in acque reflue di maricoltura fermentate, riportando una concentrazione di biomassa più elevata pari a $5,4$ g L⁻¹ in condizioni mixotrofiche, mentre le condizioni eterotrofe hanno portato ad una concentrazione pari a $2,1$ g L⁻¹. Il pH è stato controllato e mantenuto a 7. Le concentrazioni di AGV erano molto basse, 112 mg/L di acetico, 39 mg/L di propionico, 12 mg/L di butirrico e $2,6$ g/L di acido valerico.

Shen et al. (2019) ha dimostrato che la produttività dei lipidi (acidi grassi) dalla coltura mixotrofica (130 mg L⁻¹giorno⁻¹) risultava 1,9 volte maggiore rispetto alla combinazione di colture autotrofe (15 mg L⁻¹giorno⁻¹) ed eterotrofe (51 mg L⁻¹ giorno⁻¹). Quindi la maggior produttività degli acidi grassi della coltura di *C.vulgaris* in mixotrofia rispetto alla coltura in eterotrofia indica che l'acetato più assimilato è diretto alla sintesi lipidica piuttosto che alla sintesi di proteine e amido con la presenza di luce. Il contenuto lipidico delle cellule mixotrofiche ha raggiunto il 62,6 %. Anche la concentrazione di biomassa risultava maggiore in condizioni mixotrofiche 2 g L⁻¹ rispetto alle condizioni eterotrofe e autotrofe ($0,7$ g L⁻¹). Questi test sono stati effettuati con un'intensità luminosa di 120 μmol di fotoni m⁻¹s⁻¹ e un fotoperiodo pari a 16:8 (luce/buio) e una temperatura di 24°C.

Dai risultati ottenuti in bibliografia sopra citati e confrontando i risultati ottenuti nelle sperimentazioni in letteratura è possibile dedurre che la coltura più ottimale in termini di produttività di biomassa e di quantitativo lipidico prodotto deve essere: una coltura mixotrofica, utilizzando dunque un substrato di crescita caratterizzato da acetato come carbonio organico, in

quanto è la forma di carbonio maggiormente assimilabile dalle microalghe e butirrato, a temperatura ambiente (25°C) e soprattutto a pH controllato in quanto, ciò che influenza la crescita è forma dissociata degli AGV. Il pH ottimale da utilizzare per avere una buona produttività di biomassa è pari ad 8, in quanto a questo valore di pH gli AGV sono presenti in forma dissociata che è maggiormente assimilabile dalle microalche portando ad un maggior tasso di crescita.

Ad un valore di pH minore di 7 e maggiore di 8 in cui la forma degli acidi è indissociata è inibitoria per la crescita microalgale. Infatti, se il pH è maggiore di 8 il tasso di crescita diminuisce in quanto l'acetato viene assimilato più lentamente, perché la forma dell'acido anionico è predominante e la concentrazione di protoni potrebbe essere limitante, mentre un pH minore di 7 inibisce la crescita delle microalghe su acetato perché a questo valore di pH la forma inizia ad essere indissociata che risulta meno assimilabile portando di conseguenza ad un minor tasso di crescita (Lacroux et al., 2020).

1.4 Biodiesel di terza generazione

L'uso di combustibili fossili come fonte di energia è considerato da molto tempo insostenibile ed è sempre meno disponibile a causa dell'elevato consumo. E' insostenibile in quanto è direttamente e strettamente correlato al degrado ambientale ed alle elevate emissioni di gas serra, implementando il problema al cambiamento climatico. Per questo motivo, lo sviluppo di nuovi metodi per produrre biocarburanti da fonti rinnovabili è di forte interesse, grazie alla sostenibilità e al ridotto impatto ambientale (Alam et al., 2015).

Le microalghe sono tra i microrganismi che hanno il maggiore potenziale per la produzione di biocarburanti di terza generazione (es. biodiesel) grazie al loro alto contenuto lipidico, facilità di coltivazione, al rapido tasso di crescita e alla capacità di fissazione dei gas serra (Alam et al., 2015).

I biocarburanti possono essere combustibili solidi, liquidi o gassosi derivati dalla materia organica. La figura seguente (figura 4) rappresenta le principali generazioni dei biocarburanti:

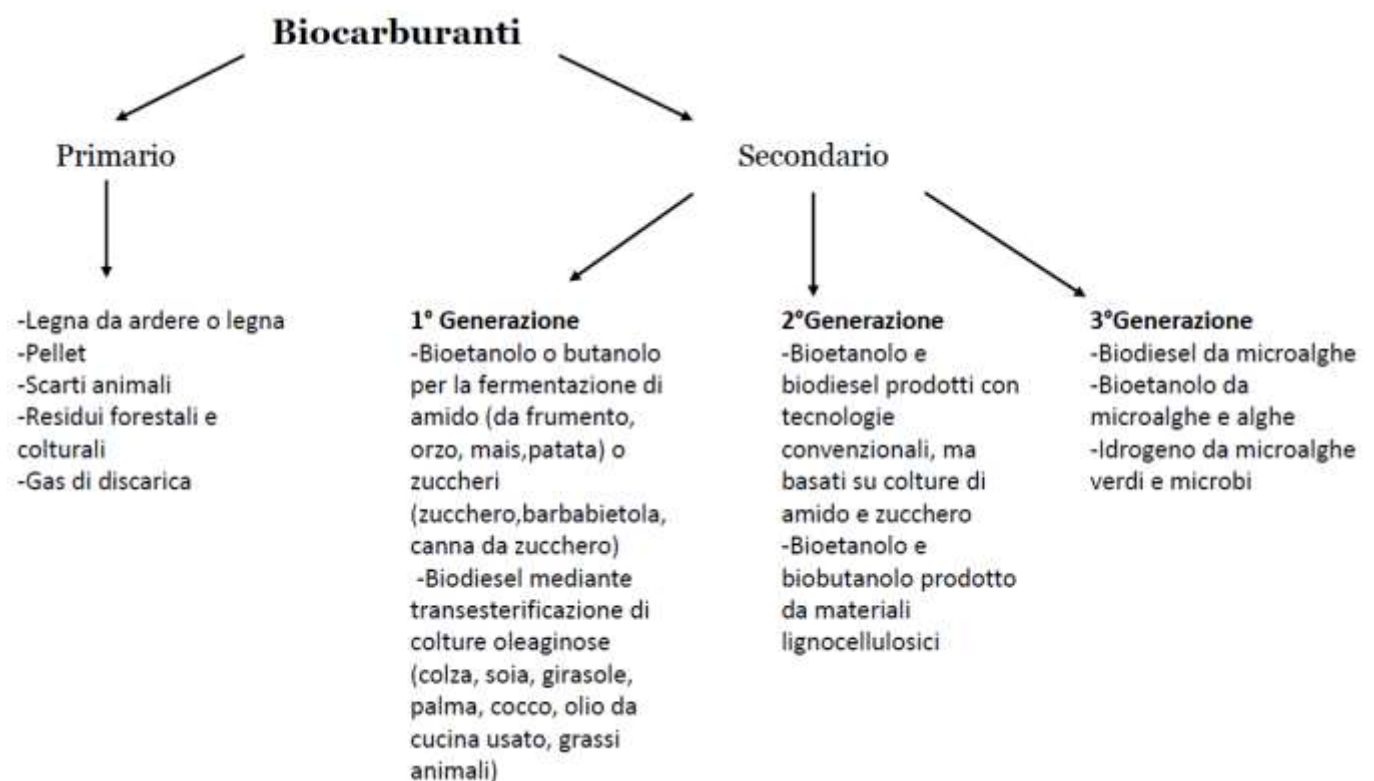


Figura 4. Principali generazioni di biofuels (Alam et al., 2015).

I *biofuels* di prima generazione derivano da colture alimentari come il mais, il grano e la barbabietola da zucchero generando però la problematica tra la produzione di biocarburante e le riserve di cibo a causa dell'elevata necessità di terreno agricolo per la produzione delle materie prime. I *biofuels* di seconda generazione vengono prodotti a partire da biomasse lignocellulosiche che diversamente da quelli di prima generazione non richiedono l'utilizzo dei terreni agricoli, superando quindi il problema del biocarburante di prima generazione. Purtroppo però, per produrre i biocarburanti di seconda generazione sono necessarie tecnologie costose e sofisticate (Liew et al., 2014).

La produzione di biocarburanti di prima e seconda generazione richiede un elevato costo economico, ambientale e politico; i carburanti di prima generazione infatti necessitano di terreni seminativi e di conseguenza riduce la disponibilità di utilizzo del suolo per la produzione alimentare, mentre la produzione di biocarburanti di seconda generazione, richiede tecnologie costose e sofisticate (Alam et al., 2015).

Pertanto, i ricercatori si sono concentrati sui carburanti di terza generazione. Il componente principale dei biocarburanti di terza generazione sono le microalghe, una possibile risorsa di energia rinnovabile alternativa per la produzione di biocarburanti che supera gli svantaggi dei biocarburanti di prima e seconda generazione. Le microalghe possono fornire diversi tipi di biocarburanti rinnovabili come il biometano, biodiesel e bioidrogeno (Alam et al., 2015).

Alam et al. (2015) afferma che dalle microalghe è possibile produrre una grande quantità di biocarburante rispetto ad altre materie prime come la canola, l'olio di palma, i semi di soia e l'olio di girasole. È stato stimato che le microalghe possono produrre da 60.000-240.000 litri/ettaro/anno di biocarburante, mentre a partire dai semi di soia è possibile produrre 400 litri/ettaro/anno, dall'olio di girasole 800 litri/ettaro/anno, dalla canola 1.600 litri/ettaro/anno e dall'olio di palma 6.000 litri/ettaro/anno.

Per quanto riguarda la produttività di biodiesel che viene prodotta a partire dall'olio microalgale sono le seguenti: dalle microalghe caratterizzate da una bassa quantità d'olio è possibile ricavare 51.927 kg biodiesel/ettaro/anno, per le microalghe caratterizzate da un medio contenuto d'olio 86.515 kg biodiesel /ettaro anno mentre da quelle con elevato contenuto di olio 121,104 kg biodiesel/ettaro anno (Mata et al., 2010).

I contenuti in olio di varie microalghe è in relazione al loro peso secco. Infatti le microalghe possono avere un contenuto di olio fino all' 80% del loro peso secco. Alcune specie di microalghe possono

raddoppiare la loro biomassa entro 24 ore il cui tempo di raddoppio minimo è di circa 3,5 ore e questo rende le microalghe una fonte rinnovabile ideale per la produzione di biocarburanti (Alam et al., 2015).

La biomassa microalgale contiene anche altri componenti principali come i carboidrati e le proteine. La seguente figura (figura 5) mostra la percentuale dei componenti principali presenti nelle varie specie e ceppi microalgali.

Strain	Protein	Carbohydrates	Lipid
<i>Anabaena cylindrica</i>	43–56	25–30	4–7
<i>Botryococcus braunii</i>	40	2	33
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	41–58	12–17	10–22
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	29	14	11
<i>Euglena gracilis</i>	39–61	14–18	14–20
<i>Porphyridium cruentum</i>	28–39	40–57	9–14
<i>Prymnesium parvum</i>	28–45	25–33	22–39
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8–18	21–52	16–40
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50–56	10–17	12–14
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	–	1.9
<i>Spirogyra</i> sp.	6–20	33–64	11–21
<i>Spirulina maxima</i>	60–71	13–16	6–7
<i>Spirulina platensis</i>	42–63	8–14	4–11
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3

Figura 5. Percentuale di macromolecole presenti nelle microalghe (Uffenorde & Much, 1918).

Dal punto di vista del processo, la produzione di biocarburanti da microalghe prevede una fase di coltivazione di microalghe, seguita dalla separazione delle cellule dal mezzo di crescita e successiva estrazione dei lipidi per la produzione di biodiesel (figura 6) (Uffenorde & Much, 1918).

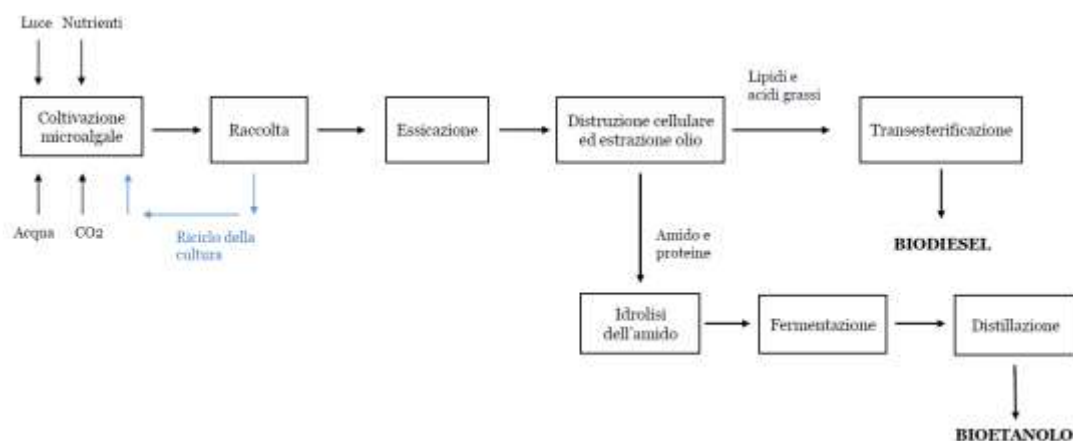


Figura 6. Produzione di biodiesel e bioetanolo (Uffenorde & Much, 1918).

Esistono vari metodi per l'estrazione dei componenti lipidici, come l'estrazione della biomassa attraverso l'essiccazione e la liofilizzazione, oppure utilizzando metodi fisici come gli ultrasuoni o chimici, usando dei solventi come esano ed etanolo o cloroformio:metanolo in rapporto 1:1 con il metodo di Folch (1957). Tipicamente l'estrazione chimica con solventi consente di ottenere rese più alte (Mata et al., 2010).

Successivamente, si ottiene il biodiesel tramite reazione di transesterificazione (figura 7) (Mata et al., 2010).

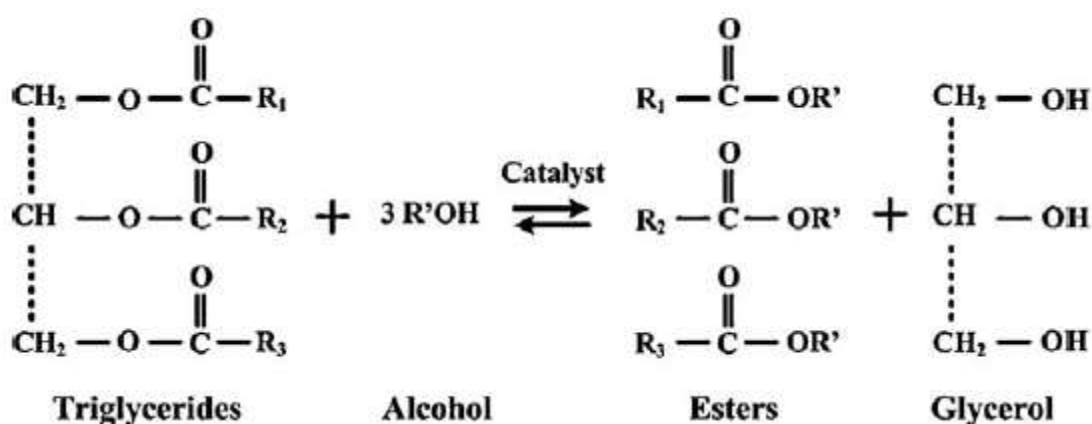


Figura 7. Reazione di transesterificazione (Mata et al., 2010).

La reazione di transesterificazione avviene facendo reagire i trigliceridi (acidi grassi) con alcol; generalmente l'alcol più utilizzato è il metanolo, in presenza di catalisi (tipicamente NaOH) per ottenere come prodotto degli esteri metilici di acidi grassi (FAME), ovvero il biodiesel e il glicerolo come sottoprodotto (Mata et al., 2010).

Il biodiesel è rinnovabile, biodegradabile, non nocivo, ecologico e sostenibile. È stato osservato che le proprietà chimico-fisiche del biodiesel differiscono in base ai tipi di materie prime da cui è stato prodotto. Inoltre l'uso del biodiesel porta comunemente ad una riduzione degli inquinanti nocivi come il monossido di carbonio, idrocarburi incombusti e particolato. La qualità del biodiesel è influenzata da vari fattori come la composizione della materia prima, il metodo di estrazione dell'olio, la metodologia di sintesi del biodiesel e i processi di raffinazione (Sakthivel et al., 2018).

Caratteristiche del ceppo” Chlorella vulgaris NIES- 227”

In questo lavoro di tesi la crescita sull’effluente della fermentazione a diversi fotoperiodi è stata testata sul ceppo *Chlorella vulgaris* NIES-227.

Questo ceppo appartiene alla famiglia delle *Chlorellaceae*, caratterizzate da una forma sferica o ovoidale con un diametro che varia da 2 a 10 μm . Le *Chlorellaceae* si riproducono per via asessuata, generando quattro cellule figlie da ogni cellula madre, caratteristica che determina una buona capacità riproduttiva. Questa caratteristica è molto importante in quanto una crescita rapida in condizioni di coltura facili e resistenza a fattori interferenti risulta vantaggioso per l’ambito industriale, riscontrando numerose applicazioni nell’industria alimentare, acquacoltura, cosmetica, trattamento di acque reflue e produzione di biocarburanti. Inoltre è un ceppo in grado di tollerare alte concentrazioni di azoto e per questo può essere utilizzato anche scopo fitodepurativo. Per queste caratteristiche sembrerebbe anche il ceppo più adatto a produrre lipidi da rifiuti per la produzione di biocarburante. Quindi per tali motivi nella presente tesi è stato utilizzato questo ceppo (Daliry et al., 2017).

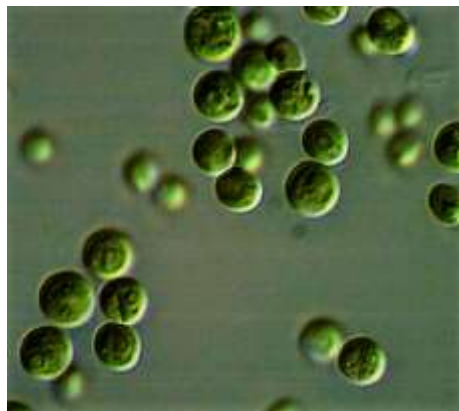


Figura 8. *Chlorella vulgaris* NIES-227 (micropial.nl).

1.5 Scopo della tesi

Lo studio sperimentale di questo lavoro di tesi ha come scopo la valutazione della crescita e dell'accumulo di lipidi da parte di *Chlorella vulgaris* NIES-227 a diversi fotoperiodi su fermentato non sterilizzato proveniente da scarti vegetali e fanghi di depurazione.

Gli obiettivi specifici di questa tesi sono:

- La valutazione della crescita e dell'accumulo di lipidi da parte di *C. vulgaris* NIES-227 sul fermentato non sterilizzato a diverse concentrazioni (diluizione 1:5, 1:2, 1:1 (TQ)) con fotoperiodo 24:0, identificando la condizione che restituisce le rese migliori in termini di biomassa e contenuto lipidico. In questo caso, è stata determinata anche la degradazione degli AGV da parte dei soli microrganismi presenti nel fermentato;
- La valutazione della crescita e dell'accumulo di lipidi da parte di *C. vulgaris* NIES-227 nella migliore condizione ottenuta con fotoperiodo 12:12;
- Determinare le capacità fitodepurative di *C.vulgaris* NIES-227 analizzando la rimozione dell'azoto ammoniacale (NH_4^+) e dell'sCOD dal fermentato al variare della diluizione e del fotoperiodo.

2. Materiali e metodi

2.1 Ceppo microalgale e condizioni di coltivazione

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato il ceppo microalgale *Chlorella vulgaris* NIES-227, fornito da INRAE-LBE (Narbonne, Francia). Il ceppo è stato mantenuto ad illuminazione costante con luci LED a 6853 Lux e temperatura non controllata pari a 26 ± 1 °C su terreno sintetico BG-11 modificato per la mixotrofia (BG-11MX), sia in coltura liquida che in piastra. In coltura liquida, la coltura è stata mantenuta in bottiglie da 1L chiuse con garze sterili per minimizzare il rischio di contaminazione. La miscelazione è stata assicurata mediante insufflazione di aria (2.3 vvm) filtrata a 0.2 µm ed agitazione magnetica (330 rpm). Il terreno sintetico BG-11 è costituito dai composti elencati nella tabella sottostante (Rippka et al.1979, 2011) (tabella 1), ai quali è stato aggiunto acido acetico 10 Mm di Sigma-Aldrich ad una concentrazione pari a 1 g/L come fonte di carbonio organico per ottenere il BG-11 MX. Per ottenere un leggero effetto tampone che facilitasse il mantenimento di un valore di pH pari a 8, è stato aggiunto del tampone TRIS ad una concentrazione di 25 mM al terreno di coltura, che è stato infine autoclavato a 121 °C per 30 min. Il pH è stato controllato ad 8 con HCl ad ogni monitoraggio. Per i test in autotrofia, lo stesso ceppo microalgale è stato acclimatato con BG-11 per due settimane nelle medesime condizioni indicate sopra.

Tabella 1. Composizione del terreno sintetico di coltura BG-11.

BG11	g L⁻¹
NaNO ₃	1,5
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	0,04
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,075
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,036
Acido citrico	0,006
Citrato di ferro ammoniacale	0,006
EDTA	0,001
Na ₂ CO ₃	0,02

BG11 (micronutrienti)	g L⁻¹
H ₃ BO ₃	2,86
MnSO ₄ *H ₂ O	1,54624
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,222
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,079
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ *4H ₂ O	0,28457

Soluzioni Stock	
Composti	Quantità (per 100mL)
NaNO ₃	15g
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	0,4g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,75g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,36g
Acido citrico	0,06g
Citrato di ferro ammoniacale	0,06g
EDTA	0,01g
Na ₂ CO ₃	0,2g

La crescita microalgale è stata monitorata mediante l'analisi del peso secco e la conta cellulare, come riportato in dettaglio nella sezione (2.4). Una volta raggiunta la fase esponenziale, le microalghe sono state utilizzate per inoculare i test con una concentrazione pari a 10 mln cellule mL⁻¹, corrispondente al 20 % in volume e 0,22 g L⁻¹. Tutte le operazioni svolte sulle colture microalgali utilizzate come inoculo sono state condotte con tecnica asettica per prevenirne la contaminazione.

2.2 Caratterizzazione del fermentato

Per questo lavoro di tesi sono stati utilizzati gli effluenti della co-fermentazione anaerobica di scarti vegetali e fanghi di depurazione. Per i test 1 e 2 è stato utilizzato un fermentato ottenuto da fanghi biologici raccolti da un impianto di depurazione situato nel Nord Italia e gli scarti vegetali stagionali del mercato ortofrutticolo all'ingrosso. La miscela utilizzata per i test di fermentazione era caratterizzata da entrambi i substrati in rapporto 1:1 su base di TVS (solidi totali volatili), ad una percentuale volumetrica del 73-77% di fanghi e del 27-23% di scarti vegetali. Per il test 3 invece, è stato utilizzato un fermentato proveniente da un mix di substrati organici come riportato in (Lanfranchi et al., 2022).

Prima dell'utilizzo, entrambi i fermentati sono stati centrifugati per 5 minuti a 9000 rpm con la centrifuga Sartorius Centrisart G-16, filtrati a fascia nera e posti in freezer a -20 °C. La frazione liquida è stata caratterizzata rispetto alla concentrazione di AGV e di ammonio e rispetto al pH. Le caratteristiche delle due tipologie di fermentato utilizzate per i tre test sono le seguenti:

Tabella 2. Caratteristiche del fermentato.

Parametro	Unità di misura	Fermentato (test 1 e 2)	Fermentato (test 3-OL 20)
<i>Totale AGV</i>	gCODAGV/L	20,12±1,0	14,33±0,71
<i>Ammonio (N-NH4+)</i>	mgNH4 ⁺ /L	318,98±15	408,16±20
<i>pH</i>	–	5,2±0,2	5,0±0,2
<i>Acido Formico</i>	gCODAGV/L	0,16±0,00	0
<i>Acido acetico</i>	gCODAGV/L	1,81±0,09	5,43±0,27
<i>Acido propionico</i>	gCODAGV/L	1,81±0,09	1,87±0,09
<i>Acido butirrico</i>	gCODAGV/L	3,10±0,15	0,98±0,04
<i>Acido valerico</i>	gCODAGV/L	2,44±0,12	2,47±0,12
<i>Acido isovalerico</i>	gCODAGV/L	2,08±0,10	0,87±0,04
<i>Acido esanoico</i>	gCODAGV/L	2,56±0,12	0
<i>Acido eptanoico</i>	gCODAGV/L	3,66±0,18	9,36±0,46
<i>Acido isoetanoico</i>	gCODAGV/L	2,56±0,12	2,71±0,13

All'inizio dei test al giorno 0 è considerato anche il peso secco del fermentato pari a 0,105 g L⁻¹ per i test 1 e 2 e 0,370 g L⁻¹ nel test 3, sommato al peso secco delle microalghe con la diluizione appropriata.

2.3 Test di crescita microalgale su fermentato

Come già indicato, in questo lavoro di tesi è stato utilizzato il ceppo *Chlorella vulgaris* NIES-227 e come substrato di crescita il fermentato, non sterilizzato proveniente da scarti vegetali e fanghi di depurazione a diverse diluizioni, utilizzando delle beute da 300 mL.

Il fermentato è stato diluito i per valutarne l'effetto della concentrazione sulla crescita microalgale. Il monitoraggio è stato effettuato valutando il peso secco, conta cellulare, il contenuto lipidico, il consumo di AGV, il consumo di sCOD e ammonio. La seguente tabella (tabella 3) illustra le caratteristiche comuni a tutti i test.

Tabella 3. Caratteristiche dei test.

Parametro	Test 1	Test 2	Test 3
Giorni	17	16	16
pH	8	8	8
Temperatura (°C)	26±1	26±1	26±1
Illuminazione (Lux)	5700	5700	5700
Agitazione magnetica (rpm)	330	330	330
Insufflazione d'aria (vvm)	2.3	2.3	2.3
Aria filtrata (µm)	0,2	0,2	0,2
Fotoperiodo	24:0	24:0	12:12

Per il mantenimento delle ore di luce/buio (fotoperiodo) è stata utilizzata una presa temporizzata.

I test sono stati condotti in *batch* che per definizione sono un sistema chiuso, in cui tutti i nutrienti necessari alla crescita microalgale vengono forniti ad inizio della sperimentazione, senza aggiunte successive.

Il fermentato utilizzato non è stato sterilizzato. Le microalghe, dopo aver raggiunto la fase esponenziale, sono state utilizzate per inoculare i test con una concentrazione pari a 10 mln cellule mL⁻¹, corrispondente al 20% in volume e 0,22 g L⁻¹ per il test 1 e 2. Per quanto riguarda il test 3 il peso secco relativo solo alle microalghe è pari a 0,5 g L⁻¹, mantenendo comunque fissa la concentrazione cellulare. A seguire, i test svolti vengono quindi così impostati e riassunti;

2.3.1 Fotoperiodo 24:0 con diluizione 1:2 e 1:5 (test 1)

Il primo test effettuato (figura 9) era caratterizzato da quattro condizioni, due beute per ogni condizione, per un totale di otto beute. Le condizioni prevedevano:

- Controllo BG-11 in mixotrofia
- Fermentato diluito 1:2 con *Chlorella vulgaris* NIES-227
- Fermentato diluito 1:5 con *Chlorella vulgaris* NIES-227
- Fermentato diluito 1:5 con acqua di rete privo di *Chlorella vulgaris* NIES-227



Figura 9. Condizioni test 1 con fotoperiodo 24:0.

2.3.2 Fotoperiodo 24:0 con diluizione 1:1 e 1:5 (test 2)

E' stato effettuato un secondo test (figura 10) mantenendo gli stessi parametri e lo stesso fotoperiodo del primo test ma le condizioni prevedevano:

- Controllo BG-11 in mixotrofia
- Fermentato TQ (1:1 o non diluito) con *Chlorella vulgaris* NIES-227
- Fermentato diluito 1:5 con *Chlorella vulgaris* NIES-227



Figura 10. Condizioni test 2 con fotoperiodo 24:0.

2.3.3 Fotoperiodo 12:12 con diluizione 1:2 (test 3)

Questo test prevedeva l'utilizzo di alcune diluizioni utilizzate nei precedenti test, utilizzando però un fotoperiodo di 12:12. A seguire le condizioni utilizzate erano:

- Controllo BG-11 in mixotrofia
- Controllo BG-11 in autotrofia
- Fermentato diluito 1:2 con *Chlorella vulgaris* NIES-227



Figura 11. Condizioni test 3 con fotoperiodo 12:12.

2.4 Monitoraggio e caratterizzazione della biomassa

Analisi del peso secco (PS):

L'analisi del peso secco consente di misurare il quantitativo di biomassa secca residua dopo 24 ore in forno a 105°C su un filtro di acetato di cellulosa con porosità 0,45µm e diametro di 50 mm contenente la biomassa filtrata attraverso un sistema di filtraggio collegato ad una pompa a vuoto.

Il peso secco è stato monitorato tre volte a settimana condotta in doppia copia, ovvero utilizzando quattro filtri per ogni condizione, ovvero due per ogni beuta.

Il peso secco viene determinato utilizzando la seguente formula:

$$\text{Peso secco (g L}^{-1}\text{)} = \frac{p1(g) - P0(g)}{V(L)} \quad (6)$$

Dove:

P1=peso del filtro con campione dopo passaggio in forno

P0= peso del filtro privo di biomassa

V=volume di coltura microalgale filtrato

Il peso secco viene espresso in g L⁻¹.

Conta cellulare:

La conta cellulare permette di determinare la concentrazione cellulare tramite una camera di conta Bürker, utilizzando il microscopio ottico.

La camera di conta è caratterizzata da due griglie separate, dove ognuna è composta da un grande quadrato che a sua volta è composto da 9 quadrati delimitati da una doppia riga, ovvero i settori di conta e ognuno di questi 9 quadrati sono ulteriormente suddivisi in 16 quadratini più piccoli (figura 12).

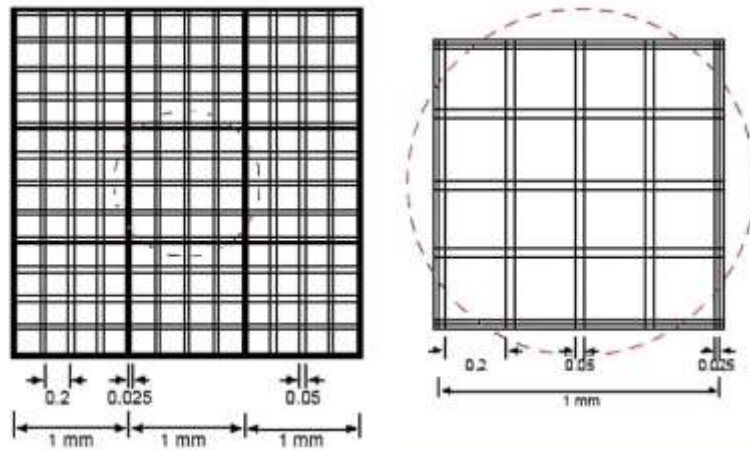


Figura 12. Struttura interna camera di Bürker.

Il campione diluito situato all'interno delle Eppendorf da laboratorio, viene inserito all'interno delle due camere di conta, al di sopra delle quali viene posto un vetrino e vengono contate le cellule presenti. Le cellule da considerare tra i 9 quadrati sono quelle presenti nel primo quadrante in alto a sinistra, quello centrale e quello in basso a destra.

Una volta effettuata la conta e determinato il numero di cellule totali presenti in entrambe le camere è possibile determinare la concentrazione cellulare attraverso la seguente equazione:

$$CC = \frac{(FD * N^{\circ} cellule)}{V} \cdot 1000 \quad (7)$$

Dove:

CC=concentrazione cellulare

FD= fattore di diluizione

N° cellule= numero di cellule contate nella camera di conta

V= volume delle celle della camera contate (0,1 x 3)

1000= per ottenere unità di misura in mln cellule mL⁻¹

La concentrazione cellulare viene espressa in mln cellule mL⁻¹. L'analisi è stata condotta almeno in duplice copia.



Figura 13. Camera di conta Bürker.

Calcolo del tasso di crescita

Il tasso di crescita è stato determinato facendo riferimento alla conta cellulare. Dato che la crescita ha un andamento esponenziale, per calcolare il tasso di crescita l'andamento della curva è stato linearizzato mediante la trasformazione logaritmo utilizzando le seguenti equazioni:

Modello di crescita esponenziale dei microrganismi:

$$X = X_0 * e^{\mu t} \quad (8)$$

Dove:

X_0 = concentrazione della biomassa iniziale

μ = velocità di crescita dei microrganismi

t =tempo

Per linearizzare il sistema di crescita dei microrganismi è stata utilizzata la seguente formula:

$$f(\mu) = \ln \left(\frac{X_n}{X_0} \right) \quad (9)$$

Dove:

X_n = concentrazione della biomassa ad un dato tempo t (in cellule/mL o g/L)

X_0 = concentrazione della biomassa

Il tasso di crescita ha come unità di misura giorni^{-1} (d^{-1}).

Misura del pH

In questo caso il pH da mantenere è pari a 8 perché a questo valore di pH gli AGV si trovano prevalentemente nella loro forma dissociata che è assimilabile dalle microalghe, al contrario di quella indissociata che può avere effetti tossici anche a basse concentrazioni (Lacroux et al., 2020). Il pH è stato misurato ad ogni campionamento, utilizzando un pH-metro HANNA HI552, tarato settimanalmente mediante taratura a tre punti (pH 4, 7, 10). Il pH è stato corretto con HCl 1M o NaOH 1M all'occorrenza.

Analisi dei lipidi

La quantificazione del contenuto in lipidi della biomassa microalgale è stata effettuata mediante l'analisi gravimetrica con il Metodo di Folch (1957). Il metodo consiste nell'estrazione dei lipidi utilizzando una soluzione di cloroformio:metanolo in rapporto 2:1 come solvente e viene effettuato su un campione di biomassa liofilizzata per circa 48h e successivamente disgregata.



Figura 14. Liofilizzatore.

In seguito a centrifugazione, l'analisi gravimetrica viene effettuata grazie all'immissione delle provette contenenti il campione nell'evaporatore Biotage TurboVap (figura 15) per almeno 40 minuti che insufflando un flusso di azoto all'interno della provetta porta ad un aumento della cinetica di evaporazione del solvente, lasciando come residuo la quantità lipidica prodotta.



Figura 15. Biotage TurboVap.

Il quantitativo totale in lipidi viene calcolato secondo la seguente equazione:

$$\text{Lipidi totali (\%)} = \frac{(P1 - P0)}{\text{gbiomassa pesata}} * 100 \quad (10)$$

Dove:

P1= peso della provetta più il campione dopo il passaggio in TurboVap

P0= peso della provetta vuota

L'analisi viene svolta su ogni replica, esprimendo poi la percentuale lipidica di ogni condizione come la media delle due repliche.

Analisi degli AGV

L'analisi degli AGV è stata effettuata tre volte a settimana per osservare in quanto tempo e a che percentuale vengono consumati dal consorzio microalghe-batteri, in quanto sono dei composti organici che possono essere utilizzati come fonte di carbonio per i microrganismi.

La tecnica analitica utilizzata è l'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) Agilent serie 1100, equipaggiato con una colonna *Acclaim organic acid* 5 µm 120 Å 4.0x150 mm dionex bonded silica, detector DAD (Diode array detector), che utilizza come strumento di analisi il cromatografo che

rileva la concentrazione degli AGV sfruttando il tempo di ritenzione degli analiti all'uscita della colonna cromatografica di marca Thermofisher e modello Acclaim C18.

Inizialmente è stata preparata una retta di calibrazione, dalla quale è stato possibile ricavare la concentrazione di AGV, che consiste nel preparare una serie di diluizioni a concentrazione nota di AGV con acqua milliQ, utilizzando uno standard a concentrazione pari a 10 mM per ogni acido di marca Sigma-Aldrich. Inoltre tra le soluzioni standard è stato preparato anche un bianco (campione privo di analita, AGV) caratterizzato da solo acqua milliQ.

La preparazione dei campioni consisteva nel prelevare alcuni mL di campione, centrifugati con la centrifuga Sartorius Centrisart G-16 per 5 minuti a 6000 giri e filtrati con dei filtri a 0,22 µm VWR all'interno delle vials da laboratorio e diluiti con acqua milliQ e successivamente analizzati.

Determinazione sCOD

Per determinare la concentrazione di sCOD è stata costruita una retta di calibrazione in quanto $l'ABS=f(\text{concentrazione})$. La retta di calibrazione è stata preparata utilizzando delle soluzioni a concentrazione nota di sCOD, preparate con ftalato monobasico $C_8H_5KO_4$ (KHP) (standard), caratterizzato da COD teorico di $1.1752 \text{ mg}_{O_2} \text{ g}^{-1}$, diluite con acqua milliQ e un bianco caratterizzato solo da acqua milliQ.

Il metodo colorimetrico (APHA) per l'analisi di questo parametro consiste nell'ossidazione in ambiente acido delle sostanze organiche presenti nel campione utilizzando una soluzione ossidante, costituita da bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) e solfato di mercurio ($HgSO_4$), ed una soluzione catalizzante, composta da acido solforico (H_2SO_4) e argento solfato ($AgSO_4$). Sono stati dosati 2,5 mL di campione filtrato a 0,22 µm e diluito in una provetta e successivamente sono stati aggiunti 1,5 mL di soluzione ossidante e 3,5 mL di soluzione catalizzante (figura 16). La reazione è la seguente:





Figura 16. Soluzione ossidante e catalizzante

Una volta avvenuta la seguente reazione il campione viene posto in un fornello VELP per digestioni acide a 150°C per 2h e successivamente viene misurata l'assorbanza ($\lambda=600$ nm) per via spettrofotometrica, utilizzando uno spettrofotometro UV-VIS. Dal valore di assorbanza (Abs) è possibile risalire al valore di sCOD presente nel campione utilizzando la seguente formula:

$$sCOD \left[\frac{mgO_2}{L} \right] = FD * \frac{ABS_{600nm}}{c} \quad (12)$$

Dove:

sCOD= quantità di COD solubile presente nel campione

FD= fattore di diluizione

ABS_{600nm}= Assorbanza letta per il campione $\lambda=600$ nm

c = coefficiente angolare della retta di calibrazione

L' sCOD viene espresso in $mgO_2 L^{-1}$ oppure $gO_2 L^{-1}$.

Ammonio ($N-NH_4^+$)

L'analisi dell'ammonio è stata effettuata utilizzando il metodo APHA 4500 NH_3 D. Per determinare la quantità di ammonio, inizialmente è stata preparata una retta di taratura per effettuare la calibrazione dell'elettrodo con la soluzione standard di ammonia 0,1M con acqua deionizzata a cinque diverse diluizioni per determinare la differenza di potenziale (mV).

La determinazione dell'azoto ammoniacale avviene mediante un elettrodo selettivo (ISE HI4101) (figura 17) per l'ammoniaca in forma gassosa, caratterizzato da una membrana di politetrafluoroetilene (PTFE).



Figura 17. Elettrodo (ISE HI4101).

Essendo una cella potenziometrica, caratterizzata da una membrana selettiva per l'ammoniaca in forma gassosa, il gas presente in soluzione si diffonde all'interno della membrana cambiando il valore di pH sulla superficie del sensore rilevante il pH. Tuttavia la concentrazione di pH è proporzionale alla concentrazione di gas disciolto.

Quindi la sonda caratterizzata da membrana misura questa variazione attraverso la differenza di potenziale (mV), dalla quale utilizzando la seguente formula (eq.13) è possibile risalire alla concentrazione di ammonio (o azoto ridotto) presente nel campione:

$$N-NH_4^+ \left(\frac{mg}{L} \right) = 10 - \frac{mV - q}{m} * MM_{NH_4^+} * FD * 1000 \quad (13)$$

Dove:

mV= potenziale registrato

q= intercetta della retta di calibrazione

m= coefficiente angolare della retta di calibrazione

MM (NH₄⁺)= massa molecolare dell'ammonio

FD= fattore di diluizione del campione

1000 = fattore di conversione da grammi a milligrammi

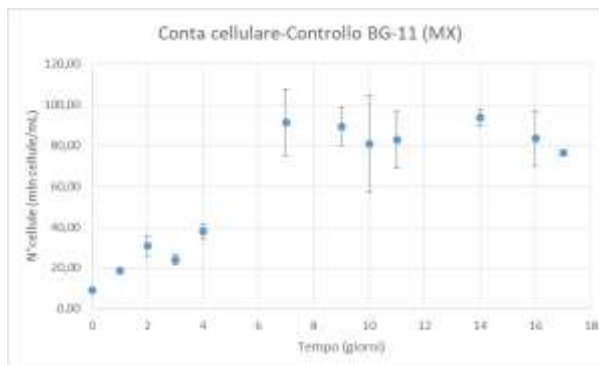
L'unità di misura utilizzata per la quantità di ammonio presente all'interno del campione è pari a mgNH₄⁺ L⁻¹.

3. Risultati e discussione

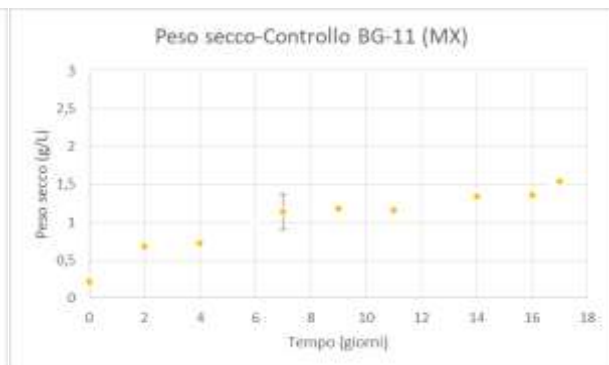
3.1 Fotoperiodo 24:0 con diluizione 1:2 e 1:5 (test 1)

La crescita di *Chlorella vulgaris* NIES-227 su un fermentato ricco di AGV e ammonio è stata testata ad una diluizione di 1:2 e 1:5 utilizzando un fotoperiodo 24:0 (24h luce/24h buio). Il monitoraggio della crescita microalgale, effettuato mediante conta cellulare e peso secco, è illustrato nella figura 18. Come illustrato nei seguenti grafici tutte le condizioni hanno la stessa concentrazione di biomassa iniziale, pari a 9,14 mln cellule mL⁻¹ con un peso secco iniziale pari a 0,22 g L⁻¹.

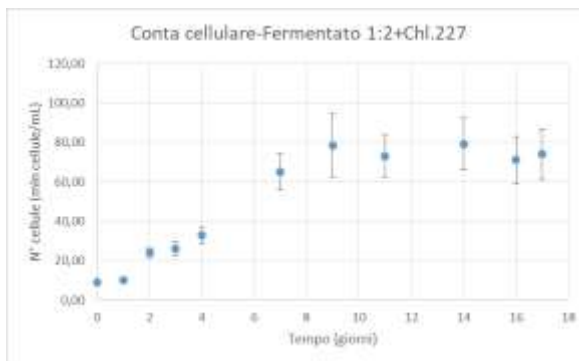
(A)



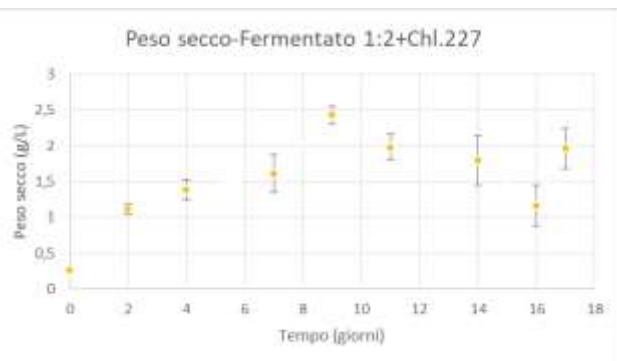
(B)



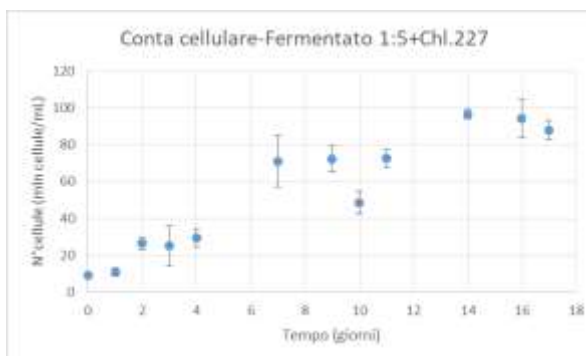
(C)



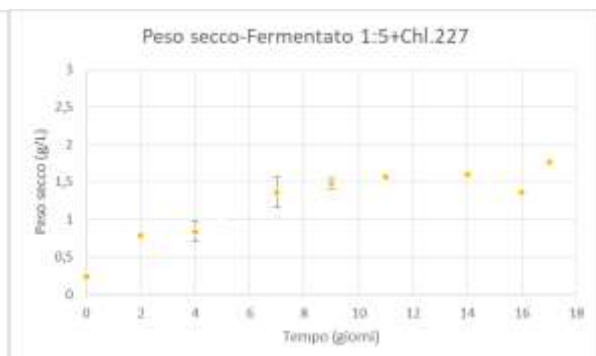
(D)



(E)



(F)



(G)

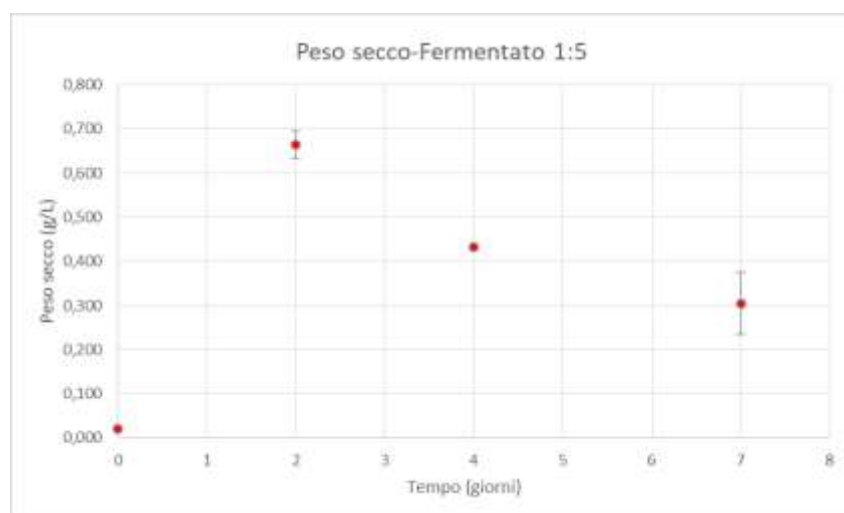


Figura 18. Conta cellulare (A, C ed E) e peso secco (B, D, F e G) alle diverse diluizioni.

Le tre condizioni hanno un andamento di crescita simile, in cui la fase esponenziale inizia al 2° giorno, continuando fino al 6°, seguita dalla fase stazionaria fino alla fine del test (giorno 17). Ciò che differenzia le tre condizioni sono il numero di cellule prodotte durante e alla fine della fase di crescita. Nel caso del controllo BG-11 in mixotrofia al 17° giorno, la produttività di biomassa raggiunta alla fine del test è pari a $84,1 \pm 7,1$ mln cellule mL^{-1} come illustrato nella figura 18 (A) con un peso secco pari a $1,4 \pm 0,2$ g L^{-1} figura 18 (B). La massima concentrazione cellulare invece, ottenuta dal controllo BG-11 mixotrofico durante il corso del test è pari a $93,7 \pm 3,9$ mln cellule mL^{-1} al 14° giorno figura 18 (A) con un peso secco di $1,5 \pm 0,0$ g L^{-1} figura 18 (B). Per quanto riguarda il fermentato diluito 1:2 figura 18 (C) al termine del test la concentrazione di biomassa ottenuta risulta pari a $74,4 \pm 3,5$ mln cellule mL^{-1} , con un peso secco pari a $1,7 \pm 0,4$ g L^{-1} figura 18 (D), la massima concentrazione massima di biomassa, invece è pari a $79,3 \pm 1,3$ mln cellule mL^{-1} ottenuta al giorno 14 con un peso secco di $2,4 \pm 0,1$ g L^{-1} . Nel fermentato diluito 1:5, la concentrazione di biomassa finale è pari a $92,9 \pm 4,5$ mln cellule mL^{-1} figura 18 (E) ovvero il 10% in più rispetto al controllo BG-11 e il 20% in più rispetto al fermentato diluito 1:2, con un peso secco di $1,58 \pm 0,2$ g L^{-1} figura 18 (F). Durante la fase del test con fermentato diluito 1:5 è stata raggiunta una concentrazione massima pari a $96,6 \pm 2,7$ mln cellule mL^{-1} al 14° giorno con peso secco di $1,77 \pm 0,0$ g L^{-1} . Da questi risultati si può dedurre che la massima produttività di biomassa microalgale (mln cellule mL^{-1}) è stata raggiunta con fermentato diluito 1:5 e questo si ipotizza che sia dovuto al fatto che viene fornito alle microalghe la quantità ottimale di carbonio dagli AGV e azoto per la crescita. La massima concentrazione di biomassa però (peso secco), espressa come g L^{-1} è stata rilevata nel fermentato

diluito 1:2, con un valore pari a $2,4 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$. Questo è causato dalla presenza di batteri e dall'accumulo di prodotti secondari ad alto valore aggiunto, che contribuiscono all'aumento del peso secco. L'accumulo di prodotti secondari potrebbe a sua volta essere dovuto ad una maggiore concentrazione di AGV e ammonio rispetto alla diluizione 1:5, che potrebbe risultare meno tollerabile per *C. vulgaris*. Questo potrebbe aver determinato la produzione di metaboliti ad alto valore aggiunto (es. lipidi) come meccanismo di difesa, aumentando le dimensioni cellulari e portando di conseguenza ad un aumento del peso secco (Salbitani & Carfagna, 2021).

La figura 18 (G) rappresenta il solo peso secco di fermentato diluito 1:5 privo di *C. vulgaris*, condizione utilizzata come controllo al fine di valutare se è avvenuta produttività batterica. Come dimostra il grafico, a partire da un peso secco pari a $0,02 \text{ g L}^{-1}$ al giorno 0, al giorno 2 è stato raggiunto un peso secco pari a $0,6 \text{ g L}^{-1}$ fino ad arrivare al giorno 7 in cui è stato raggiunto un peso secco pari a $0,30 \text{ g L}^{-1}$ e ciò significa che è avvenuta produttività batterica dal giorno 0 al giorno 2 e nei giorni successivi la produttività batterica diminuisce.

Questi valori di concentrazione e produttività di biomassa sono stati ottenuti mantenendo sempre un pH pari a 8. Lacroux et al. (2020) ha testato la massima concentrazione di biomassa in mixotrofia al variare del pH in diversi ceppi microalgali, a diverse diluizioni su effluenti della fermentazione anaerobica, per valutare come il pH influenza il tasso di crescita, ottenendo che la massima concentrazione di biomassa ottenuta è pari a $1,17 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$, ad un pH pari a 7. Nel presente test, utilizzando un pH pari ad 8 la massima produttività di biomassa ottenuta è pari a $2,4 \pm 0,1 \text{ g L}^{-1}$. Perciò è dimostrato che il pH influenza la crescita di biomassa e che un pH pari ad 8 è il valore di pH ottimale che consente di ottenere un maggior tasso di crescita.

Da questi risultati ottenuti, utilizzando queste diluizioni, è possibile dedurre che il ceppo *Chlorella vulgaris* NIES-227 è in grado di crescere utilizzando come substrato un fermentato non sterilizzato utilizzando fotoperiodo 24:0.

Come riportato da Krzemińska et al., (2014) e Khoeyi et al.,(2012) , il regime di luce è un fattore importante nel controllo della produzione di biomassa in *Chlorella vulgaris*. Infatti una maggiore durata della luce comporta un aumento della biomassa a diverse intensità e l'aumento del tasso di crescita è associato all'aumento della durata della luce.

I seguenti grafici illustrati nella seguente figura (figura 19) rappresentano le cinetiche di crescita (o tasso di crescita) di *Chlorella vulgaris* nel substrato di crescita alle diverse diluizioni.

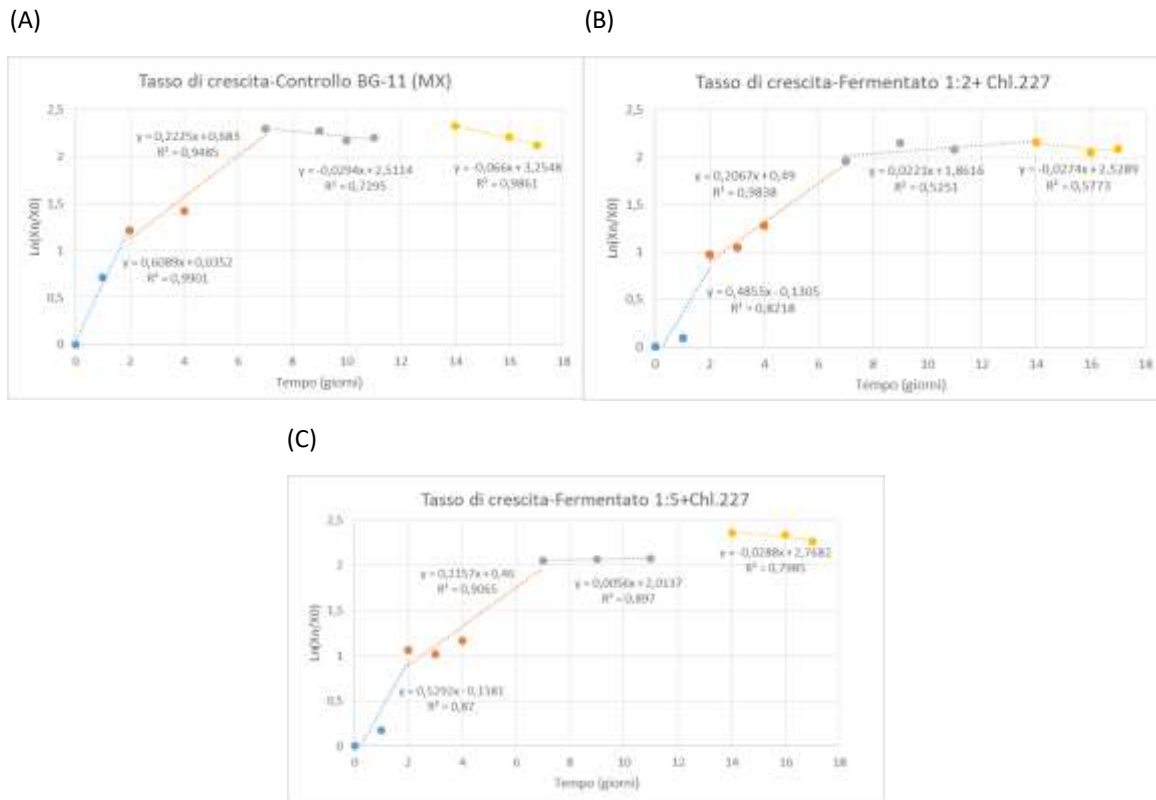


Figura 19. Tasso di crescita di *C. vulgaris* alle diverse diluizioni (A, B e C).

I tassi di crescita sono stati calcolati facendo riferimento alla conta cellulare in tutti e tre i test.

In tutte le condizioni sono state identificate quattro diverse fasi di crescita, ad ognuna delle quali corrisponde un diverso tasso di crescita. Dal giorno 0 al giorno 2 si osserva il tasso di crescita maggiore, probabilmente sostenuto dal consumo dell'acetato, che viene completamente rimosso al giorno 2 nel controllo e al giorno 1 sul fermentato 1:2 e 1:5 figura 20 (A, B, C e D). In questa fase, il fermentato 1:2 0,48 con d^{-1} ed il fermentato 1:5 con 0,52 d^{-1} , mostrano un tasso di crescita leggermente inferiore rispetto al controllo (0,60 d^{-1}), che potrebbe essere dovuto al consumo di una piccola percentuale di acetato da parte della componente batterica del consorzio (Bhatnagar et al., 2010).

Dal 2° giorno al 7° giorno, le microalghe assimilano una piccola parte di butirrato il quale però, rallenta il tasso di crescita, come spiegato in precedenza. Il controllo (BG-11 MX) presenta un tasso di crescita pari a $0,22 \text{ d}^{-1}$, mentre il fermentato 1:2 di $0,20 \text{ d}^{-1}$ ed il fermentato 1:5 di $0,21 \text{ d}^{-1}$. Inoltre un altro processo importante è che le microalghe una volta consumato l'acetato, il metabolismo rimane mixotrofico ma la componente autotrofica diventa dominante perché le microalghe, a parte una piccola parte di assimilazione di butirrato, non riescono ad assimilare gli altri AGV. Gli altri AGV sono decomposti da batteri generando CO_2 , che le microalghe utilizzano per il metabolismo autotrofico (Tikoo et al., 1996). Nei seguenti giorni il tasso di crescita diminuisce sempre di più a causa del consumo completo degli AGV, risultando nel controllo BG-11 (MX) $-0,02 \text{ d}^{-1}$, nel fermentato 1:2 $0,02 \text{ d}^{-1}$ e fermentato diluito 1:5 $0,005 \text{ d}^{-1}$ arrivando dunque alla fase stazionaria. A seguire, dal giorno 14 al giorno 17 il tasso di crescita risulta negativo poiché viene raggiunta l'ultima fase della curva di crescita in cui la scarsa presenza di nutrienti la biomassa non è più in grado di riprodursi. Infatti il numero di cellule inizia a diminuire in quanto il numero di cellule morte risulta superiore a quelle in divisione e in fase di latenza. Nel controllo BG-11 (MX) il tasso di crescita è pari a $-0,06 \text{ d}^{-1}$, nel fermentato 1:2 $-0,02 \text{ d}^{-1}$ e nel fermentato 1:5 $-0,02 \text{ d}^{-1}$.

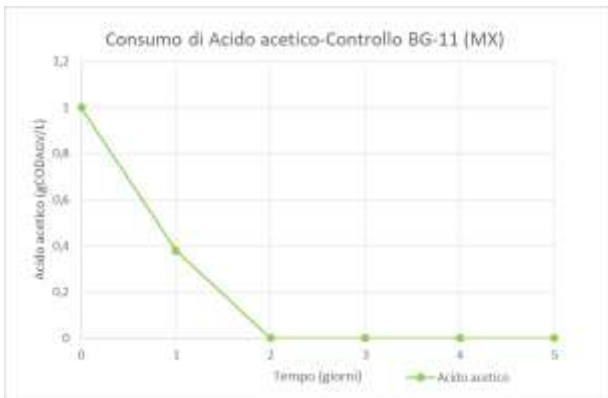
Valutata l'idoneità del ceppo a crescere su fermentato ricco di ammonio e AGV è stata effettuata l'analisi della quantità lipidica prodotta da ogni condizione dalla biomassa microalgale ottenendo i seguenti risultati: nel controllo BG-11 (MX) è pari al $45,3 \pm 5,6\%$, nel fermentato diluito 1:2 è pari $56,5 \pm 4,8\%$, mentre nel fermentato 1:5 è pari a $46,2 \pm 28\%$. Il quantitativo lipidico maggiore prodotto in questa prima sperimentazione è stato maggiore nel fermentato diluito 1:2 con fotoperiodo 24:0 risultando la condizione migliore in termini di produttività lipidica, rispetto alle altre diluizioni utilizzate. Questo risultato è attendibile in quanto utilizzando una diluizione di tipo 1:2, rispetto a 1:5 equivale ad una maggiore concentrazione di AGV e quindi di carbonio, ammonio e produttività batterica. Questo insieme di fattori generano stress alla coltura microalgale che di conseguenza produce una maggior quantità di lipidi, carboidrati e proteine come meccanismo di difesa, come riscontrato da (Chuka-ogwude et al., 2020).

Il fermentato 1:2 presenta una maggior concentrazione di azoto, perciò confrontando i dati con la letteratura che dimostrano che una carenza di concentrazione di azoto (Singh et al., 2016) produce una maggior quantità lipidica, la percentuale lipidica dovrebbe essere minore, ma i valori di lipidi riscontrati ottenuti sono simili a quelli descritti in letteratura. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che, le microalghe rimuovono il 91-93% dell'ammonio nei primi 9 giorni (figura 22), entrando

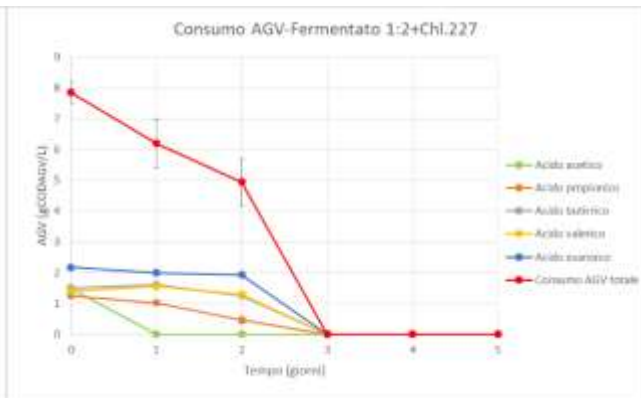
successivamente in una fase di carenza di azoto che potrebbe aver determinato l'accumulo di lipidi. Inoltre, anche la presenza di batteri potrebbe aver agito da fattore di stress, favorendo quindi l'accumulo di lipidi. Anche nello studio riportato da Shen et al. (2019), il ceppo *Chlorella vulgaris* NIES-227 in coltura axenica (sterile), posta a situazione di stress da carenza di ammonio con fotoperiodo 14:8, ha dimostrato che la produttività lipidica risultava 1,9 volte maggiore in coltura mixotrofica (62,6%) rispetto all'eterotrofa e all'autotrofa, probabilmente perché l'acetato più assimilato è diretto alla sintesi lipidica.

Le microalghe caratterizzate da metabolismo mixotrofico assimilano per le funzioni metaboliche una fonte di carbonio organico, costituita in questo caso dagli AGV, e una fonte di carbonio inorganico (CO₂). Come riportato in figura 20, il consorzio microalghe-batteri ha consumato completamente gli AGV dopo 3 giorni.

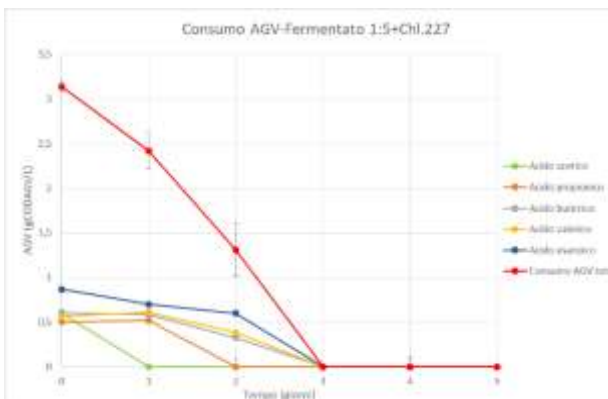
(A)



(B)



(C)



(D)

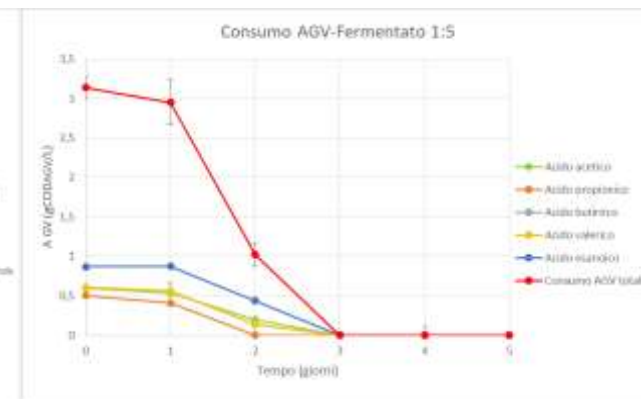


Figura 20. Consumo di AGV alle diverse diluizioni (A, B, C e D).

Nel controllo BG-11 (MX) figura 20 (A), l'acido acetico viene consumato completamente dopo due giorni, coerentemente con la sua rapida assimilazione da parte delle microalghe.

Nel consorzio microalghe-batteri coltivato su fermentato è stata osservata una rimozione totale degli AGV dopo tre giorni, con un andamento diverso per i diversi AGV. L'acido acetico, presente ad una concentrazione pari a $1,49 \pm 0,07$ gCOD/L e $0,59 \pm 0,02$ gCOD/L rispettivamente nel fermentato 1:2 e 1:5, è stato completamente consumato al giorno 1; La velocità di rimozione dell'acetico tra il giorno 0 e 1 è pari a $25,87 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nel controllo BG-11 (MX), di $62,08 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in 1:2 e $24,83 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in 1:5. Anche negli esperimenti di Cho et al. (2015), l'acido che è stato più rapidamente

assorbito dalle microalghe è stato l'acetato. Infatti è noto che l'acetato è una delle migliori fonti di carbonio organico per la coltivazione di microalghe in mixotrofia ed in eterotrofia in quanto essendo caratterizzato da un basso peso molecolare e una semplicità strutturale rispetto agli altri AGV è assorbito più rapidamente dalle microalghe (Bhatnagar et al., 2010). I risultati ottenuti sono coerenti con la teoria di Cho et al. (2015).

Nel fermentato 1:5 privo di *C.vulgaris* e caratterizzato solo da batteri utilizzato come controllo, invece, l'acido acetico viene consumato completamente solo al giorno 3, con un andamento simile nel consumo dei diversi AGV che sembra indicare l'assenza di una preferenza per determinati AGV da parte dei batteri presenti nel fermentato. Alla luce di questo, il consumo più rapido dell'acido acetico nelle colture microalgali su fermentato 1:2 e 1:5, in cui l'acetico viene consumato al giorno 1, indica la sua assimilazione da parte delle microalghe, che potrebbero avere un vantaggio competitivo sui batteri nell'assimilazione dell'acetato, come peraltro già osservato da Turon et al. (2015).

L'utilizzo di tutti gli altri AGV è simile al fermentato 1:5 privo di *C. vulgaris* ad eccezione dell'acido propionico, la cui concentrazione nel fermentato 1:2 risulta pari a 0 al 3° giorno mentre nel fermentato 1:5 con *C. vulgaris* e senza *C. vulgaris* il consumo totale avviene al 2° giorno. La diversa velocità di utilizzo potrebbe essere dovuta al fatto che nel fermentato 1:2 la concentrazione iniziale di acido propionico sia più alta rispetto al fermentato 1:5. Nel fermentato 1:5 con e senza *C. vulgaris* il propionico viene consumato al 2° giorno, indicando che il consumo di propionico potrebbe essere dovuto principalmente dall'attività batterica, essendo che *C.vulgaris* favorisce il consumo di acetato e butirrato.

Confrontando i risultati ottenuti nelle sperimentazioni di questo lavoro di tesi con la letteratura è possibile dedurre che *C. vulgaris* utilizza la fonte di carbonio fornita dagli AGV ma l'acido più favorito all'assimilazione è l'acido acetico (Bhatnagar et al., 2010). I risultati ottenuti nelle sperimentazioni confermano quanto descritto in letteratura. Chandra et al. (2015), ha svolto una serie di esperimenti caratterizzati da coltura in mixotrofia di microalghe. Le tre serie di esperimenti sono state eseguite individualmente con acetato, butirrato e propionato, in modalità batch alimentate in mixotrofia, progettati e gestiti per 14 giorni. È stato riscontrato una velocità di consumo maggiore di acido acetico rispetto a butirrico e propionico.

Grazie alla loro capacità di assimilare alcune fonti di carbonio organico ed i nutrienti, tra i quali soprattutto azoto e fosforo, le microalghe possono essere utilizzate anche per la depurazione dei reflui che li contengono, producendo contemporaneamente una biomassa ricca di composti ad alto valore aggiunto. Aslan & Kapdan, (2006) affermano che *Chlorella vulgaris* è una delle specie microalgali migliori per la *phycoremediation* delle acque reflue. I test di coltivazione microalgale svolti in questo lavoro di tesi sono stati monitorati anche considerando il consumo di sCOD, per valutarne la rimozione e la conseguente depurazione del refluo utilizzato come substrato. La seguente figura (figura 21), rappresenta l'andamento del consumo di sCOD.

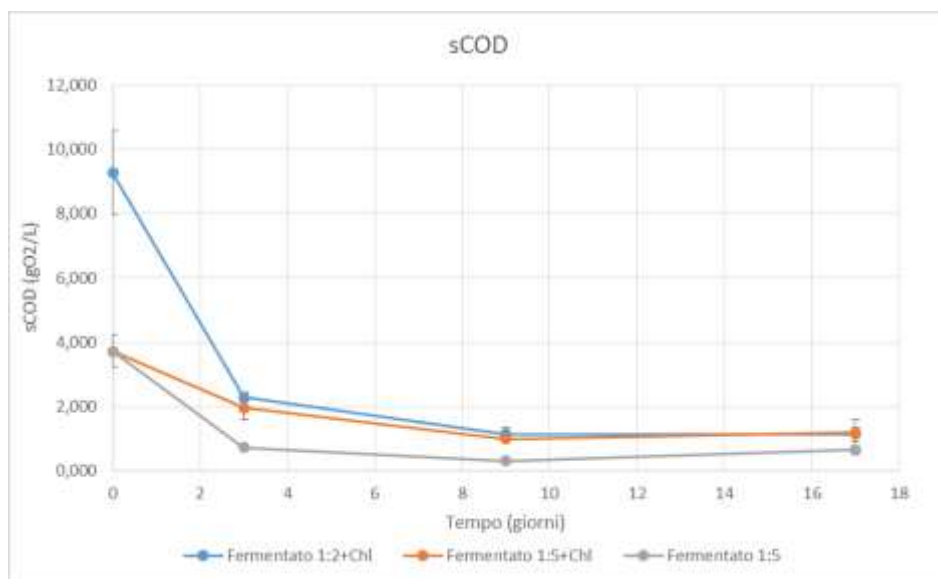


Figura 21. Efficienza di rimozione di sCOD con fotoperiodo 24:0.

Il COD è un parametro molto importante in quanto da un'indicazione indiretta della quantità di sostanza organica degradabile, ricca di carbonio presente all'interno di un campione.

La maggior quantità di sCOD viene rimossa tra il giorno 0 e il giorno 3, coerentemente alla rimozione di AGV che risulta completa al giorno 3 in tutte le condizioni testate (Figura 20). Infatti il fermentato 1:2 presenta un'efficienza di rimozione dell'sCOD pari al 75,4%, il fermentato 1:5 il 47,7% mentre il fermentato 1:5 privo di *C. vulgaris* l'80,7%, dopo 3 giorni di test.

Al giorno 9 la concentrazione di sCOD è minima. Come illustrato nel grafico (figura 21) però al giorno 17 il valore aumenta leggermente e questo potrebbe essere dovuto al fatto che le colture iniziano a passare dallo stato stazionario alla fase di decadimento, come indicato nei grafici delle cinetiche di crescita (figura 19).

Alla fine della sperimentazione, la rimozione totale di sCOD alle diverse diluizioni in cui è presente *C. vulgaris* è pari all'87,8% nel fermentato diluito 1:2 e al 68,4 % nel fermentato 1:5. Il controllo 1:5 privo di *C. vulgaris* rileva un'efficienza di rimozione massima pari all'83%, raggiunta dalla sola comunità batterica, maggiore rispetto al 68,4 % della condizione avente la stessa diluizione contenente *C. vulgaris*. Questo potrebbe dipendere dal fatto che le colture microalgali potrebbero aver prodotto esopolisaccaridi e quindi sCOD in risposta allo stress causato dalla presenza dei batteri. Infatti, tra le funzioni degli esopolisaccaridi vi è anche la protezione delle cellule microalgali dagli stress sia biotici che abiotici (Zhang et al., 2019). Questo però non è stato verificato in questa sperimentazione.

I valori ottenuti confermano i risultati rilevati anche in letteratura. Infatti Aslan & Kapdan, (2006) affermano che utilizzando un fotoperiodo 24:0, *C. vulgaris* riesce a rimuovere una grande quantità di sCOD presente nei reflui, all'interno di un *range* che varia dal 61 all' 86%. Infatti i valori di sCOD ottenuti dal seguente test alle diverse diluizioni rientra all'interno di questo *range* eccetto il fermentato diluito 1:2 che è leggermente superiore.

La seguente figura (figura 22) rappresenta il consumo di azoto ammoniacale da parte del consorzio microalghe-batteri e solo batteri alle diverse diluizioni di fermentato.

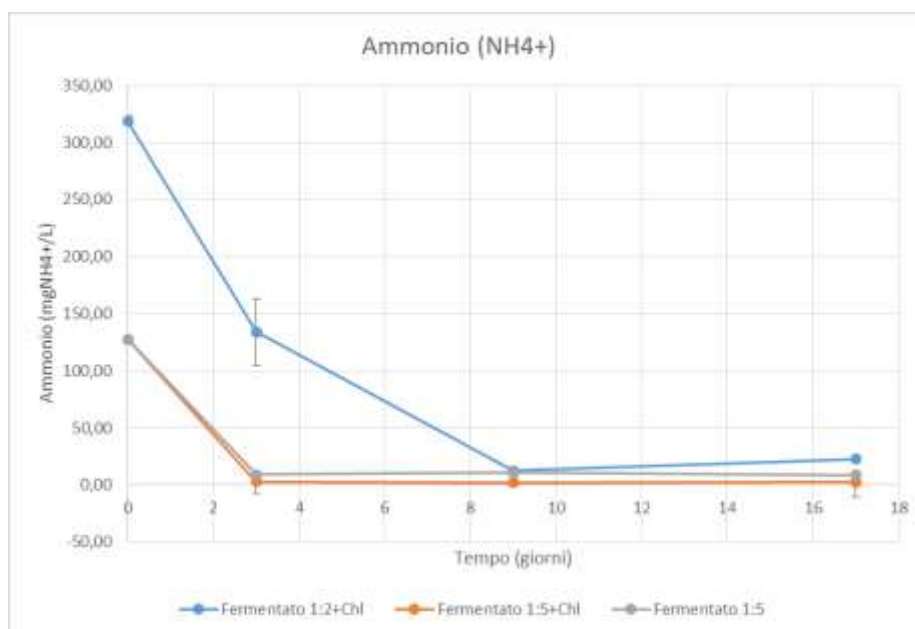


Figura 22. Efficienza di rimozione di ammonio con fotoperiodo 24:0.

La quantità di ammonio presente al giorno 0 nel fermentato diluito 1:2 è pari a $318,98 \pm 15 \text{ mgNH}_4^+ \text{L}^{-1}$, mentre nel fermentato diluito 1:5 con e senza *C. vulgaris* è pari a $127,5 \pm 6,3 \text{ mgNH}_4^+ \text{L}^{-1}$.

Anche l'ammonio, come l'sCOD e gli AGV, è stato maggiormente consumato nei primi giorni (dal giorno 0 al giorno 3), soprattutto nella condizione caratterizzata da fermentato 1:5 che presenta un'efficienza di rimozione pari al 97,7%, con una velocità di rimozione pari a $1,73 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mentre il fermentato 1:5 privo di *C.vulgaris* il 93,3%, con una velocità di rimozione pari a $1,64 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. In queste due condizioni, dal giorno 3 al giorno 17 la concentrazione di ammonio rimane minima e costante, da 2,92 a 2,31 $\text{mg NH}_4^+ \text{L}^{-1}$ per il fermentato 1:5 e da 9,02 a 8,44 $\text{mg NH}_4^+ \text{L}^{-1}$, nel fermentato 1:5 privo del ceppo.

Il fermentato 1:2, invece, dal giorno 0 al giorno 3 presenta un'efficienza di rimozione pari al 57,9%, con una velocità di rimozione pari a $2,56 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e raggiunge il valore massimo (90.9%) al giorno 9. La velocità di uptake (rimozione) di azoto è rallentato nei primi giorni in 1:2 rispetto a 1:5 perchè può essere dovuto a inibizione da maggior concentrazione di ammonio. Anche in questo caso, la concentrazione di ammonio rimane minima nei giorni successivi fino alla fine del test (dal giorno 9 al giorno 17).

Comunque, in ogni condizione è stata rilevata una buona resa di rimozione dell'ammonio alla fine della sperimentazione. Il fermentato 1:2 presenta una percentuale di rimozione totale pari al 92,8%, il fermentato 1:5 con *C.vulgaris* pari al 98,1%, mentre il controllo caratterizzato da fermentato diluito 1:5 privo di *C. vulgaris* ha raggiunto la percentuale di rimozione massima, pari al 93,3 % ad opera dei soli batteri nitrificanti. Il fermentato 1:5 caratterizzato dal consorzio microalghe-batteri presenta una maggior percentuale di rimozione rispetto alle altre condizioni, probabilmente dal fatto che la presenza di microalghe a questa diluizione associata a batteri nitrificanti promuovono una buona resa di rimozione di ammonio.

Aslan & Kapdan, (2006) affermano che il *range* di rimozione di azoto (%) di *C.vulgaris* su fermentato varia dal 45-97%. I valori ottenuti rientrano all'interno di questo *range* eccetto il fermentato diluito 1:5 con *C. vulgaris* che è leggermente più alto.

La seguente tabella (tabella 4) sintetizza i risultati ottenuti nel test 1 appena descritti, in cui il consorzio *C. vulgaris*-batteri è risultato idoneo alla crescita su fermentato.

Tabella 4. Risultati riassuntivi del test 1.

Test 1 Fotoperiodo 24:0	Unità di misura	Controllo-BG-11		Ferm 1:5+ <i>Chl.227</i>		Ferm 1:2+ <i>Chl.227</i>		Ferm 1:5
		Media	Dev.st	Media	Dev.st	Media	Dev.st	
Conta cellulare iniziale	mln cellule mL ⁻¹	9,14	±0,7	9,14	±0,7	9,14	±0,7	
Peso secco iniziale	g L ⁻¹	0,22	±0,5	0,24	±0,2	0,27	±0,1	0,02 ±0,1
Conta cellulare finale	mln cellule mL ⁻¹	84,1	±7,1	92,9	±4,5	74,4	±3,5	
Peso secco finale	g L ⁻¹	1,4	±0,2	1,6	±0,2	1,7	±0,4	0,30±0,0
Conta cellulare max	mln cellule mL ⁻¹	93,7	±3,9	96,6	±2,7	79,3	±13	
Peso secco max	g L ⁻¹	1,5	±0,0	1,8	±0,0	2,4	±0,1	
Contenuto lipidico	%	45,3	±5,6	46,2	±28	56,5	±4,8	
Rimozione AGV	%	100		100		100		100
Rimozione sCOD	%			68,4		87,8		83
Rimozione N- NH ₄ ⁺	%			98,1		92,8		93,3

Come riportato nella tabella 4, il 100% degli AGV sono stati consumati dopo 3 giorni. *C. vulgaris* ha mostrato la maggiore produzione di biomassa, pari a $2,4 \pm 0,1$ g L⁻¹, nel fermentato diluito 1:2 a pH 8. La condizione caratterizzata da fermentato 1:5 privo di *C. vulgaris* è stato utilizzato come controllo per verificare, oltre a valutare se è avvenuta produttività batterica, i) l'eventuale perdita degli AGV per strippaggio ii) la capacità dei microrganismi presenti nel fermentato nel consumare gli AGV. Quello che si può notare dai dati è che non è avvenuto strippaggio in quanto dopo un giorno gli AGV non sono stati rimossi; i microrganismi naturalmente presenti hanno proliferato e consumato tutti gli AGV nei giorni successivi.

Rispetto alla produzione di lipidi, la percentuale maggiore di lipidi nella biomassa, pari al $56,5 \pm 4,8\%$, è stata raggiunta nel fermentato diluito 1:2 con *C. vulgaris*. Valori interessanti sono stati ottenuti anche per la rimozione di sCOD e ammonio, che variano in un *range* pari a 68,4-87,8% e 92,8-98,1%.

Per valutare l'effetto del fotoperiodo sulla crescita di *C. vulgaris*, sul consumo di AGV e azoto, sulla produttività lipidica, sul consumo di ammonio e sCOD, sono stati effettuati delle altre sperimentazioni illustrate nei paragrafi successivi. E' stata effettuata una seconda sperimentazione, utilizzando lo stesso fotoperiodo (24:0), aggiungendo una condizione caratterizzata da *C. vulgaris* su fermentato tal quale (TQ), mentre il test successivo (test 3) mantiene alcune condizioni ma viene variato il fotoperiodo (12:12).

3.2 Fotoperiodo 24:0 con diluizione 1:1 e 1:5 (test 2)

La crescita microalgale su AGV con fotoperiodo 24:0 è stata quindi testata sul fermentato non diluito e sul fermentato diluito 1:5, che è stato ripetuto per verificare la ripetibilità dei risultati ottenuti nel test precedente. La concentrazione cellulare di partenza e il peso secco sono le stesse del precedente test, pari a $9,14 \text{ mln cellule mL}^{-1}$ mentre il peso secco iniziale è pari a $0,22 \text{ g L}^{-1}$. I risultati ottenuti per la conta cellulare e il peso secco sono i seguenti:

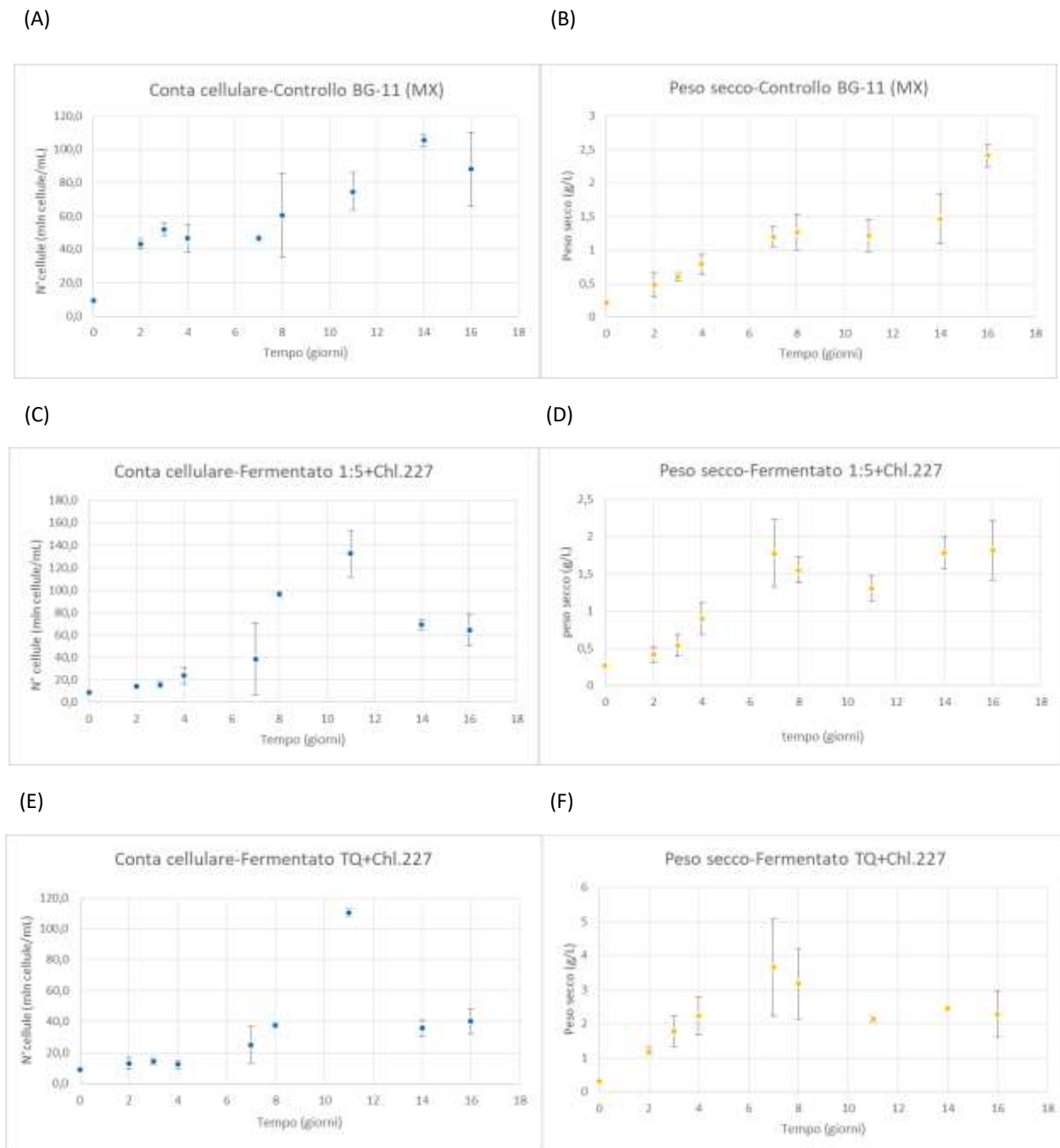


Figura 23. Conta cellulare (A, C ed E) e peso secco (B, D e F) alle diverse diluizioni.

Alla fine del test (giorno 16), il controllo BG-11 MX ha raggiunto una concentrazione cellulare pari a $88,3 \pm 21,8$ mln cellule mL^{-1} figura 23 (A) e un peso secco pari a $2,4 \pm 0,16$ g L^{-1} figura 23 (B) mentre la concentrazione cellulare massima, pari a $105,3 \pm 3,1$ mln cellule mL^{-1} è stata raggiunta al giorno 14 con un peso secco pari a $1,4 \pm 0,3$ g L^{-1} . Il fermentato diluito 1:5 con *C. vulgaris* al 16° giorno la concentrazione di biomassa era pari a $64,8 \pm 14$ mln cellule mL^{-1} figura 23 (C) e un peso secco massimo di $1,8 \pm 0,4$ g L^{-1} figura 23 (D). Utilizzando questa diluizione all'11° giorno il numero massimo di cellule riprodotto è pari a $132,7 \pm 20$ mln cellule mL^{-1} con un peso secco di $1,3 \pm 0,6$ g L^{-1} . La deviazione standard risulta abbastanza alta, in quanto avendo solo due repliche di un processo biologico, la variabilità è piuttosto alta. La terza e ultima condizione è la crescita di *C. vulgaris* su fermentato tal quale (TQ) o non diluito che ha portato ad una riproduzione cellulare finale pari a $40,2 \pm 7,8$ mln cellule mL^{-1} figura 23 (E) con un peso secco finale pari a $2,2 \pm 0,6$ g L^{-1} figura 23 (F). La massima concentrazione di biomassa, pari a $3,6 \pm 1,4$ g L^{-1} è stata raggiunta al giorno 7 in quanto il fermentato TQ contiene anche una maggior quantità batterica. Invece la massima produttività di biomassa è stata raggiunta al giorno 11 pari a $110,4 \pm 2,2$ mln cellule mL^{-1} . Questo valore, particolarmente alto rispetto all'andamento del processo, potrebbe essere giustificato dalla presenza di agglomerati di cellule che hanno impedito di effettuare un campionamento rappresentativo. Questo è confermato anche dal fatto che ad un aumento così consistente del numero di cellule non è corrisposto un aumento del peso secco. Quest'ultima condizione rispetto al controllo BG-11 MX e al fermentato diluito 1:5 con *C. vulgaris* ha portato ad una bassa riproduzione cellulare e ciò può essere dovuta al fatto che oltre alla presenza batterica vi è un'elevata concentrazione di AGV e ammonio che potrebbe essere leggermente inibitoria per la crescita generando di conseguenza una fonte di stress per le microalghe.

Il fermentato diluito 1:5 con *C. vulgaris* presenta un andamento leggermente diverso rispetto a quello osservato nel test 1, con una *lag phase* più lunga, durata fino al giorno 4. La biomassa inizia a crescere al giorno 7, raggiungendo una concentrazione massima ($132,7 \pm 20$ mln cellule mL^{-1}) al giorno 11 maggiore rispetto a quella ottenuta nel test 1 ($96,6 \pm 2,7$ mln cellule mL^{-1}), probabilmente a causa della presenza di agglomerati di cellule, come osservato anche nel fermentato 1:2. Tale discrepanza nei risultati può essere attribuita alla variabilità dei test effettuati su organismi viventi e substrati reali, specialmente nel momento in cui i microrganismi interagiscono formando un consorzio. Comunque, entrambi i test effettuati confermano la capacità di *C. vulgaris* di crescere su un effluente reale non sterilizzato contenente ammonio e AGV, con una concentrazione finale di biomassa compresa tra $64,8$ e $92,9$ mln cellule mL^{-1} e $1,6$ - $1,8$ g L^{-1} .

I risultati relativi al tasso di crescita sono illustrati nelle seguente figura (figura 24):

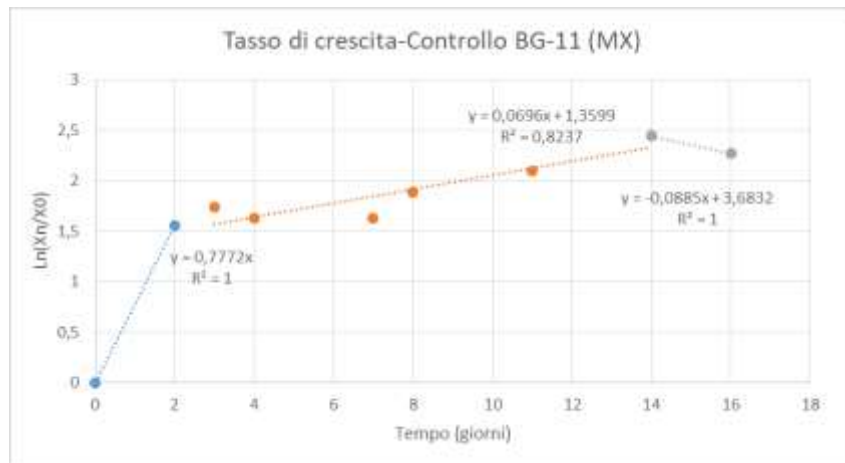


Figura 24. Tasso di crescita del Controllo BG-11 (MX).

Nel controllo BG-11 (MX) sono state identificate tre diverse fasi di crescita, ad ognuna delle quali corrisponde un diverso tasso di crescita. Dal giorno 0 al giorno 4 si osserva il tasso di crescita maggiore, probabilmente sostenuto dal consumo dell'acetato, che viene completamente rimosso al giorno 2. In questa fase, il BG-11 (MX) presenta un tasso di crescita pari a $0,40 \text{ d}^{-1}$ che è più basso rispetto al controllo del precedente test. Nei giorni successivi in cui l'acetato è stato consumato, il tasso di crescita è diminuito $0,06 \text{ d}^{-1}$, in quanto la componente autotrofica diventa dominante perché una volta consumato l'acetato le microalghe non riescono ad assimilare gli altri AGV. Infine circa dal giorno 10 la coltura entra in fase di morte e non è più in grado di riprodursi, perciò il tasso di crescita risulta negativo $-0,08 \text{ d}^{-1}$. Per quanto riguarda le altre condizioni (1:5 e 1:1), non è stato possibile descrivere la curva di crescita perché non risultata modellabile attraverso l'equazione di Monod e quindi non è stato possibile calcolare il tasso di crescita.

Comunque il tasso di crescita in 1:5 si suppone sia simile a quello ottenuto nel precedente test 1, circa $0,52 \text{ d}^{-1}$ dal giorno 0 al giorno 3 e $0,21 \text{ d}^{-1}$ dal giorno 2 fino all'inizio della fase stazionaria. Nel fermentato diluito 1:1 (TQ) nei primi giorni, valutando l'andamento di crescita, figura 23 (E), il tasso di crescita dovrebbe risultare minore rispetto alle altre condizioni, con un valore ipotetico intorno a $0,10 \text{ d}^{-1}$, causato dall'adattamento delle microalghe alle elevate concentrazioni di ammonio e AGV.

Anche in questo test è stata riproposta l'analisi lipidica, anche nel fermentato diluito 1:1 con i risultati illustrati nella tabella (tabella 5).

Nel controllo BG-11 (MX) alla fine della sperimentazione la biomassa ha accumulato il $55,5 \pm 6\%$ di lipidi. Nel fermentato diluito 1:5 il $28,1 \pm 2\%$, minore rispetto al fermentato diluito 1:5 del test precedente, pari al $46,2 \pm 28\%$. Infine nel fermentato TQ è stato prodotto il $65,9 \pm 6\%$. Quest'ultima condizione porta ad una maggiore produzione di quantità lipidica rispetto alle altre, probabilmente a causa del maggiore stress dovuto ad una maggiore concentrazione di AGV e dalla presenza di batteri (Singh et al., 2016). Questa risulta la condizione ottimale per la produttività lipidica, rispetto alle altre condizioni.

Singh et al. (2016) afferma che una percentuale lipidica maggiore del 38% può essere utilizzata per la produzione di biocarburanti. Tutte le condizioni utilizzate nel test 1 e 2, hanno raggiunto un contenuto lipidico $> 38\%$ ad eccezione del fermentato 1:5 presente test. Perciò i lipidi prodotti possono essere utilizzati per produrre biocarburanti come il biodiesel di terza generazione.

Il consumo di AGV è illustrato nella seguente figura 25:

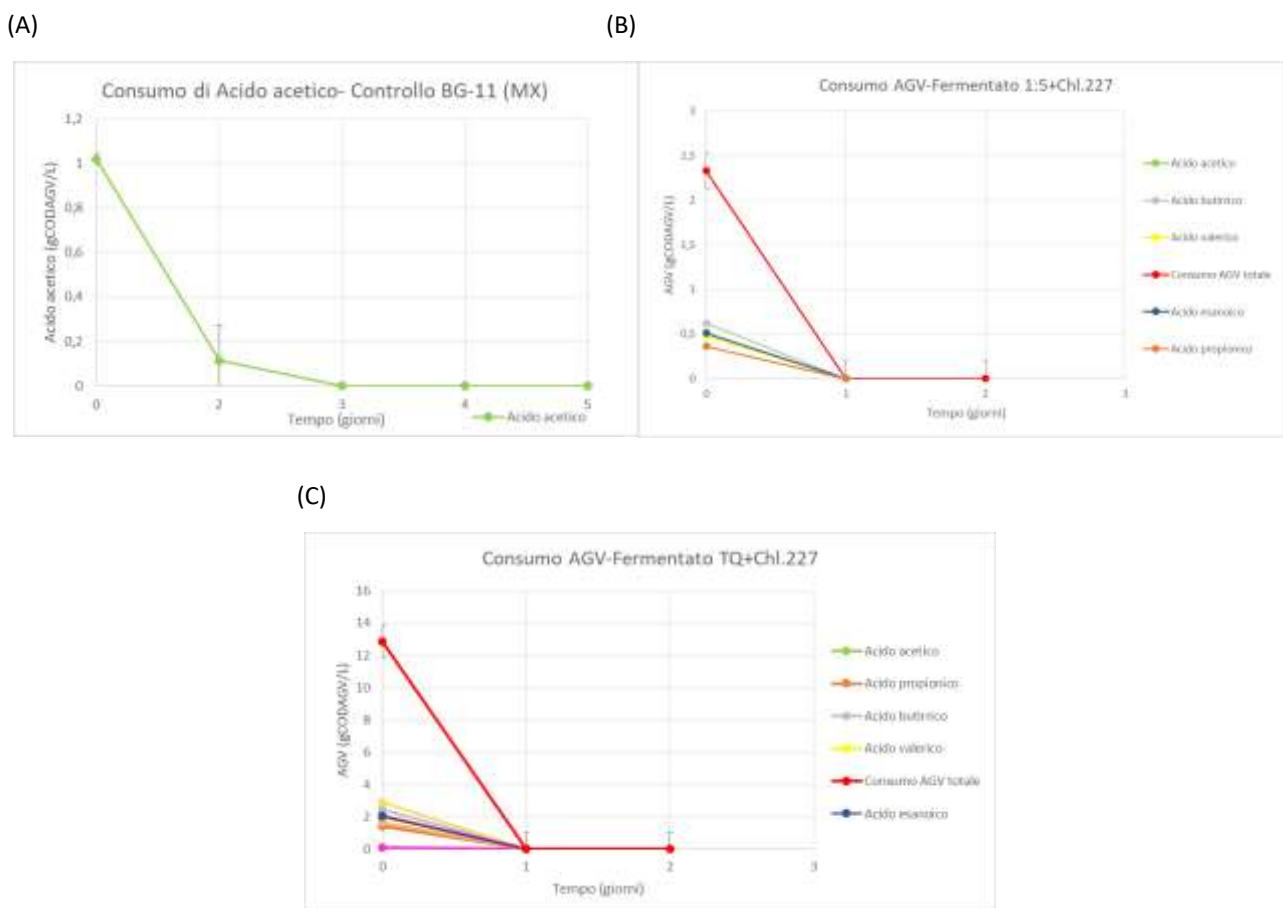


Figura 25. Consumo di AGV alle diverse diluizioni (A, B e C).

Il consumo di AGV pari al 100% nel fermentato TQ, è avvenuta al 1° giorno a partire da una concentrazione totale di AGV pari a $12,87 \pm 1 \text{ gCOD L}^{-1}$, calcolata tenendo conto del fattore di diluizione pari a 1.25. Anche nel fermentato 1:5 la totale rimozione avviene al giorno 1. La velocità di rimozione di acido acetico tra il giorno 0 e 1, è pari a $15 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in 1:5 e $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nel fermentato TQ. Nel controllo BG-11 (MX) invece, nei primi giorni (da 0 a 3), la velocità di rimozione è pari a $14,02 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Confrontando il fermentato 1:5 del presente test con quello del precedente test, in cui entrambi le condizioni sono delle repliche è osservabile un diverso andamento di consumo di AGV, in quanto in questo caso la maggior parte di AGV viene consumata al giorno 1, anziché al giorno 3 come nel precedente test 1. Questo potrebbe indicare un più rapido sviluppo della comunità batterica del fermentato, che ha degradato più velocemente gli AGV causando al tempo stesso l'inibizione della crescita della biomassa nei primi 4 giorni. Inoltre, è opportuno riconoscere i limiti del metodo analitico utilizzato per la determinazione degli AGV, che non permette la rilevazione di concentrazioni molto basse su substrati complessi quali il fermentato. Per quanto riguarda il controllo BG-11 (MX), si potrebbe ipotizzare lo stesso problema poichè la degradazione totale di acido acetico avviene al giorno 3, mentre nel precedente test 1, al giorno 2 ed entrambi le repliche hanno la stessa concentrazione iniziale.

Il consumo di sCOD rilevato dal seguente test è illustrato nella seguente figura (figura 26):

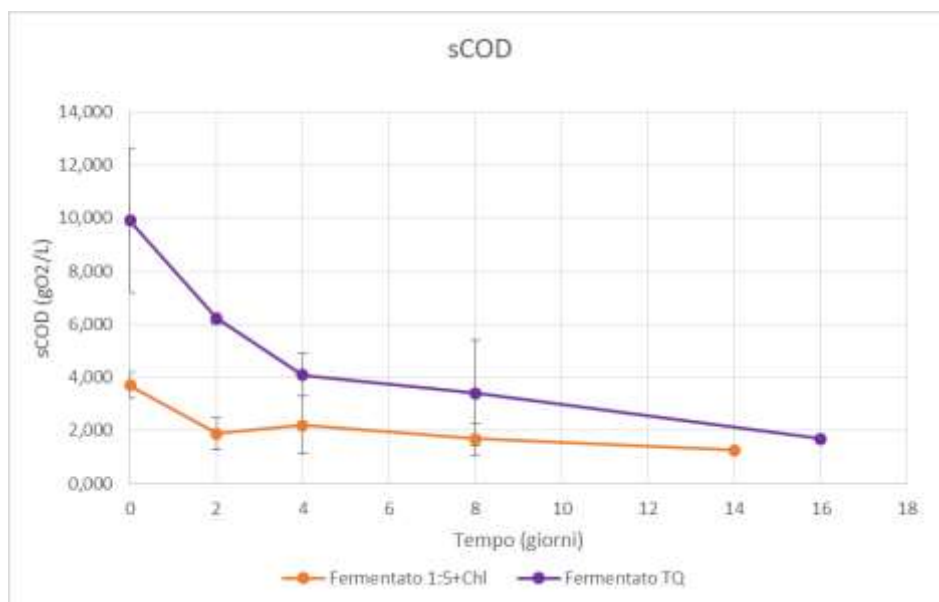


Figura 26. Efficienza di rimozione di sCOD con fotoperiodo 24:0.

La condizione caratterizzata da fermentato diluito 1:5 con *C. vulgaris*, inizialmente presenta una concentrazione di sCOD pari a $3,71 \pm 0,5 \text{ gO}_2 \text{ L}^{-1}$ con una resa di rimozione dopo 14 giorni pari al 65,7%. Questo risultato è simile alla stessa condizione utilizzata nel precedente test (pari a 68,4%), perciò per quanto riguarda la rimozione di sCOD di questa condizione i risultati sono abbastanza coerenti.

Il fermentato TQ inizialmente è caratterizzato da una concentrazione di sCOD più elevata, pari a $9,91 \pm 2,7 \text{ gO}_2/\text{L}$ e dopo 16 giorni presenta un'efficienza di rimozione pari all'83%. La maggiore percentuale di rimozione di sCOD è stata ottenuta dalla condizione fermentato diluito 1:2, con un valore di rimozione pari all' 87,8% (Figura 25).

Nel test 2 la velocità iniziale di sCOD, è minore durante i primi giorni (dal giorno 0 al giorno 4) e in quantità simile o maggiore dal giorno 4 al giorno 16 e al giorno 14, contrariamente al test precedente. Infatti nel fermentato diluito 1:1 viene rimosso il 58,7% e nel fermentato 1:5 il 30,2%. Questo potrebbe essere dovuto ad una maggiore contaminazione batterica in fermentato 1:5 e dall'elevata quantità batterica nel fermentato TQ.

Anche in queste sperimentazioni i risultati relativi alla rimozione di sCOD rientrano nel *range* (61-86%) rilevato in letteratura da Aslan & Kapdan, (2006).

Analogamente alla rimozione di carbonio, avviene anche il consumo di ammonio. La seguente figura (figura 27), rappresenta l'andamento del consumo di ammonio delle diverse condizioni:

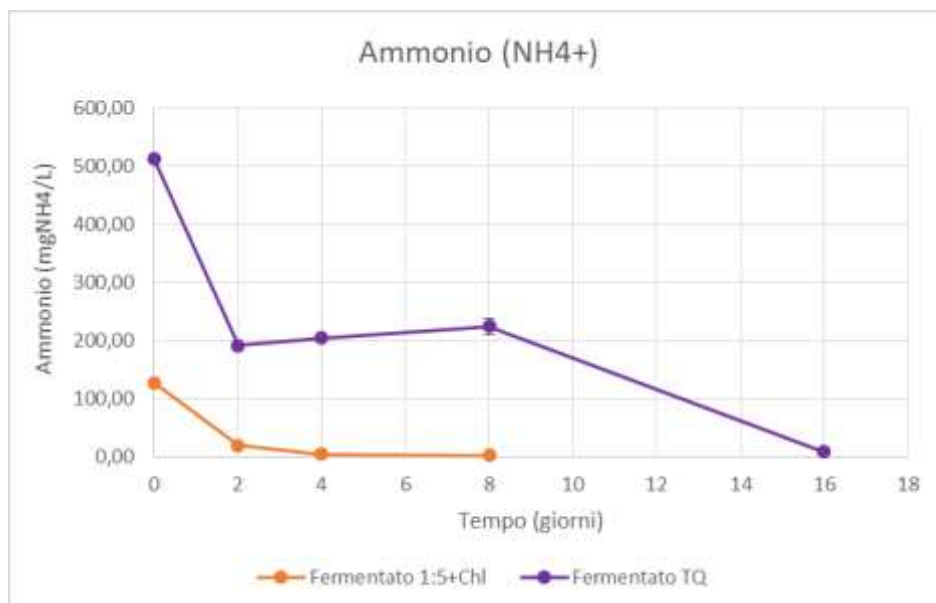


Figura 27. Efficienza di rimozione di ammonio con fotoperiodo 24:0.

Confrontando i valori ottenuti relativi al consumo di ammonio nel fermentato diluito 1:5 con *C.vulgaris* con i valori ottenuti nel precedente test, è osservabile che la percentuale di rimozione è simile, pari al 98,1% nel primo test e il 97,7% nel secondo test dopo 9 ed 8 giorni rispettivamente.

Quello che differenzia una condizione dall'altra è come varia il consumo di ammonio da parte di *C.vulgaris* durante le fasi di crescita e con il passare dei giorni. Nel fermentato TQ una buona parte di ammonio, pari al 62,7%, con una velocità di rimozione pari a $6,71 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ viene consumata tra il giorno 0 e il giorno 2. Questa rimozione è attribuibile ai batteri nitrificanti, dal momento che la crescita microalgale è risultata inibita fino al giorno 4. La rimozione dell'ammonio rimane costante fino al giorno 8, raggiungendo il 96,4% alla fine del test. Questa seconda fase di rimozione dell'ammonio è attribuibile all'intero consorzio, ivi compresa la componente microalgale, che entra in fase esponenziale al giorno 7. Il fermentato diluito 1:5, invece come nel test precedente la maggior parte di ammonio è stata consumata dal giorno 0 al giorno 2 con una velocità di rimozione pari a $2,24 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, con una percentuale di rimozione all'84,4% e dai giorni successivi la concentrazione è stata minima e costante.

Nel fermentato diluito 1:5 con *C.vulgaris*, caratterizzato da una concentrazione di ammonio al giorno 0 pari a $127,5 \pm 6,3 \text{ mgNH}_4^+ \text{ L}^{-1}$, la resa di rimozione massima ottenuta in 8 giorni è pari al 97,7%. Mentre il fermentato TQ che al giorno 0 è caratterizzato da una concentrazione di ammonio pari a $513,98 \pm 25 \text{ mgNH}_4^+ \text{ L}^{-1}$, presenta una massima efficienza di rimozione in 16 giorni pari a 98,4%, tenendo conto però che una parte è stata rimossa anche da batteri nitrificanti.

In tutte le condizioni testate, quindi, è stata osservata una prima fase di rimozione dell'ammonio corrispondente ai primi 2-3 giorni, probabilmente dovuta in buona parte a batteri nitrificanti, che hanno cinetiche di crescita maggiori rispetto alle microalghe. La seconda fase di rimozione individuata, di durata variabile, è invece attribuibile all'intero consorzio, probabilmente con una rimozione maggiore dovuta alla componente microalgale in piena fase esponenziale.

La seguente tabella 5 sintetizza i risultati ottenuti nel test 2 appena descritti, in cui un consorzio *C. vulgaris*-batteri è risultato idoneo alla crescita su fermentato.

Tabella 5. Risultati riassuntivi del test 2.

Test 2 Fotoperiodo 24:0	Unità di misura	Controllo-BG-11		Ferm 1:5+ <i>Chl.227</i>		Ferm TQ+ <i>Chl.227</i>	
		Media	Dev.st	Media	Dev.st	Media	Dev.st
Conta cellulare iniziale	mln cellule mL ⁻¹	9,14	±0,7	9,14	±0,7	9,14	±0,7
Peso secco iniziale	g L ⁻¹	0,22	±0,5	0,24	±0,2	0,32	±0,1
Conta cellulare finale	mln cellule mL ⁻¹	105,3	±3,1	64,8	±14	40,2	±7,9
Peso secco finale	g L ⁻¹	2,4	±0,2	1,8	±0,4	2,2	±0,7
Conta cellulare max	mln cellule mL ⁻¹	105,3	±3,1	132,7	±20	110,4	±2,2
Peso secco max	g L ⁻¹	2,4	±0,2	1,8	±0,4	3,6	±1,4
Contenuto lipidico	%	55,5	±6,0	28,1	±2,0	65,9	±6,0
Rimozione AGV	%			100		100	
Rimozione sCOD	%			65,7		83	
Rimozione N-NH ₄ ⁺	%			97,7		98,4	

Anche questo test conferma che *C. vulgaris* è in grado di crescere e riprodursi su fermentato diluito 1:1 (TQ o non diluito) a pH 8. La massima concentrazione di biomassa ottenuta è stata rilevata nel fermentato TQ con un valore pari a $3,6 \pm 1,4$ g L⁻¹. La massima quantità lipidica prodotta, è stata raggiunta nel fermentato TQ pari al $65,9 \pm 0,6\%$.

Valori interessanti relativi alla rimozione di sCOD e ammonio sono stati raggiunti. La rimozione di sCOD varia da un minimo di 65,7% ad un massimo di 83%, mentre l'ammonio da un minimo di 97,7% ad un massimo di 98,4%.

A seguire sono riportati i risultati ottenuti utilizzando fotoperiodo 12:12.

3.3 Fotoperiodo 12:12 con diluizione 1:2 (test 3)

Variando il fotoperiodo da 24:0 a 12:12 (12h luce/12h buio) i risultati ottenuti relativi alla crescita di *C. vulgaris* su fermentato 1:2 sono illustrati nella seguente figura (figura 28). In questo test è stato effettuato anche un controllo in autotrofia per valutare come viene influenzato dal fotoperiodo.

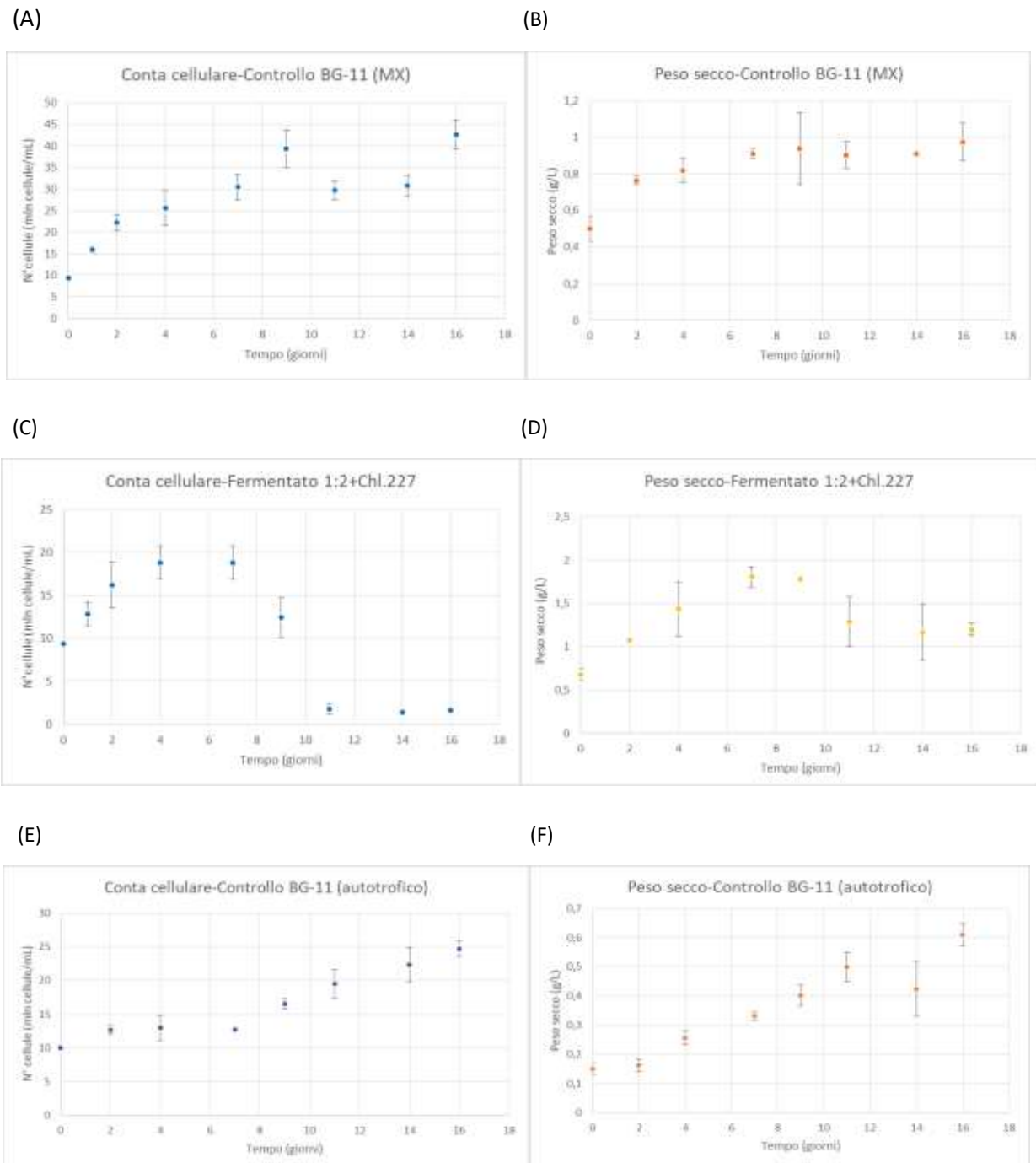


Figura 28. Conta cellulare (A, C ed E) e peso secco (B, D e F) alle diverse diluizioni.

Il controllo BG-11 MX a partire da una concentrazione di biomassa pari a $9,35 \text{ mln cellule mL}^{-1}$ e un peso secco di $0,5 \text{ g L}^{-1}$, al 16° giorno raggiunge una produttività di biomassa pari a $42,6 \pm 3,3 \text{ mln cellule mL}^{-1}$ figura 28 (A), con un peso secco finale pari a $0,97 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$ figura 28 (B), allo stato stazionario che equivale anche alla massima produttività raggiunta in questa condizione. Il controllo BG-11 in mixotrofia con fotoperiodo 12:12, rispetto al controllo BG-11 mixotrofico con fotoperiodo 24:0 (produttività pari a $84,1 \pm 7,1 \text{ mln cellule mL}^{-1}$), ha prodotto circa il 50% in meno di mln cellule mL^{-1} e questo indica che il fotoperiodo ha influenzato molto la crescita e la riproduzione della biomassa microalgale come afferma anche Singh et al. (2016).

Il controllo BG-11 in autotrofia invece, al giorno 0 presenta una concentrazione iniziale pari a $10 \text{ mln cellule mL}^{-1}$ con un peso secco pari a $0,15 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$. Al 16° giorno la produttività di biomassa è pari a $24,7 \pm 1,2 \text{ mln cellule mL}^{-1}$, con un peso secco di $0,6 \pm 0,0 \text{ g L}^{-1}$ e anche in questo caso è la massima concentrazione raggiunta.

Analogamente al controllo BG-11 in mixotrofia, anche il fermentato diluito 1:2 al giorno 0 ha concentrazione pari a $9,35 \text{ mln cellule mL}^{-1}$ e un peso secco di $0,68 \text{ g L}^{-1}$ ma al termine del test la concentrazione finale risulta pari a $1,6 \pm 0,3 \text{ mln cellule mL}^{-1}$ con un peso secco pari a $1,2 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$. La massima produttività di biomassa ottenuta invece è pari a $18,8 \pm 2,0 \text{ mln cellule mL}^{-1}$ con un peso secco di $0,6 \pm 0,0 \text{ g L}^{-1}$. Se la produttività al 17° giorno è così bassa, significa che nella coltura è avvenuto qualche processo che ha portato alla morte della biomassa. Per raggiungere questo punto si ipotizza che il fotoperiodo potrebbe aver stimolato l'attività batterica all'interno della coltura. Si ipotizza che la concentrazione di biomassa della condizione diluita 1:2 è alta, probabilmente essendo caratterizzata da un'alta concentrazione di fermentato, di conseguenza vi sia presente una maggiore quantità batterica che durante il ciclo di buio svolge maggiore attività (coltura non axenica), determinando un aumento del peso secco. L'unica spiegazione plausibile, dai risultati ottenuti è che durante le ore di buio, l'attività batterica, supera quella microalgale, aumentando la contaminazione batterica all'interno della coltura portando le microalghe a non riprodursi probabilmente a causa dell'elevata contaminazione.

Questi risultati ottenuti risultano opposti secondo la teoria di Jacob-Lopes et al. (2009) in quanto valutando la crescita di *C.vulgaris* utilizzando diversi fotoperiodi (24:0, 12:12, 0:24, 8:16 e 16:8) e dunque alternando il regime luce/buio, utilizzando il fotoperiodo 12:12 questo ceppo ha mostrato una maggiore produttività e densità cellulare massima.

Il tasso di crescita ottenuto nel presente test è illustrato nella seguente figura (figura 29):

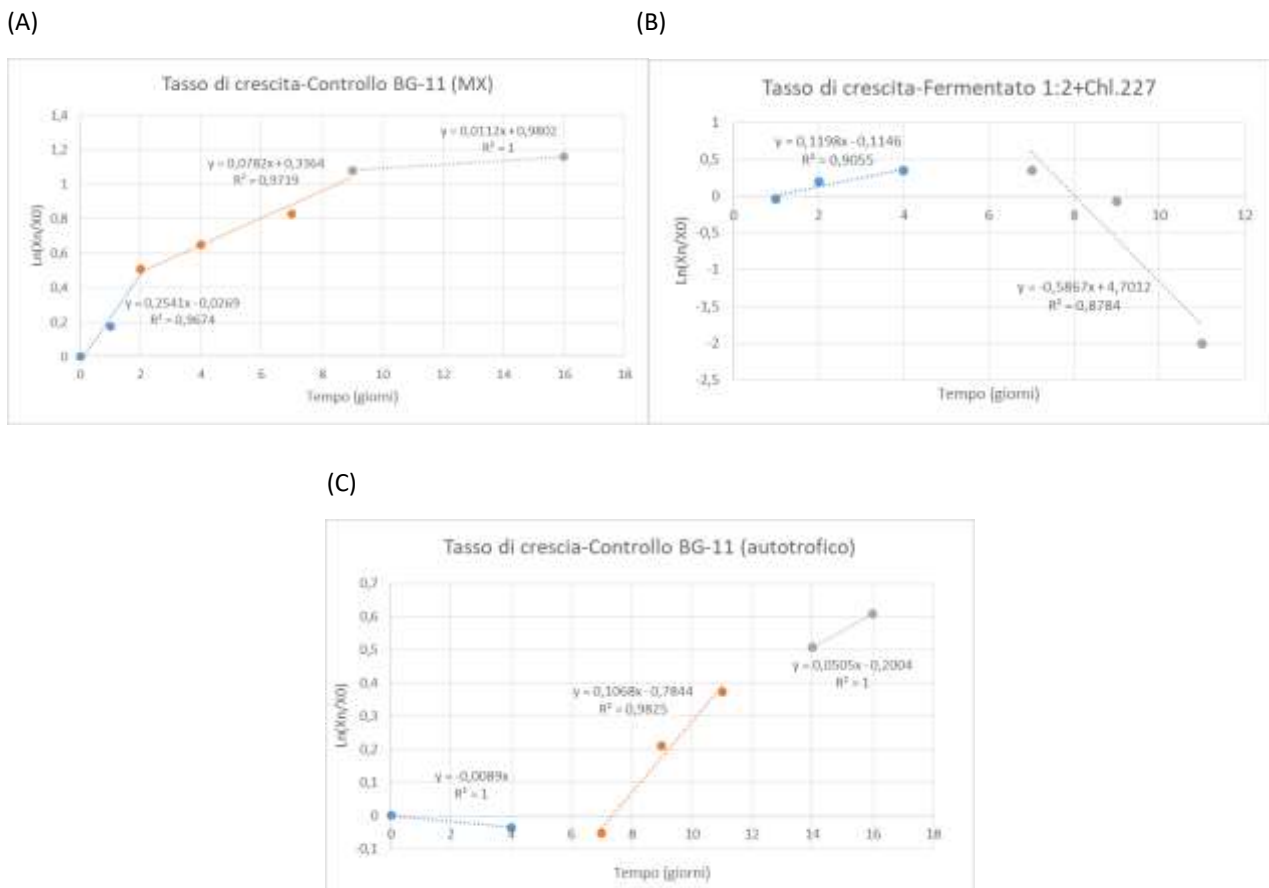


Figura 29. Tasso di crescita di *C. vulgaris* alle diverse diluizioni.

Nel controllo BG-11 MX dal giorno 0 al giorno 2 il tasso di crescita è pari a $0,25 \text{ d}^{-1}$ che è inferiore rispetto a quello ottenuto nel controllo BG-11 MX con 24:0 pari a $0,60 \text{ d}^{-1}$. Nei giorni successivi, dal giorno 2 al giorno 7, il tasso di crescita è inferiore rispetto ai primi giorni $0,07 \text{ d}^{-1}$ a causa del consumo di acetato (avvenuto al giorno 3), in cui inizia a dominare l'autotrofia per i motivi spiegati nel test 1 nel paragrafo relativo alle cinetiche di crescita. Dal giorno 7 al giorno 16 il tasso di crescita è pari a $0,011 \text{ d}^{-1}$, poichè la coltura raggiunge lo stato stazionario. Anche quest'ultimi valori sono inferiori rispetto al controllo BG-11 MX con fotoperiodo 24:0.

Nella condizione caratterizzata dal controllo BG-11 autotrofico la crescita è inibita durante i primi giorni, con un tasso di crescita pari a $-0,00 \text{ d}^{-1}$, che raggiunge $0,10 \text{ d}^{-1}$ in fase esponenziale.

Mentre nel fermentato diluito 1:2, dal giorno 0 al giorno 4, il tasso di crescita è pari a $0,11 \text{ d}^{-1}$ rispettivamente più basso rispetto ai primi giorni del fermentato 1:2 con fotoperiodo 24:0 ($0,48 \text{ d}^{-1}$). Un'altra importante differenza della stessa condizione è che durante il corso di questa sperimentazione nei giorni successivi il tasso di crescita risulta negativo $-0,58 \text{ d}^{-1}$. In questo caso però è chiaro che risulti molto diverso dalla stessa condizione utilizzata con 24:0 a causa del diverso andamento di crescita dovuto probabilmente alla presenza di contaminazione batterica.

(Khoeyi et al., 2012) afferma che il regime di luce ha avuto effetto sul numero di cellule finali e sulla produzione di biomassa di *Chlorella vulgaris* e che l'aumento della durata della luce determina l'aumento del tasso di crescita. I risultati ottenuti relativi alla cinetica di crescita sono coerenti con questa teoria. Infatti nel controllo BG-11 in mixotrofia il numero di cellule finali prodotte sono circa la metà rispetto alla concentrazione ottenuta utilizzando un fotoperiodo 24:0 e questo è strettamente legato al tasso di crescita. Infatti il tasso di crescita utilizzando fotoperiodo 12:12 è risultato inferiore anche durante i primi giorni nonostante vi sia la presenza di acetato.

Per valutare se il fotoperiodo influisce sul quantitativo lipidico prodotto è stata effettuata l'analisi dei lipidi prodotti da *Chlorella vulgaris* alle diverse diluizioni. Il quantitativo lipidico prodotto dal controllo BG-11 in mixotrofia utilizzando fotoperiodo 12:12, è pari al $52,5 \pm 0,91\%$. In termini di produttività lipidica nel controllo BG-11 (MX) la percentuale prodotta è simile al controllo BG-11 mixotrofico utilizzando fotoperiodo 24:0 (secondo test) pari a $55,5 \pm 6\%$ e $45,3 \pm 5,6\%$ (primo test). Anche la concentrazione di lipidi osservata nel controllo BG-11 in autotrofia è simile, con una concentrazione pari al $48,6 \pm 12,7\%$. Per la condizione caratterizzata da fermentato diluito 1:2 non è stata effettuata l'analisi del quantitativo lipidico.

Valutando e confrontando i risultati ottenuti dai controlli BG-11 in mixotrofia utilizzando fotoperiodo 24:0 e fotoperiodo 12:12 con i valori ottenuti in letteratura, i valori della quantità lipidica prodotta sono simili utilizzando diversi fotoperiodi. In letteratura però è stato dimostrato da Daliry et al. (2017) che il fotoperiodo dovrebbe influenzare la produttività lipidica, oltre alla crescita di biomassa e alla produzione di altri metaboliti come carboidrati e proteine. Nonostante siano stati utilizzati diversi fotoperiodi, i risultati ai diversi fotoperiodi dovrebbero essere diversi, non così simili, quindi non è coerente con questa teoria. (Singh et al., 2016) (Daliry et al., 2017).

Tuttavia, il quantitativo lipidico prodotto è anche correlato alla quantità di nutrienti (C/N) e azoto disponibili nel mezzo di coltura, infatti Richardson et al. (1969) afferma 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 limitante di azoto. L'accumulo di lipidi nelle cellule microalgali è correlato alla disponibilità di azoto nel mezzo di coltura. Anche Cho et al. (2015), afferma che l'aumento del contenuto lipidico in *Chlorella vulgaris* aumenta con la diminuzione dei nutrienti come azoto e fosforo, generando stress alle microalghe che di conseguenza come meccanismo di difesa favoriscono la produzione lipidica. In questo caso però la componente batterica potrebbe aver influito di più rispetto al fotoperiodo e alla quantità dei nutrienti. Comunque, questa teoria vale solo per le microalghe coltivate su fermentato. In questo caso, potrebbe aver influito anche la quantità di azoto perché dal giorno 4 al giorno 17 (figura 32), l'ammonio presente nella coltura è minimo ed essendo presente in minor quantità, potrebbe aver stimolato alle microalghe i processi per la produzione lipidica.

I seguenti grafici illustrati nella seguente figura (figura 30), rappresentano il consumo di AGV con fotoperiodo 12:12.

(A)

(B)

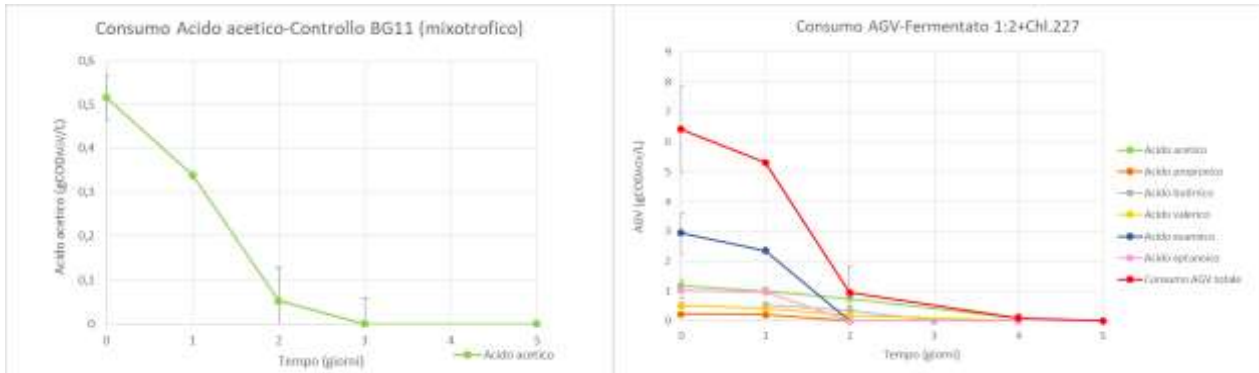


Figura 30. Consumo di AGV alle diverse diluizioni.

Il consumo degli AGV utilizzando il fotoperiodo 12:12 è diverso rispetto al consumo con fotoperiodo 24:0. Infatti nel controllo BG-11 mixotrofico il consumo totale di acetico da parte di *C.vugaris* avviene al terzo giorno figura 30 (A), anziché al secondo figura 20 (A). La velocità di rimozione di acetico nel controllo BG-11 (MX) tra il giorno 0 e il giorno 3 è pari a $7,16 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Anche il consumo degli AGV nel fermentato diluito 1:2, vengono consumati al 100% al 4° giorno anziché al terzo come nel fotoperiodo 24:0. Prendendo in considerazione l'acido acetico che è quello maggiormente utilizzato dalle microalghe in 1:2 (Cho et al., 2015) il consumo totale avviene al 4° giorno anziché al 1° con una velocità di rimozione pari a $11,17 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Utilizzando fotoperiodo 12:12 per la rimozione totale di acetico è stato necessario il triplo del tempo nel fermentato 1:2. Diversamente invece è il consumo di altri AGV come il propionico, eptanoico ed esanoico che vengono consumati al 100% al secondo giorno, principalmente dai batteri, soprattutto durante le ore di buio che svolgono maggiore attività. È probabile che anche il consumo di butirrato sia dovuto alla componente batterica, in quanto la letteratura riporta un andamento diauxico nel consumo di acetato e butirrato da parte delle microalghe, in cui il consumo del butirrato inizia solo dopo l'esaurimento dell'acetato (Turon et al., 2016). L'acetato quindi ha probabilmente sostenuto la crescita microalgale fino al giorno 4, dopo il quale le colture sono morte. Da questo è possibile dedurre che il variare del fotoperiodo influisca sul consumo di acido acetico e AGV da parte delle microalghe, rallentando la crescita della biomassa microalgale e di conseguenza il consumo di AGV.

Da questi risultati è possibile dedurre che il fotoperiodo influenza *Chlorella vulgaris* ma anche la componente batterica rispetto al consumo di AGV.

Le microalghe in mixotrofia assimilano il carbonio organico ed inorganico per le funzioni metaboliche, portando di conseguenza alla depurazione del refluo.

E' stata valutata l'efficienza di rimozione di sCOD nel fermentato diluito 1:2 per valutare l'andamento della resa di rimozione di sCOD e se il fotoperiodo influisca sulla rimozione di sCOD, ottenendo i seguenti risultati illustrati nella seguente figura (figura 31):

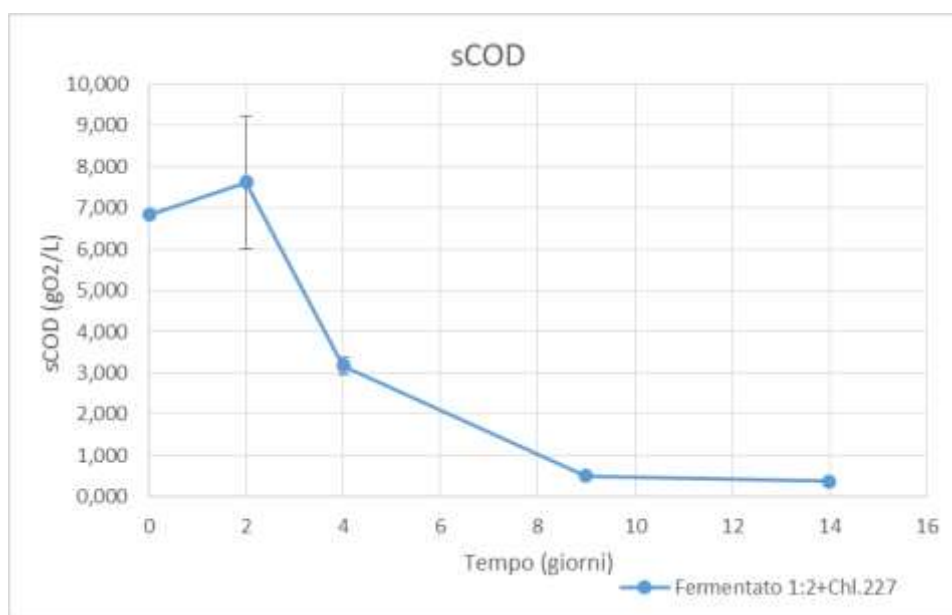


Figura 31. Efficienza di rimozione di sCOD con fotoperiodo 12:12.

Valutando l'andamento di consumo, come illustrato nella figura (figura 31) dal giorno 0 al giorno 2, sembrerebbe esserci stato un aumento del contenuto di sCOD, probabilmente a causa della produzione di esopolisaccaridi prodotti dalle microalghe, che avviene soprattutto in presenza di batteri. Questo è attendibile in quanto l'attività batterica è maggiore rispetto a quella microalgale durante le ore di buio. L'sCOD, inizia ad essere rimosso dal secondo giorno, probabilmente perché *C.vulgaris* si è adattata all'alternanza del regime luce/buio e alla maggior attività batterica, assimilando durante le ore di buio come fonte di carbonio l'sCOD (Amini et al., 2020). La percentuale di rimozione dal giorno 2 al giorno 4 è pari al 58,3%, poiché le microalghe degradano anche il carbonio proveniente dagli AGV, che vengono del tutto consumati al giorno 4 figura 30 (B). Dal giorno 4 al giorno 9 che gli AGV sono stati degradati, la percentuale di rimozione è pari all'83,9%, poiché viene degradato principalmente il carbonio organico (sCOD), mentre dal giorno 9 al giorno

14 la percentuale di rimozione è minima ed è dovuta ad altri microrganismi. La rimozione finale osservata è pari al 94.4%, con una concentrazione finale pari a $0,381 \pm 0,07 \text{ gO}_2 \text{ L}^{-1}$. Dato l'andamento della coltura, ai fini del confronto tra i fotoperiodi è stata considerata la rimozione dell'sCOD misurata al giorno 9.

Questo risultato coincide con i risultati ottenuti da (Amini et al., 2020) che ha coltivato su fotobioreattori (PBR), un sistema di microalghe-batteri in semicontinuo con un tempo di ritenzione idraulica (HRT) di 7 giorni. *Chlorella vulgaris* e fanghi attivi sono usati come inoculo microalghe-batteri nei seguenti rapporti 5:1, 1:1 e 1:5 utilizzando un fotoperiodo di 12:12. Per tutte e tre le condizioni la rimozione di sCOD è stata superiore al 93% in quanto durante le ore di buio le microalghe utilizzano il COD come fonte di carbonio.

Contrariamente, invece, secondo Aslan & Kapdan, (2006) affermano che con un fotoperiodo 12:12 in la percentuale di rimozione di sCOD, in mixotrofia può variare da un minimo di 61% ad un massimo di 86%. Considerando quest'ultima teoria è discorde dalla percentuale di rimozione ottenuta nel test.

Quindi, confrontando i risultati ottenuti, con la letteratura, sembrerebbe che il fotoperiodo 12:12 presenta rese migliori in termini di rimozione di sCOD, utilizzando *Chlorella vulgaris*.

La variazione della concentrazione di ammonio è rappresentata nella seguente figura (figura 32):

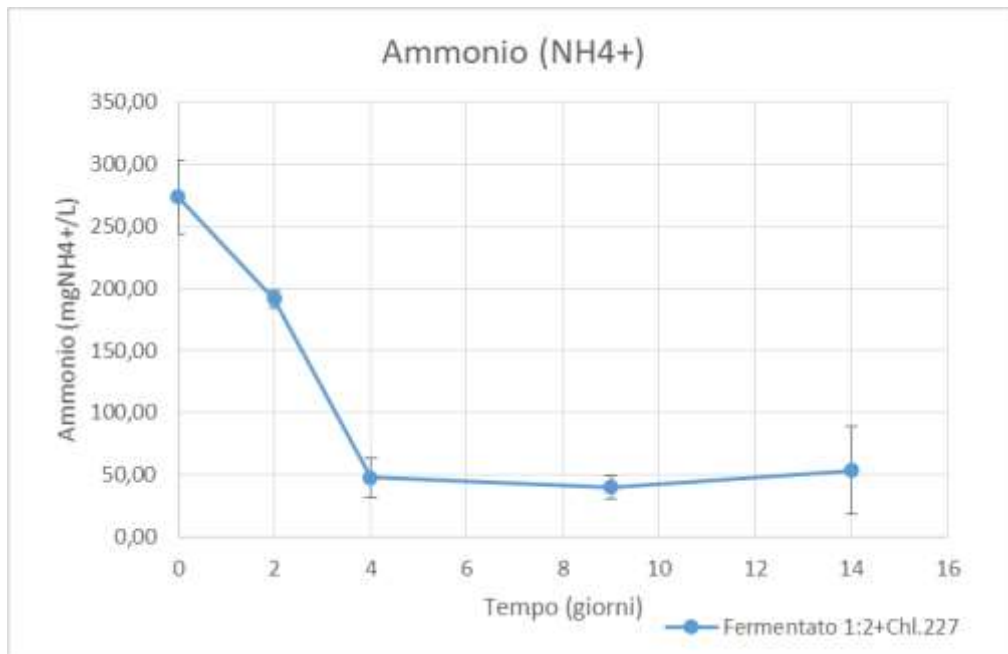


Figura 32. Efficienza di rimozione di ammonio con fotoperiodo 12:12.

La rimozione dell'ammonio è avvenuta principalmente nei primi 4 giorni ed è risultata pari all'82,4 % con una velocità di rimozione pari a $2,34 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ grazie all'azione della coltura caratterizzata dal consorzio microalghe-batteri. Una ulteriore lieve diminuzione della concentrazione di ammonio è stata osservata dal giorno 4 al giorno 9 a causa della morte della coltura microalgale e dunque la rimozione di ammonio in questi giorni è opera di altri microrganismi. Comunque dal giorno 0 al giorno 14 la resa massima e totale di ammonio è pari all'80,3%.

Confrontando questo valore con il valore ottenuto nella rimozione di ammonio con fermentato diluito 1:2 nel fotoperiodo 24:0 (pari al 92,8%), risulta minore in termini di resa di rimozione. Questa differenza di rimozione è influenzata chiaramente dal fotoperiodo utilizzato, come è stato verificato anche per l'sCOD (Amini et al., 2020), in quanto l'alternanza del regime luce/buio influisce sull'assimilazione di nutrienti e il metabolismo delle microalghe.

Questi risultati ottenuti non coincidono con quelli ottenuti da Cho et al. (2015) che coltivando *Chlorella vulgaris* su effluenti a diverse diluizioni, utilizzando fotoperiodo 12:12, i tassi di rimozione di azoto erano compresi tra il 19,77-31,83% che risultavano relativamente inferiori rispetto ad altri studi, in quanto mediamente i tassi di rimozione di ammonio nelle acque reflue urbane varia tra il 74,7-82,4%. Aslan & Kapdan, (2006) invece, afferma che il *range* di rimozione di azoto varia dal 45-

97% e il valore ottenuto rientra all'interno di questo *range*, utilizzando anche questo fotoperiodo, nonostante la percentuale di rimozione risulti inferiore rispetto a fotoperiodo 24:0.

In questo caso è possibile dedurre che il fotoperiodo influisca negativamente sulla quantità di rimozione di ammonio, in quanto porta ad una minore rimozione di quest'ultimo. Quindi se l'obiettivo è quello di rimuovere una maggior quantità di ammonio utilizzando questa diluizione è più conveniente e consigliabile utilizzare un fotoperiodo di 24:0.

La seguente tabella (tabella 6) sintetizza i risultati ottenuti nel test 3 appena descritti.

Tabella 6. Risultati riassuntivi del test 3.

Test 3 Fotoperiodo 12:12	Unità di misura	Ctrl.BG-11 (MX)		Ferm 1:2+ <i>Chl.227</i>		Ctrl.BG-11 (Aut)	
		Media	Dev.st	Media	Dev.st	Media	Dev.st
Conta cellulare iniziale	mln cellule mL ⁻¹	9,35	±0,2	9,35	±0,2	10	±0,5
Peso secco iniziale	g L ⁻¹	0,50	±0,0	0,68	±0,2	0,15	±0,1
Conta cellulare finale	mln cellule mL ⁻¹	42,6	±3,3	1,6	±0,3	24,7	±1,2
Peso secco finale	g L ⁻¹	0,98	±0,1	1,2	±0,0	0,61	±0,0
Conta cellulare max	mln cellule mL ⁻¹	42,6	±3,3	18,8	±2,0	24,7	±1,2
Peso secco max	g L ⁻¹	0,98	±0,1	1,8	±0,1	0,61	±0,0
Contenuto lipidico	%	52,5	±0,9			48,6	±12
Rimozione AGV	%			100			
Rimozione sCOD	%			94,4			
Rimozione N-NH ₄ ⁺	%			80,3			

Come mostrato nella figura (figura 30) gli AGV vengono rimossi al 100% al 4° giorno. La massima concentrazione di biomassa ottenuta è pari a $1,8 \pm 0,1$ g L⁻¹ nel fermentato 1:2 a pH 8. Per quanto riguarda la produttività lipidica, gli unici dati ottenibili sono stati quelli relativi al BG-11 MX pari al $52,5 \pm 0,9\%$ e al controllo BG-11 in autotrofia pari a $48,6 \pm 12,7\%$. Comunque, la percentuale di lipidi riscontrata nella biomassa (>38%) la rende adatta per la produzione di biocarburanti (es. biodiesel) come definito da Singh et al. (2016).

Risultati interessanti sono relativi alla resa di rimozione di sCOD e ammonio. Il fermentato 1:2 presenta un'efficienza di rimozione di sCOD pari a 94,4% e dell'80,3% di ammonio. Confrontando la rimozione di sCOD e ammonio ai due diversi fotoperiodi, è possibile dedurre che con fotoperiodo 24:0 è stata rimossa una maggior quantità di ammonio, mentre il fotoperiodo 12:12 sembrerebbe più efficiente nella rimozione di sCOD.

Considerazioni finali

Riassumendo i valori ottenuti, valutando i controlli BG-11 (MX) ai diversi fotoperiodi è possibile dedurre che utilizzando un fotoperiodo 12:12 le microalghe possono crescere e riprodursi ma in quantità minore rispetto al fotoperiodo 24:0, in quanto il fotoperiodo influenza la crescita. Infatti il BG-11 (MX), con fotoperiodo 12:12 produce il 50 % in meno di biomassa rispetto a fotoperiodo 24:0.

Allo stesso modo, anche la quantità di nutrienti influisce sulla produttività di biomassa, in quanto, una concentrazione maggiore di nutrienti risultano meno tollerabili dalla coltura che a sua volta attiva meccanismi di difesa contro i fattori di stress, producendo metaboliti secondari ad alto valore aggiunto (es. lipidi), aumentando di conseguenza il peso secco, come osservato nel fermentato TQ. Inoltre un altro importante fattore che ha determinato un aumento del peso secco è l'aumento di batteri presente all'interno della coltura. La presenza di batteri però in alcune condizioni (es. fermentato 1:2 con fotoperiodo 12:12), potrebbe generare non solo un aumento di peso secco ma anche il decadimento della coltura.

La letteratura dimostra che il fotoperiodo ha effetto sul quantitativo lipidico prodotto ma in questo caso il fattore che sembrerebbe aver influito di più sul quantitativo lipidico prodotto è la concentrazione del substrato utilizzato in termini di AGV e ammonio, insieme alla componente batterica introdotta, come osservato nel fermentato TQ che presenta una quantità lipidica pari a $65,9 \pm 6,0$ % (tabella 7). La carenza di ammonio negli ultimi giorni dei test, dovuta alla sua rimozione da parte del consorzio, potrebbe avere in parte determinato l'accumulo dei lipidi osservato, in accordo con la letteratura secondo cui lo stoccaggio di lipidi è indotto dalla carenza di azoto (Salbitani & Carfagna, 2021). La percentuale di lipidi riscontrata nella biomassa (>38%) la rende adatta per la produzione di biocarburanti (es. biodiesel) come definito da Singh et al. (2016).

Per quanto riguarda la rimozione di AGV, avviene al 100 % in tutte le condizioni e a diversi fotoperiodi. La velocità di rimozione dipende dal fotoperiodo e dalla diluizione utilizzata, in quanto sia il fotoperiodo che la quantità di nutrienti influiscono sull'assimilazione di AGV da parte delle microalghe.

Confrontando invece la resa di sCOD e ammonio, è possibile dedurre che il fotoperiodo influisca sul consumo di questi ultimi. Infatti utilizzando fotoperiodo 12:12 la percentuale di rimozione di sCOD è maggiore rispetto a quella ottenuta con fotoperiodo 24:0, probabilmente perchè durante le ore di buio le microalghe utilizzano sCOD come fonte di carbonio che di conseguenza viene

maggiormente consumato (Amini et al., 2020). La rimozione di ammonio invece, risulta migliore con fotoperiodo 24:0. Anche in questo caso la velocità di rimozione dipende dal fotoperiodo e dalla diluizione utilizzata (tabella 7).

La seguente tabella (tabella 7), illustra e riassume i principali valori ottenuti nei tre test:

Tabella 7. Riassunto dati.

Tabella riassuntiva dei dati					
Dati	Unità di misura	1:1 (24:0)	1:2 (24:0)	1:2 (12:12)	1:5 (24:0) test 1
Conta cellulare finale	mln cellule mL ⁻¹	40,2±7,9	74,4±3,5	1,6±0,3	92,9±4,5
Peso secco finale	g L ⁻¹	2,2±0,7	1,7±0,4	1,6±0,3	1,6±0,2
Tasso di crescita (μ)	d ⁻¹	–	0,20	0,11	0,21
Contenuto lipidico	%	65,9±6,0	56,5±4,8	–	46,2±28
Velocità di rimozione di AGV	gCOD L ⁻¹ d ⁻¹	12,87	2,61	1,60	1,04
Velocità di rimozione di sCOD	mgO ₂ L ⁻¹ d ⁻¹	514,1	479,7	457,1	149,3
Velocità di rimozione di N-NH ₄ ⁺	mgNH ₄ ⁺ L ⁻¹ d ⁻¹	31,59	17,42	15,66	7,36
Rimozione AGV	%	100	100	100	100
Rimozione sCOD	%	83	87,8	94,4	68,4
Rimozione N-NH ₄ ⁺	%	98,4	92,8	80,3	98,1
Conc. finale AGV	gCODAGV L ⁻¹	0	0	0	0
Conc. finale di sCOD	gO ₂ L ⁻¹	1,6±0,1	1,1±1,3	0,3±0,0	1,1±0,5
Conc. finale di N-NH ₄ ⁺	mgNH ₄ ⁺ L ⁻¹	8,09±2,3	22,7±1,7	53,8±35	2,31±0,3

Le concentrazioni finali ottenute di azoto ammoniacale e sCOD, perché risultino idonee perché un refluo venga considerato depurato dovrebbero rispettare i limiti, posti dalla legge per lo scarico dagli impianti di depurazione delle acque reflue depurate presenti nel D.lgs. 152/2006. Il decreto afferma che la concentrazione limite accettabile di sCOD allo scarico deve essere $\leq 125 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, associato ad una percentuale di rimozione pari al 75% se l'impianto ha una potenzialità da 2.000-10.000 e >10.000 abitanti equivalenti (AE). La potenzialità di un impianto di depurazione, viene espressa in AE. L'abitante equivalente (AE) è una misura del carico organico in ingresso ad un impianto di depurazione delle acque. Un abitante equivalente è convenzionalmente definito come la quantità

di carico organico biodegradabile avente una richiesta biochimica di ossigeno a 5 giorni (BOD₅), pari a 60 g di ossigeno al giorno (D.lgs. 152/2006).

Per quanto riguarda la rimozione di azoto totale, la concentrazione accettabile per un impianto con potenzialità 10.000-100.000 (AE) deve essere $\leq 15 \text{ mg L}^{-1}$, associata ad una percentuale di riduzione dal 70-80%, mentre per gli impianti > 100.000 (AE) deve essere $\leq 10 \text{ mg L}^{-1}$, associata ad una percentuale di riduzione dal 70-80% (D.lgs.152/2006). Affinchè l'acqua in uscita dallo scarico risulti depurata entrambi i requisiti (% di rimozione e concentrazione soglia), devono essere rispettati.

I valori ottenuti nei test per quanto riguarda la rimozione di ammonio, presentano delle percentuali di rimozione che variano da un minimo di 80,3% ad un massimo di 98,4% (tabella 7), perciò, sembrerebbe che *C. vulgaris* abbia una buona capacità fitodepurativa ma per determinare se il refluo è considerato depurato e che la concentrazione di azoto risulti inferiore o uguale ai limiti posti dalla legislazione bisognerebbe analizzare anche i nitriti ed i nitrati, in quanto, l'azoto totale è caratterizzato dall'azoto organico, azoto ammoniacale, azoto nitrico e nitroso. In questa sperimentazione non è stato però possibile analizzarli ad eccezione dell'azoto ammoniacale (N-NH₄⁺).

E' fondamentale valutare anche la rimozione di sCOD. I test presentano una resa di rimozione che varia da un minimo di 65,7% ad un massimo di 94,4%, inoltre le concentrazioni al giorno di chiusura dei test (dopo 16 e 17 giorni) risultano $> 0,125 \text{ gO}_2 \text{ L}^{-1}$, ciò significa che non verrebbero rispettati entrambi gli standard di legge perciò il processo non risulta del tutto idoneo per la rimozione di sCOD, infatti per diminuire le concentrazioni finali perché rientrano nelle concentrazioni poste dai limiti di legge dovrebbe essere applicata un'ottimizzazione del processo.

In futuro si potrebbe proporre delle nuove sperimentazioni utilizzando le stesse condizioni e diluizioni, utilizzando diversi fotoperiodi come ad esempio; 8:16 e 16:8 per valutare come varia l'andamento di crescita, la produzione di lipidi e la capacità fitodepurativa di questo ceppo.

4. Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi è stata valutata la crescita di *Chlorella vulgaris* NIES-227, utilizzando come substrato di crescita del fermentato non sterilizzato proveniente da scarti vegetali e fanghi di depurazione a diverse diluizioni, al fine di valutare come l'alternanza del regime luce/buio (fotoperiodo) e la concentrazione di substrato influenzano la crescita microalgale, l'accumulo di lipidi, il consumo di AGV e la rimozione di ammonio e sCOD.

Applicando un fotoperiodo di 24:0 è stato verificato che *Chlorella vulgaris* NIES-227 è in grado di crescere e riprodursi utilizzando come substrato le risorse di scarto a diverse diluizioni. Il fermentato tal quale è la condizione che ha presentato la maggiore produzione di biomassa, pari a $3,6 \pm 1,4 \text{ g L}^{-1}$, e la maggiore percentuale di lipidi, pari al $65,9 \pm 6,4\%$. Con un fotoperiodo di 12:12, invece, la crescita di *C.vulgaris* su fermentato non sterilizzato diluito 1:2 è stata osservata solo fino al giorno 7, a partire dal quale lo sviluppo di microrganismi hanno prevalso sulla coltura. Dunque, le sperimentazioni attuate, hanno portato alla conclusione che per ottenere una maggior concentrazione di biomassa e produzione lipidica è consigliabile utilizzare la coltivazione di *C.vulgaris* su fermentato TQ applicando un fotoperiodo 24:0 dato che è la condizione sottoposta ad un maggiori fattori di stress. La rimozione di AGV avviene al 100% utilizzando entrambi i fotoperiodi.

Per quanto riguarda la rimozione di sCOD e l'utilizzo di *C.vulgaris* studiata per la fitodepurazione, i dati ottenuti applicando un fotoperiodo di 12:12 hanno mostrato una maggiore resa di rimozione di sCOD, pari al 94,4%, superiore a quella riscontrata applicando un fotoperiodo 24:0. Valori interessanti sono stati ottenuti anche per l'efficienza di rimozione di ammonio (NH_4^+), dove contrariamente all'sCOD, per ottenere una maggior efficienza di rimozione di ammonio, maggiore del 90% è consigliabile utilizzare un fotoperiodo di 24:0. Questi risultati ottenuti sono confrontabili con quelli presenti in letteratura, ottenuti da Amini et al., (2020) Aslan & Kapdan,(2006) Cho et al., (2015).

Perciò, valutando l'esito delle analisi è possibile dire che, il variare del fotoperiodo è una condizione fondamentale, in quanto, come dimostrato nei test influenza la cinetica e produttività di crescita microalgale, la produttività lipidica (probabilmente in piccola parte), la degradazione degli AGV, la rimozione ammonio e sCOD .

In conclusione, valutando i risultati ottenuti, è possibile dire *Chlorella vulgaris* NIES-227 è un ceppo che può essere utilizzato a doppio scopo: coltivazione su effluenti a scopo fitodepurativo per la

rimozione di nutrienti come carbonio, azoto, fosforo ma anche di sCOD e con l'obiettivo di produrre metaboliti ad alto valore aggiunto per produrre prodotti secondari come ad esempio i biocarburanti in modo più sostenibile (Cho et al., 2015).

Bibliografia

- Alam, F., Mobin, S., & Chowdhury, H. (2015). Third generation biofuel from Algae. *Procedia Engineering*, 105(Ictc 2014), 763–768. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.05.068>
- Amini, E., Babaei, A., Mehrnia, M. R., Shayegan, J., & Safdari, M. S. (2020). Municipal wastewater treatment by semi-continuous and membrane algal-bacterial photo-bioreactors. *Journal of Water Process Engineering*, 36(March), 101274. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101274>
- Anukam, A., Mohammadi, A., Naqvi, M., & Granström, K. (2019). Methods of accelerating and optimizing process efficiency. *Processes*, 7(8), 1–19.
- Aslan, S., & Kapdan, I. K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.04.003>
- Atta, M., Idris, A., Bukhari, A., & Wahidin, S. (2013). Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 148, 373–378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.162>
- Bastidas-Oyanedel, J. R., Bonk, F., Thomsen, M. H., & Schmidt, J. E. (2015). Dark fermentation biorefinery in the present and future (bio)chemical industry. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 14(3), 473–498. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9369-3>
- Bhatnagar, A., Bhatnagar, M., Chinnasamy, S., & Das, K. C. (2010). *Chlorella minutissima* - A promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161(1–8), 523–536. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8771-0>
- Cavinato, C., Bolzonella, D., Fatone, F., Cecchi, F., & Pavan, P. (2011). Optimization of two-phase thermophilic anaerobic digestion of biowaste for hydrogen and methane production through reject water recirculation. *Bioresource Technology*, 102(18), 8605–8611. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.084>
- Chalima, A., Oliver, L., De Castro, L. F., Karnaouri, A., Dietrich, T., & Topakas, E. (2017). Utilization of volatile fatty acids from microalgae for the production of high added value compounds. *Fermentation*, 3(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040054>
- Chandra, R., Arora, S., Rohit, M. V., & Venkata Mohan, S. (2015). Lipid metabolism in response to individual short chain fatty acids during mixotrophic mode of microalgal cultivation: Influence

on biodiesel saturation and protein profile. *Bioresource Technology*, 188, 169–176.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.088>

Chen, C. Y., Zhao, X. Q., Yen, H. W., Ho, S. H., Cheng, C. L., Lee, D. J., Bai, F. W., & Chang, J. S. (2013). Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.006>

Cho, H. U., Kim, Y. M., Choi, Y. N., Xu, X., Shin, D. Y., & Park, J. M. (2015). Effects of pH control and concentration on microbial oil production from *Chlorella vulgaris* cultivated in the effluent of a low-cost organic waste fermentation system producing volatile fatty acids. *Bioresource Technology*, 184, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.069>

Chuka-ogwude, D., Ogbonna, J., & Moheimani, N. R. (2020). A review on microalgal culture to treat anaerobic digestate food waste effluent. *Algal Research*, 47(August 2019), 101841. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101841>

Daliry, S., Hallajisani, A., Mohammadi Roshandeh, J., Nouri, H., & Golzary, A. (2017). Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 3(2), 217–230. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2017.03.02.010>

Di Caprio, F., Altimari, P., & Pagnanelli, F. (2019). New strategies enhancing feasibility of microalgal cultivations. *Studies in Surface Science and Catalysis*, 179, 287–316. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64337-7.00016-1>

Fei et.al., 2015. (2015). *MIT Open Access Articles Lipid production by microalgae Chlorella protothecoides with volatile fatty acids (VFAs) as carbon sources in.* 0–27.

Fu, W., Gudmundsson, O., Feist, A. M., Herjolfsson, G., Brynjolfsson, S., & Palsson, B. (2012). Maximizing biomass productivity and cell density of *Chlorella vulgaris* by using light-emitting diode-based photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 161(3), 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.004>

Gavala, H. N., Angelidaki, I., & Ahring, B. K. (2003). Kinetics and modeling of anaerobic digestion process. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 81, 57–93. https://doi.org/10.1007/3-540-45839-5_3

Hillebrand, H., & Sommer, U. (1999). The nutrient stoichiometry of benthic microalgal growth: Redfield proportions are optimal. *Limnology and Oceanography*, 44(2), 440–446.

<https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.2.0440>

- Jacob-Lopes, E., Scoparo, C. H. G., Lacerda, L. M. C. F., & Franco, T. T. (2009). Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(1), 306–310. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2008.04.007>
- Jiang, L., Fu, H., Yang, H. K., Xu, W., Wang, J., & Yang, S. T. (2018). Butyric acid: Applications and recent advances in its bioproduction. In *Biotechnology Advances* (Vol. 36, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.005>
- Khoeyi, Z. A., Seyfabadi, J., & Ramezanzpour, Z. (2012). Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*, 20(1), 41–49. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9440-1>
- Krzemińska, I., Pawlik-Skowrońska, B., Trzcńska, M., & Tys, J. (2014). Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(4), 735–741. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1044-x>
- Krzysztof Ziemiński. (2012). Methane fermentation process as anaerobic digestion of biomass: Transformations, stages and microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, 11(18), 4127–4139. <https://doi.org/10.5897/ajbx11.054>
- Lacroux, J., Trably, E., Bernet, N., Steyer, J. P., & van Lis, R. (2020). Mixotrophic growth of microalgae on volatile fatty acids is determined by their undissociated form. *Algal Research*, 47(October 2019), 101870. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101870>
- Lanfranchi, A., Tassinato, G., Valentino, F., Martinez, G. A., Jones, E., Gioia, C., Bertin, L., & Cavinato, C. (2022). Hydrodynamic cavitation pre-treatment of urban waste: Integration with acidogenic fermentation, PHAs synthesis and anaerobic digestion processes. *Chemosphere*, 301(December 2021), 134624. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134624>
- Leong, W. H., Saman, N. A. M., Kiatkittipong, W., Assabumrungrat, S., Najdanovic-Visak, V., Wang, J., Khoo, K. S., Lam, M. K., Mohamad, M., & Lim, J. W. (2022). Photoperiod-induced mixotrophic metabolism in *Chlorella vulgaris* for high biomass and lipid to biodiesel productions using municipal wastewater medium. *Fuel*, 313(December 2021), 123052. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.123052>

- Li, C., Yu, Y., Zhang, D., Liu, J., Ren, N., & Feng, Y. (2016). Combined effects of carbon, phosphorus and nitrogen on lipid accumulation of *Chlorella vulgaris* in mixotrophic culture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *91*(3), 680–684. <https://doi.org/10.1002/jctb.4623>
- Liew, W. H., Hassim, M. H., & Ng, D. K. S. (2014). Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production. *Journal of Cleaner Production*, *71*, 11–29. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.01.006>
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2021). Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition. *Biology*, *10*(10), 1–24. <https://doi.org/10.3390/biology10101060>
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(1), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Md. Shamim Parvez, M. A., 1, Rahman *, F. M. Y., 1, 2 1, 3, & A. (2018). *On line On line Cop.* *39*(September), 747–753.
- Naresh Kumar, A., Sarkar, O., Chandrasekhar, K., Raj, T., Narisetty, V., Mohan, S. V., Pandey, A., Varjani, S., Kumar, S., Sharma, P., Jeon, B. H., Jang, M., & Kim, S. H. (2022). Upgrading the value of anaerobic fermentation via renewable chemicals production: A sustainable integration for circular bioeconomy. *Science of the Total Environment*, *806*, 150312. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150312>
- Náthia-Neves, G., Berni, M., Dragone, G., Mussatto, S. I., & Forster-Carneiro, T. (2018). Anaerobic digestion process: technological aspects and recent developments. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *15*(9), 2033–2046. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1682-2>
- Ren, L. J., Sun, X. M., Ji, X. J., Chen, S. L., Guo, D. S., & Huang, H. (2017). Enhancement of docosahexaenoic acid synthesis by manipulation of antioxidant capacity and prevention of oxidative damage in *Schizochytrium* sp. *Bioresource Technology*, *223*(30), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.040>
- Richardson, B., Orcutt, D. M., Schwertner, H. A., Martinez, C. L., & Wickline, H. E. (1969). Effects of Nitrogen Limitation on the Growth and Composition of Unicellular Algae in Continuous Culture.

Applied Microbiology, 18(2), 245–250. <https://doi.org/10.1128/am.18.2.245-250.1969>

Rippka et al.1979. (2011). *Leb 114 Isoladas De Lagoas De Tratamento De*. 1–7.

Sakthivel, R., Ramesh, K., Purnachandran, R., & Mohamed Shameer, P. (2018). A review on the properties, performance and emission aspects of the third generation biodiesels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82(5), 2970–2992. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.10.037>

Salbitani, G., & Carfagna, S. (2021). Ammonium utilization in microalgae: A sustainable method for wastewater treatment. *Sustainability (Switzerland)*, 13(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/su13020956>

Schulze, P. S. C., Barreira, L. A., Pereira, H. G. C., Perales, J. A., & Varela, J. C. S. (2014). Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in Biotechnology*, 32(8), 422–430. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.06.001>

Shen, X. F., Qin, Q. W., Yan, S. K., Huang, J. Le, Liu, K., & Zhou, S. B. (2019). Biodiesel production from *Chlorella vulgaris* under nitrogen starvation in autotrophic, heterotrophic, and mixotrophic cultures. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1589–1596. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01765-1>

Silaban, A., Bai, R., Gutierrez-Wing, M. T., Negulescu, I. I., & Rusch, K. A. (2014). Effect of organic carbon, C: N ratio and light on the growth and lipid productivity of microalgae/cyanobacteria coculture. *Engineering in Life Sciences*, 14(1), 47–56. <https://doi.org/10.1002/elsc.201200219>

Singh, P., Kumari, S., Guldhe, A., Misra, R., Rawat, I., & Bux, F. (2016). Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55(November), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.001>

Soto-Sierra, L., Stoykova, P., & Nikolov, Z. L. (2018). Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Research*, 36(June), 175–192. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.023>

Strazzer, G., Battista, F., Garcia, N. H., Frison, N., & Bolzonella, D. (2018). Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review. *Journal of Environmental Management*, 226(August), 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.039>

- Tikoo, V., Shales, S. W., & Scragg, A. H. (1996). Effect of pentachlorophenol on the growth of microalgae. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 17(10), 1139–1144. <https://doi.org/10.1080/09593331708616483>
- Turon, V., Trably, E., Fouilland, E., & Steyer, J. P. (2016). Potentialities of dark fermentation effluents as substrates for microalgae growth: A review. *Process Biochemistry*, 51(11), 1843–1854. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.018>
- Uffenorde, & Much. (1918). Eine kriegsepidemiologische Beobachtung. I. Klinischer Teil. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 44(3), 57–59. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1134195>
- Willey et., al 2013. (n.d.). *Microbial growth physiology*.
- Yates, G. T., & Smotzer, T. (2007). On the lag phase and initial decline of microbial growth curves. *Journal of Theoretical Biology*, 244(3), 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.08.017>
- Yu, L., Li, T., Ma, J., Zhao, Q., Wensel, P., Lian, J., & Chen, S. (2022). A kinetic model of heterotrophic and mixotrophic cultivation of the potential biofuel organism microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 64(April), 102701. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102701>