

I.S.F.O.A. HOCHSCHULE FÜR SOZIALWISSENSCHAFTEN
UND MANAGEMENT

Tesi di laurea in Ingegneria Civile e Ambientale

Biorisanamento di acque reflue di origine petrolifera tramite impianti microalgali.

Relatore:

prof.

Laureando:

Egidio Montagnuolo

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

Sommario

Capitolo 1: Le microalghe.....	3
1.1 Introduzione.....	3
1.2 Le microalghe.....	5
1.2.1 Fattori che influenzano la crescita	7
1.2.1.1 Effetto della temperatura.....	7
1.2.1.2 Luce.....	7
1.2.1.3 Diossido di carbonio	8
1.2.1.4 Limitazione dei nutrienti	8
1.3 Tecniche di coltivazione	9
1.3.1 Sistemi aperti.....	9
1.3.2 Sistemi chiusi	10
Capitolo 2: Petrolio e biorisanamento.....	11
2.1 Bioremediation e microalghe	11
Capitolo 3: Progettazione impianto pilota	15
3.1 Distribuzione della luce e miscelazione.....	15
3.2 Alimentazione di CO ₂ e aerazione	16
Capitolo 4: Creazione prototipo di impianto depurativo	17
4.1 Prove di depurazione.....	17
4.2 Bilancio di massa impianto di depurazione	22
4.2.1 Calcoli	25
Conclusioni	27
Bibliografia	28

Capitolo 1: Le microalghe

1.1 Introduzione

Le Microalghe sono **organismi fotosintetici microscopici** che vivono nei mari, fiumi e laghi.

Esse utilizzano l'energia solare per sintetizzare gli zuccheri e l'energia necessaria alla loro vita.

Da anni ormai nelle microalghe sono stati scoperti innumerevoli composti di grande interesse applicativo tanto da considerare questi organismi delle "biofabbriche verdi" che consumano solo CO₂, sali minerali abbondanti in natura ed energia solare.

La coltivazione su larga scala è sempre più diffusa al fine di un loro utilizzo nel campo:

- dell'acquacoltura come alimento per mitili, crostacei e stadi larvali di pesci
- nutraceutico per l'elevato potere nutrizionale
- farmaceutico per le continue scoperte di molecole bioattive per la cura di malattie
- bioenergetico per l'elevato contenuto in oli e la produzione di idrogeno
- ambientale per le loro proprietà di biorisanamento di acque, suoli e aria inquinati

A seguito delle nuove applicazioni in campo energetico, nutraceutico, farmaceutico e cosmetico sono stati individuati diversi ceppi e specie promettenti per la produzione di biomasse su larga scala.

Tali coltivazioni intensive possono svolgersi in maniera sostenibile non sottraendo, cioè, risorse all'agricoltura ma consentendo il riciclo dell'acqua e l'abbattimento di gas atmosferici inquinanti.

La tecnica del biorisanamento ha lo scopo di sfruttare i microrganismi per degradare contaminanti ambientali e quindi ridurre l'inquinamento. Tra le principali fonti di inquinamento ritroviamo gli idrocarburi del petrolio. Il petrolio è una miscela di diversi idrocarburi, principalmente idrocarburi policiclici aromatici (IPA), alcani e alcheni [1]. Il petrolio deriva dalla decomposizione di materiale organico e di organismi, si trova negli strati profondi della crosta terrestre sotto forma di particelle oleose che riempiono gli spazi delle rocce sedimentarie [2]. Gli elementi più abbondanti sono: il carbonio (80 %), l'idrogeno (9/15%), piccole quantità di azoto, ossigeno e zolfo (es. tioli, solfati). Quando il petrolio si rovescia in mare, si forma una sottile chiazza sulla superficie del mare il cui spessore dipende dalla temperatura dell'acqua e dalla composizione del petrolio. La chiazza superficiale è trasportata dalle correnti marine e dal vento e si diffonde, ma i composti non miscibili

sono emulsionati con l'acqua e si disperdono nel mare [3]. Esistono molte tecniche che permettono di recuperare il petrolio; è possibile utilizzare solventi che ne favoriscono la precipitazione, ma questo potrebbe danneggiare il suolo marino. Un'altra possibilità è utilizzare dei disperdenti che favoriscono la frammentazione del petrolio in modo tale che possa essere utilizzato da batteri (degradazione aerobica), funghi, cianobatteri e alghe [3]. I batteri hanno un ruolo importante nel processo di biorisanamento. L'elevata diversità microbica presente nei sedimenti di acque profonde copre una vasta gamma di gruppi metabolici come i fototrofi ossigenati e anossigenati, i riduttori di solfato, ecc. Questo è importante perché quando il petrolio viene aggiunto all'acqua di mare, la comunità microbica coopera per rimuovere ogni inquinante [4]. Tuttavia, in presenza di un'abbondante contaminazione da parte degli idrocarburi, i microrganismi non possono degradarli efficacemente perché alcuni componenti, come gli Alcani e gli IPA (Idrocarburi Policiclici Aromatici), sono difficili da degradare. Se gli idrocarburi entrano nella catena alimentare, sono molto pericolosi perché gli IPA e i policlorobifenili (PCB) sono cancerogeni. Per questo le microalghe sono state prese in considerazione per i processi di biorisanamento, in quanto sono in grado:

- di utilizzare l'acqua, la CO₂ e la luce solare per produrre biomassa;
- di produrre enzimi capaci di degradare i composti nocivi;
- di trasformare il petrolio in composti meno tossici [5].

Le microalghe sono una risorsa nuova e sottovalutata, infatti, possono rimuovere gli inquinanti grazie alla loro capacità di utilizzare il carbonio come fonte di energia per il processo di fotosintesi producendo, di fatto, circa il 30-50% dell'ossigeno atmosferico [6]. Inoltre, ci sono molti tipi di microalghe che sono in grado di produrre biomassa che viene poi usata per la produzione di biodiesel. Infatti, il contenuto di lipidi potrebbe essere del 20-60% del peso secco in condizioni di crescita ottimali [7]. Utilizzando il biodiesel, è possibile rimuovere le emissioni di anidride solforosa (SO₂) e ridurre le emissioni di IPA, come il benzopirene, e le polveri sottili [8]. Le microalghe hanno ricevuto grande interesse come potenziali produttori di biocarburanti in risposta alla crisi energetica, al riscaldamento globale e al cambiamento climatico, e si stima che possano fornire fino al 25% dell'energia necessaria. Gli oli estratti dalle microalghe atossiche ed ecocompatibili possono essere utilizzati come materia prima per la produzione di biodiesel, biometano, bioetanolo, bioidrogeno e bio-butanolo, in un ciclo sostenibile che comprende la fissazione della CO₂ atmosferica. Una delle maggiori sfide scientifiche per la produzione di biocarburanti (in particolare di biodiesel) è quella di ottimizzare la resa di produzione di lipidi delle microalghe. La maggior parte delle specie di microalghe sono favorevoli alla produzione di biodiesel dato il loro alto contenuto di lipidi (50-70%) e alcune specie come *B. braunii* possono

raggiungere un contenuto di lipidi fino all' 80% [9]. Ovviamente il rendimento della produzione di biomassa dipende fortemente dal ceppo selezionato, dalla CO₂ e dalla luce. Il processo di raccolta contribuisce in modo significativo al costo totale di produzione, poiché generalmente rappresenta circa il 30% del costo totale [10]. I principali metodi attualmente utilizzati per l' estrazione da microalghe includono: la flocculazione, la centrifugazione, la filtrazione, la sedimentazione per gravità, l' elettroforesi, la flottazione e la loro combinazione [11]. Oltre i lipidi vengono isolati anche i carboidrati, come glicogeno, amido, agar e cellulosa i quali possono essere convertiti in zuccheri fermentescibili per la produzione di bioetanolo [11].

1.2 Le microalghe

La coltivazione di microalghe è molto importante ai fini di produrre biomassa sostenibile per alimenti, mangimi, prodotti chimici, biocarburanti e prodotti di alto valore (Figura 1).

Una curva di crescita algale può essere suddivisa nelle seguenti fasi (Figura 2):

- Fase di latenza: adattamento delle microalghe al terreno di coltura, alla luce e alla temperatura; il tasso di crescita in questa fase è pari a zero;
- Fase di accelerazione: in questa fase si ha un aumento del tasso di crescita delle microalghe ed un rapido consumo dei nutrienti;
- Fase logaritmica o esponenziale: la concentrazione della biomassa tende ad aumentare in modo esponenziale, la crescita è costante e dipende dalla disponibilità di nutrienti, dalla luce e dalle condizioni di temperatura;
- Fase di rallentamento: in cui la mancanza di nutrienti o l'accumulo di sostanze tossiche portano alla morte di alcune cellule, non si ha quindi un aumento significativo della concentrazione;
- Fase stazionaria: il tasso di crescita è pari a zero. La velocità di divisione delle cellule eguaglia quella di morte, di conseguenza la concentrazione assume un valore costante;
- Fase di morte: il numero di cellule vitali diminuisce notevolmente; la coltura si esaurisce in seguito ad un aumento della lisi cellulare. Ciò può essere spiegato a causa di una grande quantità di alghe presenti in un volume ridotto, al consumo dei nutrienti e ad altri fattori come la presenza di sostanze tossiche ed illuminazione insufficiente.

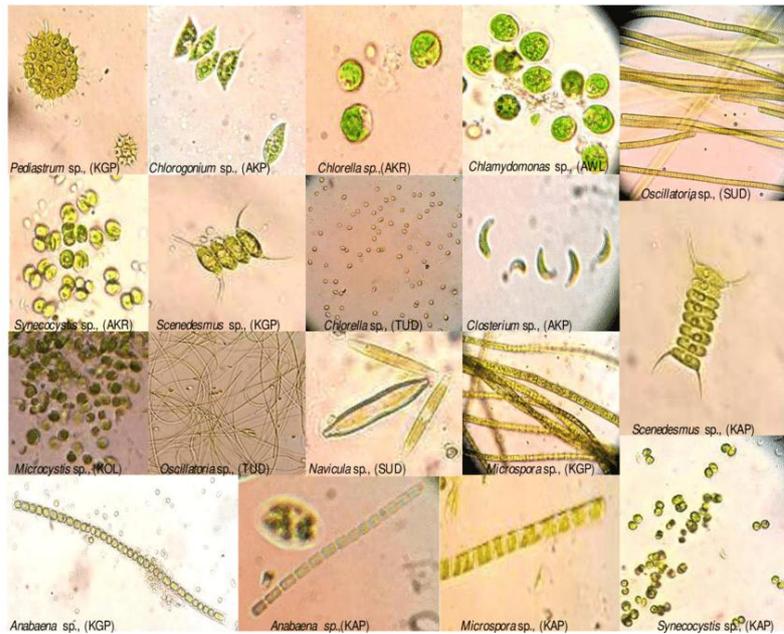


Figura 1: Varie tipologie di microalghe [13]

Le microalghe possono essere coltivate con metodi diversi e in condizioni diverse, ma hanno necessariamente bisogno della luce come fonte di energia per convertire l'acqua assorbita e la CO_2 in biomassa, attraverso la fotosintesi [14]; necessitano anche di azoto e fosforo come nutrienti principali, che rappresentano il 10-20% della biomassa algale [15]. Altri requisiti per la crescita sono i macronutrienti Na, Mg, Ca e K; micronutrienti, come Mo, Mn, B, Fe e Zn; e altri oligoelementi.

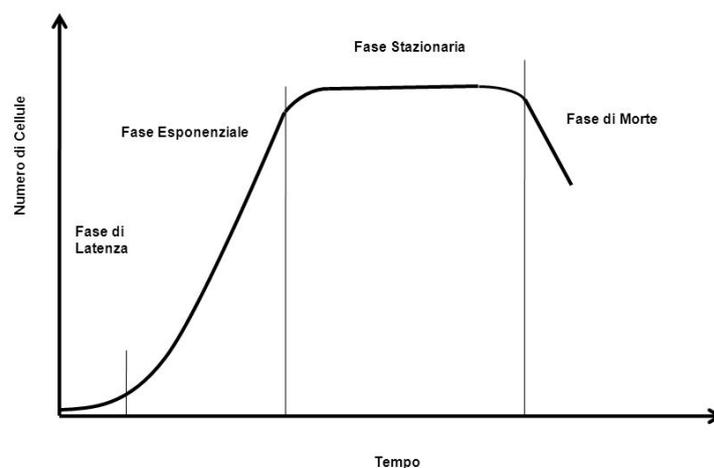


Figura 2: Curva di crescita delle microalghe [12]

1.2.1 Fattori che influenzano la crescita

Le microalghe sono organismi particolarmente sensibili alle variazioni dell' ambiente esterno per questo è necessario che le condizioni favorevoli alla loro crescita vengano garantite in modo stabile. Alcuni dei fattori di stress comuni che influenzano la crescita cellulare sono: quantità e qualità di luce, temperatura, concentrazione di nutrienti, CO₂, pH, salinità, livello di inquinamento (dovuto a batteri, funghi e virus), frequenza delle sequenze luce/buio [16].

1.2.1.1 Effetto della temperatura

La temperatura è uno dei parametri più importanti per la crescita delle microalghe, infatti la produzione di biomassa aumenta con l'incremento della temperatura fino al raggiungimento della temperatura ottimale; al di sopra di tale temperatura, la crescita delle microalghe è inibita. Temperature inferiori a quelle ottimali non favoriscono la crescita delle microalghe perché questa influisce sulla viscosità del citoplasma, sull'utilizzo efficiente dei nutrienti e potrebbe anche portare alla foto-inibizione in quanto l'apparato fotosintetico non è efficiente. Una temperatura più bassa potrebbe anche causare l'accumulo di acidi grassi insaturi, utilizzati per superare proprio i problemi di fluidità di membrana. In generale, molte microalghe crescono in ambienti con temperature comprese tra 15 e 30 ° C, con un tasso di crescita ottimale tra i 20 e i 25 ° C [14]. Alcuni studiosi hanno studiato l'effetto della temperatura sulla produzione di biomassa e sull'assorbimento di nutrienti su alcune comuni microalghe industriali come *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Synechocystis salina* e *Microcystis aeruginosa*. È stato osservato che l' aumento della temperatura ha influenzato la produttività della biomassa, i tassi di crescita e l' utilizzo efficiente dei nutrienti, aumentandoli; la temperatura ottimale per tutti i ceppi studiati era di 25 ° C [15], con alcune eccezioni [17]. È interessante notare che una diminuzione della temperatura porta anche ad un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle cellule, indicando la presenza di stress ossidativo. Oscillazioni della temperatura, quindi, possono indurre l'accumulo di carotenoidi nelle microalghe in risposta allo stress ossidativo indotto dall' incremento della temperatura [14].

1.2.1.2 Luce

La quantità di luce ricevuta dalle cellule in coltura è direttamente correlata alla quantità di carbonio, che verrà fissato, influenzando conseguentemente il tasso di crescita delle colture. La sorgente luminosa può essere artificiale o naturale (luce solare), ma in ogni caso, la fotosintesi nelle microalghe aumenta all' aumentare dell'intensità luminosa, fino a raggiungere una velocità massima

nel punto di saturazione [18]. Al di sopra del punto di saturazione, la luce in eccesso porta a un fenomeno chiamato foto-inibizione il quale si verifica anche quando l'intensità della luce non è sufficientemente elevata da causare l'inibizione della fotosintesi, ma non raggiunge le cellule ombreggiate, influenzando comunque la produzione della biomassa. Pertanto sarebbe meglio posizionare dei LED all'interno del mezzo per migliorare la distribuzione dei fotoni sia nel momento in cui si vuole integrare la luce naturale sia per migliorare la crescita delle culture cresciute in un ambiente artificiale. La radiazione fotosinteticamente attiva, utile per le microalghe, ha una lunghezza d'onda compresa tra 400 e 700 nm, che corrisponde al 50% della radiazione solare con una intensità che varia da 800 a 1000 W / m² [19].

1.2.1.3 Diossido di carbonio

Affinché le microalghe crescano e siano metabolicamente attive, ci sono parametri specifici riguardo i livelli massimi e minimi di CO₂ che devono essere raggiunti. Livelli ottimali di CO₂ influenzano la produzione di lipidi e il loro accumulo all' interno della cellula [20]. Sebbene l'aumento di CO₂ potrebbe aiutare nella produzione e accumulo di lipidi nelle cellule, esiste anche un livello massimo in cui i livelli di CO₂ in eccesso portano ad effetti nella produzione di lipidi e nella crescita cellulare. In precedenza si riteneva che le microalghe si sviluppassero meglio ad alte concentrazioni di CO₂, tuttavia esperimenti successivi hanno dimostrato che la maggior parte delle specie mostra un intervallo massimo in cui la CO₂ diventa non ottimale e in alcuni casi letale per la coltura di microalghe [21]. Quando una coltura viene aerata con alte concentrazioni di CO₂, una parte del carbonio viene utilizzata dalle cellule per il processo di fotosintesi, ma il carbonio rimanente potrebbe essere convertito in acido carbonico (H₂CO₃). Questo composto può causare l'acidificazione del terreno, alterando la crescita cellulare e le vie metaboliche. Pertanto, è molto importante considerare i livelli di pH ottimali per le varie specie, determinando così la quantità di CO₂ ottimale per la crescita e per la produzione e l'accumulo di lipidi nelle cellule [22].

1.2.1.4 Limitazione dei nutrienti

I nutrienti inorganici essenziali come l'azoto, lo zolfo, il carbonio, il ferro e il fosforo hanno un impatto notevole sulla crescita, la riproduzione e il metabolismo cellulare. La mancanza di nutrienti provoca situazioni ostili all' interno della cellula, generando l'accumulo di più composti lipidici; questa tecnica è stata quindi sfruttata dai ricercatori e dall'industria per incrementare la produzione e l'accumulo di lipidi. In un terreno di coltura, la crescita cellulare dipende strettamente da un' elevata concentrazione di nutrienti, specialmente durante le prime fasi del ciclo di vita cellulare, in seguito al quale, dopo aver raggiunto la biomassa necessaria, la limitazione dei nutrienti può causare un

ambiente di stress e un aumento della produzione di lipidi specialmente di TAG, in condizioni mixotrofiche limitate dall' azoto [23]. È possibile, inoltre, che la limitazione dei nutrienti possa influenzare altri percorsi biochimici nelle cellule, influenzando indirettamente la produttività dei lipidi [20].

1.3 Tecniche di coltivazione

I fotobioreattori (PBR) sono sistemi in cui vengono coltivate le microalghe. Questi sistemi sono “sistemi chiusi”, tuttavia con questo termine si fa riferimento anche a tutti i “sistemi aperti” impiegato per lo stesso processo. La differenza principale tra i due sistemi è il contatto con l’ambiente.

In accordo con Grobbelaar, 2000 [24], nei sistemi “aperti” la coltura è esposta all’atmosfera, mentre nei sistemi chiusi, solitamente, questo non accade.

1.3.1 Sistemi aperti

I sistemi aperti nascono negli anni '50, rappresentando ancora oggi una soluzione economica ed efficiente in termini di gestione [25]. Essi, possono essere naturali (laghi, lagune e stagni naturali) o artificiali (vasche raceway e sistemi circolari) Esistono, tuttavia, dei limiti legati all’impiego di questi sistemi, tra cui: ampi spazi per le opere civili, perdite dovute all’evapotraspirazione, controllo di temperatura inadeguato, alto rischio di contaminazione esterna e limitata penetrazione della luce nel battente idrico [26]. Nei sistemi aperti, le vasche vengono alimentate tramite pompe le quali apportano nutrienti alle microalghe presenti all’interno. La luce sfruttata per la crescita è quella naturale e per questo motivo, è facile dedurre che la profondità di tali vasche deve rimanere limitata (non superiore ai 30 cm) permettendo così a tutte le cellule di interagire con le radiazioni solari in egual maniera e di accedere alla CO₂ atmosferica in maniera adeguata (Figura 3) [27]. Nonostante i sistemi aperti risultino i più adeguati alla crescita fototrofica, raggiungono produttività limitate a causa delle caratteristiche avverse sopra descritte [27].



Figura 3: Esempio di coltivazione microalgale in un sistema aperto [28]

1.3.2 Sistemi chiusi

I sistemi chiusi (Figura 4), a differenza di quelli aperti, come anticipato, consentono di evitare le problematiche ascritte al contatto diretto con l'ambiente (ridotte perdite da evaporazione, ridotta contaminazione biologica ecc.), incrementando notevolmente i tassi di crescita e produzione. Nei sistemi chiusi, i parametri di crescita sono finemente regolati e controllati, ottimizzando di fatto il processo produttivo [29]. I PBR chiusi sono costruiti principalmente con materiali trasparenti di varia natura, per permettere una corretta penetrazione della luce; inoltre, essendo sviluppati principalmente in altezza, occupano meno spazio e la raccolta della biomassa risulta meno costosa. Un ostacolo all'utilizzo di PBR chiusi, è legato al costo di investimento, il quale è superiore rispetto a quelli richiesti per sistemi aperti, così come i costi di gestione e manutenzione [30]



Figura 4: Esempio di coltivazione microalgale in un sistema chiuso tubulare [28]

Capitolo 2: Petrolio e biorisanamento

I problemi legati ai siti contaminati stanno diventando sempre più importanti in molti paesi, costituendo un problema mondiale che presuppone un numero molto significativo di siti contaminati sia a livello acquifero, sia a livello terrestre [31]. I siti contaminati ed inquinati non sono da considerarsi in maniera separata ed isolata, infatti il suolo inquinato è in grado di contaminare le falde acquifere, provocando l'accumulo di sostanze tossiche nei tessuti vegetali e, seguendo la catena alimentare, trasmettersi agli animali al pascolo e infine all'uomo. Un altro problema sempre dovuto all'industrializzazione è la contaminazione da idrocarburi del petrolio, derivanti dalle industrie petrolchimiche dove avviene l'estrazione e la lavorazione del petrolio. L'inquinamento da idrocarburi del suolo e dell'acqua, negli ultimi decenni, ha acquisito una certa notorietà visti gli eventi recentemente accaduti, e l'importanza di focalizzarsi su metodiche green per produrre energia [32]. Santos ha raggruppato gli inquinanti ambientali in biodegradabili e non biodegradabili. I primi possono essere scomposti, lavorati o metabolizzati dagli organismi viventi, compresi anche i prodotti di scarto, i fosfati e i sali inorganici [33].

Per molti anni i microrganismi sono stati utilizzati negli effluenti domestici e dei rifiuti industriali per rimuovere la materia organica e le sostanze chimiche tossiche. Il bioremediation è una tecnologia emergente, un approccio molto economico ed ecologico, un'opzione che offre la possibilità di distruggere o rendere innocui, in condizioni controllate, vari contaminanti utilizzando l'attività biologica naturale come piante, microalghe e microrganismi [31]. I microrganismi possono essere originari di un'area contaminata oppure possono essere raccolti e isolati da altrove e poi lasciati in luoghi inquinati. I contaminanti vengono smaltiti attraverso reazioni metaboliche dei microrganismi coinvolti. Va sottolineato che generalmente la degradazione di un composto è il risultato della cooperazione di più organismi. Quando i microrganismi vengono importati in un sito contaminato per favorirne la degradazione, possiamo definire il processo come bio-accrescimento [31].

2.1 Bioremediation e microalghe

Il biorisanamento con microalghe è particolarmente efficace grazie alla loro capacità di convertire l'energia solare in biomasse utili e di assimilare nutrienti come fosforo e azoto che causano l'eutrofizzazione nel processo di fotosintesi [32]. Come già accennato all'inizio del capitolo è molto importante preservare l'ecosistema naturale, ad esempio attraverso il trattamento delle acque reflue prima che vengano scaricate nelle fonti idriche naturali. Pertanto, individuare tecnologie economiche ed ecocompatibili, con requisiti minimi e facili da usare, è davvero importante e

fondamentale. I trattamenti con microalghe sono popolarmente conosciuti come “*phycoremediation*” e sono considerati un'opzione migliore rispetto ai metodi convenzionali [34]. recupero, dispersione, diluizione, assorbimento, volatilizzazione e trasformazioni abiotiche sono tutti mezzi importanti per l'eliminazione degli idrocarburi, sistemi di trattamento che portano a un massiccio inquinamento atmosferico a causa dell'uso di macchinari pesanti e alle conseguenze ambientali della rimozione degli inquinanti [35]. Il biorisanamento con microalghe è particolarmente efficace grazie alla loro capacità di convertire l'energia solare in biomasse utili e di assimilare nutrienti come fosforo e azoto che causano l'eutrofizzazione nel processo di fotosintesi [32]. La presenza di azoto e fosforo migliora l'economia generale e il ritorno sugli investimenti, poiché l'aggiunta di nutrienti può rappresentare circa il 50% dei costi di coltivazione delle alghe. Pertanto, la coltivazione di microalghe in acque inquinate è un mezzo efficace per rimuovere i nutrienti da tali acque. La biomassa algale può essere trasformata in prodotti preziosi, come i biocarburanti (ad esempio biodiesel e bioetanolo), ed è nota la capacità delle alghe di rimuovere sostanze inquinanti come nutrienti, metalli pesanti e sostanze chimiche organiche complesse disciolte in vari tipi di acque reflue come le acque reflue municipali, di discarica, gli effluenti della digestione anaerobica e i rifiuti di depurazione (Rahman et al., 2020). Coltivare alghe in acque inquinate offre numerosi vantaggi: mitigazione dei gas serra, trattamento delle acque reflue e produzione simultanea di biomassa algale che può avere molteplici usi come integratori proteici, additivi alimentari, risorse bioenergetiche (biogas e biocarburanti), prodotti farmaceutici, cosmetici e altri prodotti chimici preziosi [34], [36]. Tra gli inquinanti organici colpiti dalla degradazione delle microalghe ci sono i composti fenolici, i pesticidi, gli idrocarburi poliaromatici (IPA) e i policlorobifenili (PCB) [37]:

- **Fenoli:** i fenoli fanno parte di una famiglia di composti organici caratterizzati da un gruppo ossidrilico (-OH) legato ad un atomo di carbonio di un anello aromatico. Fenoli si riferisce sia al nome della famiglia che a quello del composto più semplice di questo gruppo, il monoidrossibenzene (C₆H₅OH), noto anche come benzenolo, o acido carbolico. Il fenolo, tuttavia, è piuttosto tossico e le soluzioni concentrate causano ustioni gravi ma indolori della pelle e delle mucose. Fenoli e alcoli sono molto simili ma i primi hanno più legami idrogeno. I fenoli vengono utilizzati per molteplici usi dai prodotti casalinghi agli intermedi per la sintesi industriale, in campo farmaceutico ad esempio per l'apririna, materiale di partenza per la produzione di materie plastiche, esplosivo (acido picrico). I composti fenolici vengono prodotti mediante una reazione di condensazione con fenolo e formaldeide che rilascia acqua come sottoprodotto. Sono tossici anche a basse concentrazioni; concentrazioni

più elevate sono difficili da rimuovere dall'ambiente. Diversi ceppi di alghe sono in grado di metabolizzare il fenolo nell'ambiente [37].

- **Idrocarburi Policiclici Aromatici:** un idrocarburo policiclico aromatico (IPA) è caratterizzato dalla presenza di più anelli aromatici contenenti solo carbonio e idrogeno. I composti più semplici sono il naftalene con due anelli aromatici e l'antracene e il fenantrene con tre anelli aromatici. Gli IPA sono molecole scariche e non polari con particolari proprietà dovute alla delocalizzazione degli elettroni all'interno degli anelli aromatici. Possiamo trovare questi composti nei giacimenti petroliferi o nel carbone, possono derivare dalla decomposizione termica della materia organica ad esempio quando la biomassa brucia negli incendi boschivi o anche negli inceneritori o nei motori [38]. Gli IPA sono inquinanti pericolosi in quanto cancerogeni, mutageni e teratogeni. Batteri e funghi sono utilizzati da tempo per la degradazione di queste sostanze, mentre l'utilizzo delle alghe è piuttosto recente [37].
- **PoliCloroBifenili:** un PoliCloroBifenile (PCB) è un composto organico del cloro $C_{12}H_{10-x}Cl_x$. I PoliCloroBifenili un tempo erano ampiamente utilizzati come fluidi dielettrici e refrigeranti negli apparecchi elettrici, nella carta autocopiante e nei fluidi di trasferimento del calore [39]. I PCB sono sostanze tossiche e presentano una buona affinità per i lipidi animali che di conseguenza porta ad una loro "*biomagnification*" (processo che descrive il trasferimento di sostanze xenobiotiche dall'alimento ad un organismo con conseguente aumento della concentrazione rispetto alla fonte nella catena alimentare [40]). La bioconcentrazione di PCB idrofobici nelle microalghe dipende da diversi fattori quali le proprietà fisico-chimiche dei composti, la fisiologia e la densità delle alghe. Un fattore limitante è la variazione totale dei lipidi nelle diverse fasi di crescita dell'alga a cui si aggiungono la limitata permeabilità della membrana, l'idrofobicità dei PCB e la struttura dei congeneri dei PCB, influenzano il bioaccumulo [37].
- **Petrolio e idrocarburi:** petrolio gli idrocarburi costituiscono i principali inquinanti a causa dell'uso diffuso di combustibili fossili per automobili e motori nelle industrie e nell'agricoltura [41]. Gli idrocarburi sono composti che contengono solo atomi di idrogeno e carbonio (vedi figura seguente) e sono definiti "combustibili fossili" perché sono miscele di idrocarburi che si formarono da resti di animali e piante (diatomee) che vivevano milioni di anni fa.

Idrocarburi

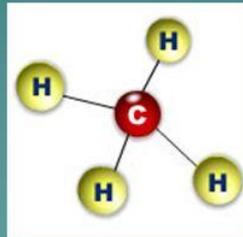


- ◆ Gli idrocarburi sono sostanze organiche formate da molecole di idrogeno e carbonio.

IDROCARBURI

Idrogeno

Carbonio



modello della molecola del metano



Il petrolio greggio è un'importante fonte di combustibili come benzina, diesel, cherosene, olio combustibile pesante e gas di petrolio liquefatto e, dall'altro, materia prima per l'industria petrolchimica. Il petrolio greggio e altri idrocarburi esistono in forma liquida o gassosa in pozze o serbatoi sotterranei, in piccoli spazi all'interno di rocce sedimentarie e vicino alla superficie terrestre nelle sabbie bituminose (o bituminose). I prodotti petroliferi sono combustibili ottenuti dal petrolio greggio e dagli idrocarburi contenuti nel gas naturale. I prodotti petroliferi possono essere ottenuti anche da carbone, gas naturale e biomassa [41].

Microalghe e protozoi sono membri importanti della comunità microbica sia negli ecosistemi acquatici che terrestri, tuttavia sono disponibili solo pochi rapporti riguardo al loro coinvolgimento nella biodegradazione degli idrocarburi [42]. Le microalghe sono in grado di sopravvivere in ambienti ostili grazie all'adattamento fisiologico dovuto alla modificazione dell'espressione genica. La sopravvivenza dipende esclusivamente dall'evoluzione adattativa, supportata dal verificarsi di mutazioni che conferiscono resistenza quando i valori di stress ambientale superano i limiti fisiologici. Lo stress imprevedibile a breve termine ha una risposta fisiologica di acclimatazione, a differenza dello stress prevedibile e continuo che porta, invece, ad una risposta genetica, molto più lenta [43].

Capitolo 3: Progettazione impianto pilota

Un fotobioreattore può essere considerato un sistema a tre fasi: la fase liquida, le microalghe in fase solida e la fase gas costituita prevalentemente dalla CO₂. In generale, la progettazione di un PBR richiede lo studio dell'interazione tra le diverse fasi del sistema e la relativa risposta biologica che si ottiene.

Tra gli aspetti più rilevanti da considerare durante la progettazione di qualsiasi PBR possiamo citare:

- La distribuzione della luce;
- La miscelazione;
- La fornitura di CO₂;
- L'aerazione.

3.1 Distribuzione della luce e miscelazione

Nei PBR è importante considerare i parametri che influenzano la crescita algale, descritti nel paragrafo 1.2.1. In qualsiasi sistema di coltura utilizzato, le cellule che sono più vicine alle pareti del PBR assorbono la luce, impedendone la penetrazione al centro del reattore poiché le cellule producono un effetto di ombreggiatura reciproca. Chiaramente, il mescolamento delle cellule in tutto il PBR produce un'alternanza di periodi di luce e oscurità. Questo periodo, compreso tra 1 millisecondo e pochi secondi, è definito come il tempo in cui una cellula rimane in "zona fotica". Fino a quando la luce riesce a superare lo spessore della parete del reattore, per penetrare all'interno del brodo algale, si verifica una crescita esponenziale della biomassa. La crescita è lineare solo quando la concentrazione di biomassa aumenta. Infatti, mantenendo attiva la miscelazione, questa situazione non comporta una diminuzione dell'efficienza; tuttavia una parte del volume totale non viene utilizzata e non contribuisce alla produttività, ma causa solo un costo energetico [44]. A causa del fenomeno di ombreggiatura reciproca, la frazione di volume attraversato al buio aumenta con la lunghezza del percorso della luce [26]. Risulta evidente, quindi, che il processo di miscelazione è fondamentale ai fini di ottenere un PBR efficiente sia da un punto di vista produttivo che energetico. I principali sistemi di miscelazione e/o ricircolo utilizzati commercialmente possono essere suddivisi in:

- sistemi di pompaggio (normalmente impiegati in caso di più reattori)
- agitazione meccanica (impiegata nei casi di un solo reattore)
- miscelazione con gas (dove l'iniezione di CO₂ nella coltura viene sfruttata per promuovere la miscelazione turbolenta e il ricircolo attraverso il PBR).

3.2 Alimentazione di CO₂ e aerazione

È necessario garantire all'interno del PBR, una adeguata fornitura di CO₂ e, al contempo, un efficace allontanamento dell'ossigeno prodotto dalla fotosintesi. La diffusione della CO₂ nel liquido può essere descritta mediante la “teoria del film”. Il trasferimento inizia in prossimità dell'interfaccia gas-liquido, sulla quale avviene la diffusione. Una volta avvenuto il trasferimento, la CO₂ attraversa l'interfaccia gas-liquido per diffondersi nel film liquido adiacente fino ad arrivare al bulk liquido dove il biossido di carbonio può essere metabolizzato dalle microalghe [45].



Esempio di impianto sperimentale ENI di Ragusa

Capitolo 4: Creazione prototipo di impianto depurativo

Basandosi sui risultati ottenuti dalla Dott.ssa Radice presso l'Università degli studi della Basilicata, si è proceduto ad effettuare una prova di depurazione e un calcolo preliminare che considera tutti i parametri all'interno dell'impianto pilota.

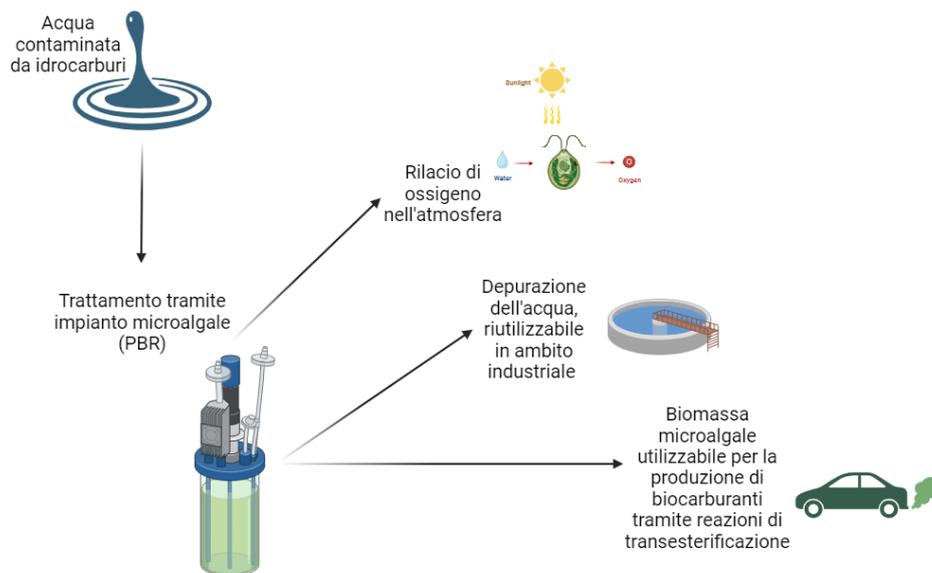


Figura 5: Schema impianto di depurazione

Dagli studi della Dott.ssa Radice, si è visto come le microalghe appartenenti al ceppo *Haematococcus pluvialis*, da lei selezionate, se sottoposte a particolari stress adattativi, siano in grado di degradare gli idrocarburi presenti nel mezzo di coltura.

4.1 Prove di depurazione

È stato creato un mini impianto pilota per la bioremediation di acque reflue contaminate da idrocarburi. In un PBR sono stati fatti crescere 500 ml di *H. pluvialis* RPR1004 con l'1% di petrolio puro al suo interno e in parallelo è stata creata una coltura di controllo che rispecchiasse la coltura trattata in tutti gli aspetti, ad eccezione della presenza del petrolio.

La Figura 6 mostra come la microalga *H. pluvialis* RPR1004, se fatta crescere in un mezzo con l'1% di petrolio puro, raggiunge una fase esponenziale già intorno al dodicesimo giorno, e la fase stazionaria al 20esimo giorno, raggiungendo concentrazioni doppie rispetto alla coltura di controllo.

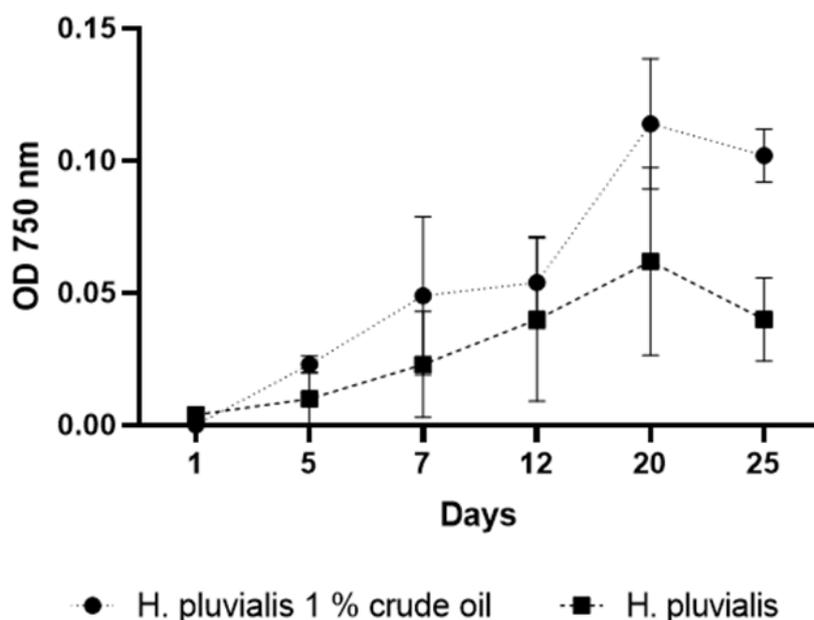


Figura 6: Crescita di *H. pluvialis* in presenza di 1% di petrolio puro e nel mezzo di controllo

L'adattamento della microalga all'ambiente ostile (anaerobiosi e presenza di contaminante come il petrolio), dimostra come vi sia un rapido adattamento delle cellule all'ambiente. Questo è evidente anche dai risultati ottenuti saggiando la quantità di clorofille e pigmenti all'interno delle due colture. Nella Figura 7 si evince una riduzione delle clorofille all'interno della coltura trattata con petrolio rispetto al controllo, proprio in virtù del fatto che essendo disponibile carbonio organico all'interno del mezzo le cellule non hanno bisogno di effettuare fotosintesi, spegnendo la produzione di clorofille. Inoltre, la ridotta quantità di pigmenti, addetti alla difesa delle cellule contro agenti stressanti, dimostra come la coltura abbia messo in atto un meccanismo adattativo tale da non percepire più il petrolio come un contaminante, ma come un mezzo nutritivo.

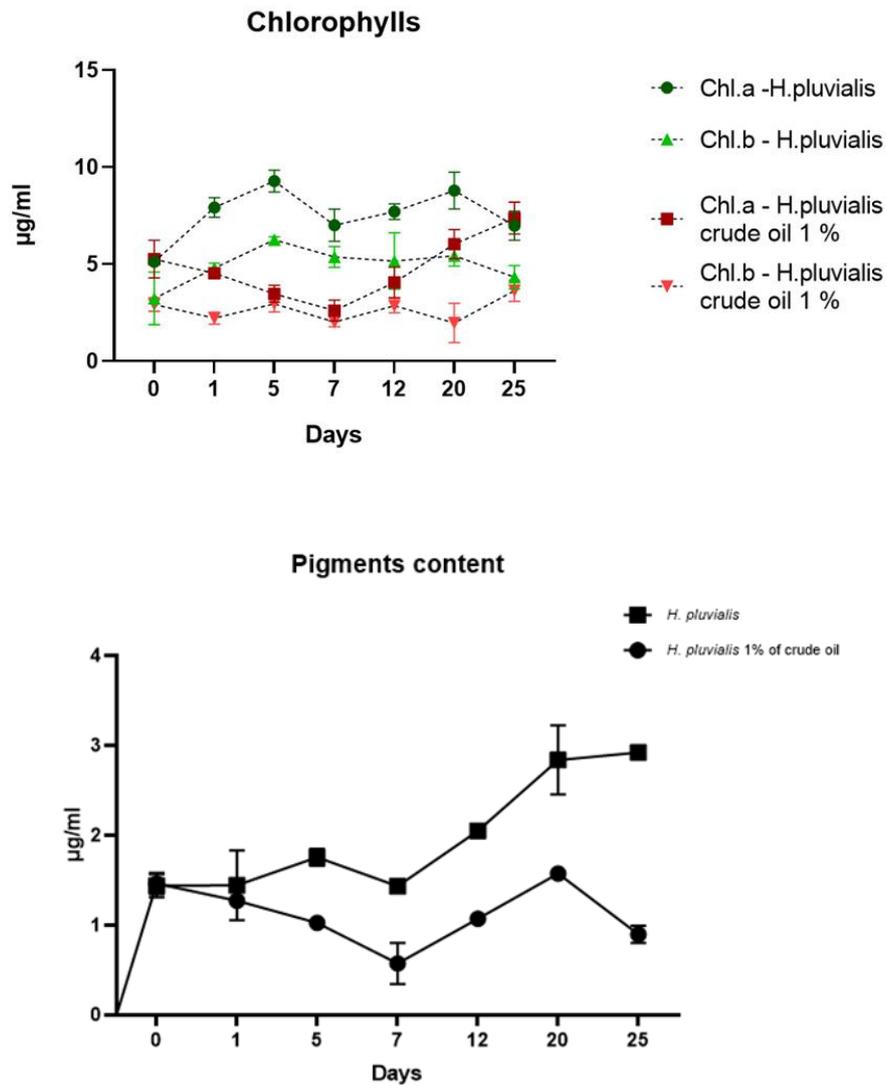


Figura 7: Valutazione delle quantità di clorofille e pigmenti in condizione di anaerobiosi con e senza la presenza del petrolio nel mezzo di crescita. Valori riportati come media \pm SEM

Dopo 10 giorni sono stati analizzati alcuni aspetti preliminari tra cui la quantità totale di carbonio (TOC) la quantità di fluoruri, cloruri, nitrati, solfati e fosfati. I risultati mostrati in Figura 8 evidenziano come i valori di carbonio, nel mezzo sono raddoppiati dopo solo 10 giorni, evidenziando un'azione di degradazione della microalga nei confronti degli idrocarburi presenti. Fluoruri, nitrati, solfati e fosfati sono stati ridotti significativamente, confermando quanto dimostrato da diversi studi presenti in bibliografia.

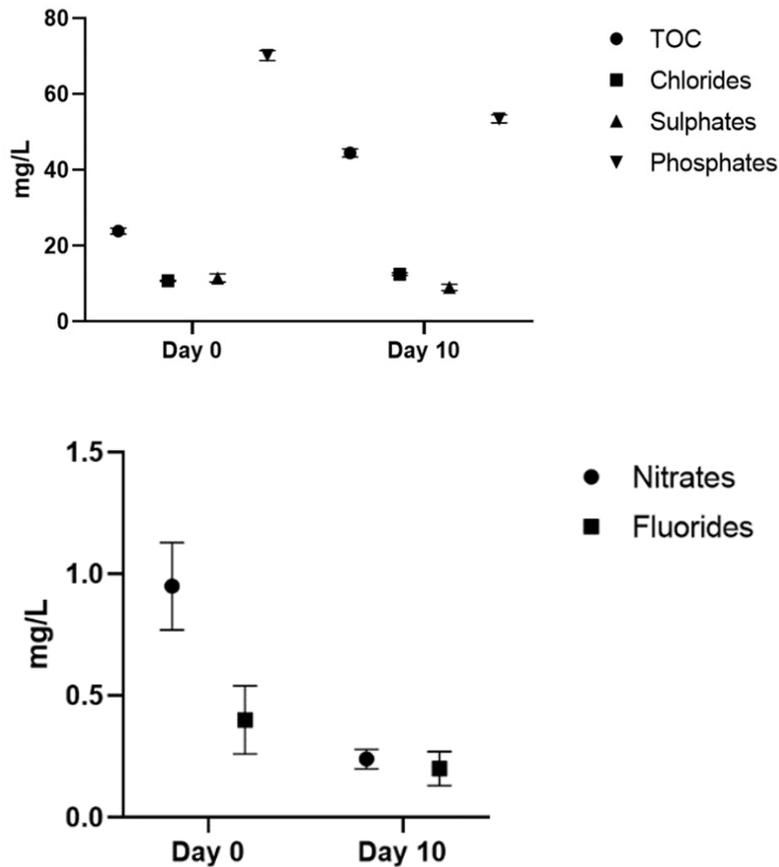


Figura 8: dati preliminari di bioremediation. Valori riportati come media \pm SEM

Dopo 20 e 160 giorni di trattamento, sono stati valutati tramite GC-FID la quantità di idrocarburi presenti nell'acqua e nella biomassa microalgale. Le analisi sono state condotte utilizzando un GC-FID Agilent 7890A e le condizioni cromatografiche utilizzate sono di seguito riportate:

- gas carrier Elio (1,6 ml/min)
- colonna: Phenomenex, Zebron, ZB-5HT Inferno (30 m x 0,32 mm (ID) x 0,10 μ m)
- programmata termica: 45 °C (per 8 min), velocità di riscaldamento 21 °C/min fino a 350 °C per 10 min (durata complessiva della corsa cromatografica 32,7 min).

I risultati ottenuti tramite GC-FID (Figura 9) mostrano come la microalga trattata con petrolio riduca del 96.49 % gli idrocarburi nell'acqua e del 98.02% nella biomassa algale, dimostrando una vera e propria bioremediation, in quanto sia l'acqua che la biomassa risulta essere libera da idrocarburi dopo 160 giorni di trattamento.

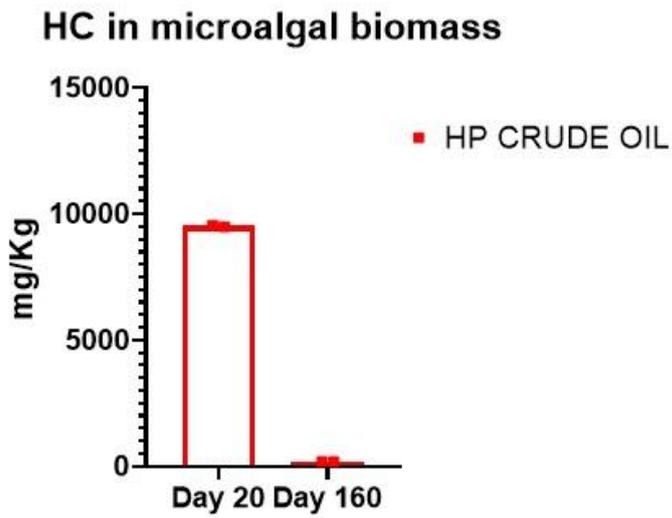
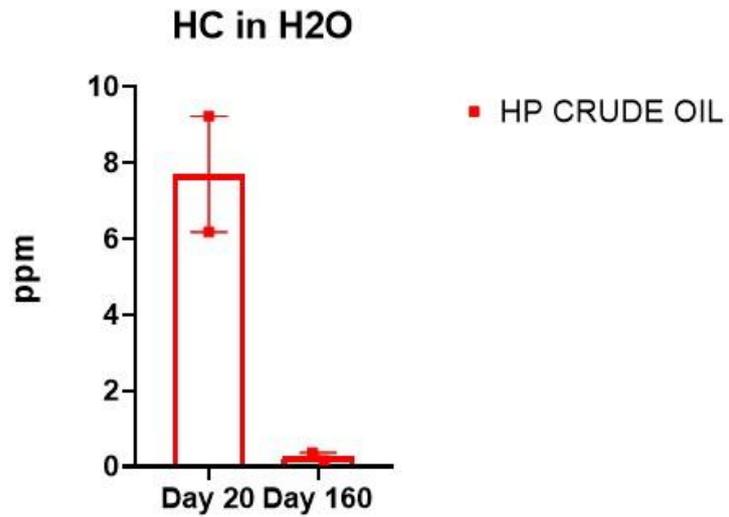


Figura 9: Analisi tramite GC-FID. Valori riportati come media \pm SEM

Anche gli spettri ottenuti dalla GC- FID evidenziano come gli idrocarburi siano stati totalmente ridotti (Figura 10).

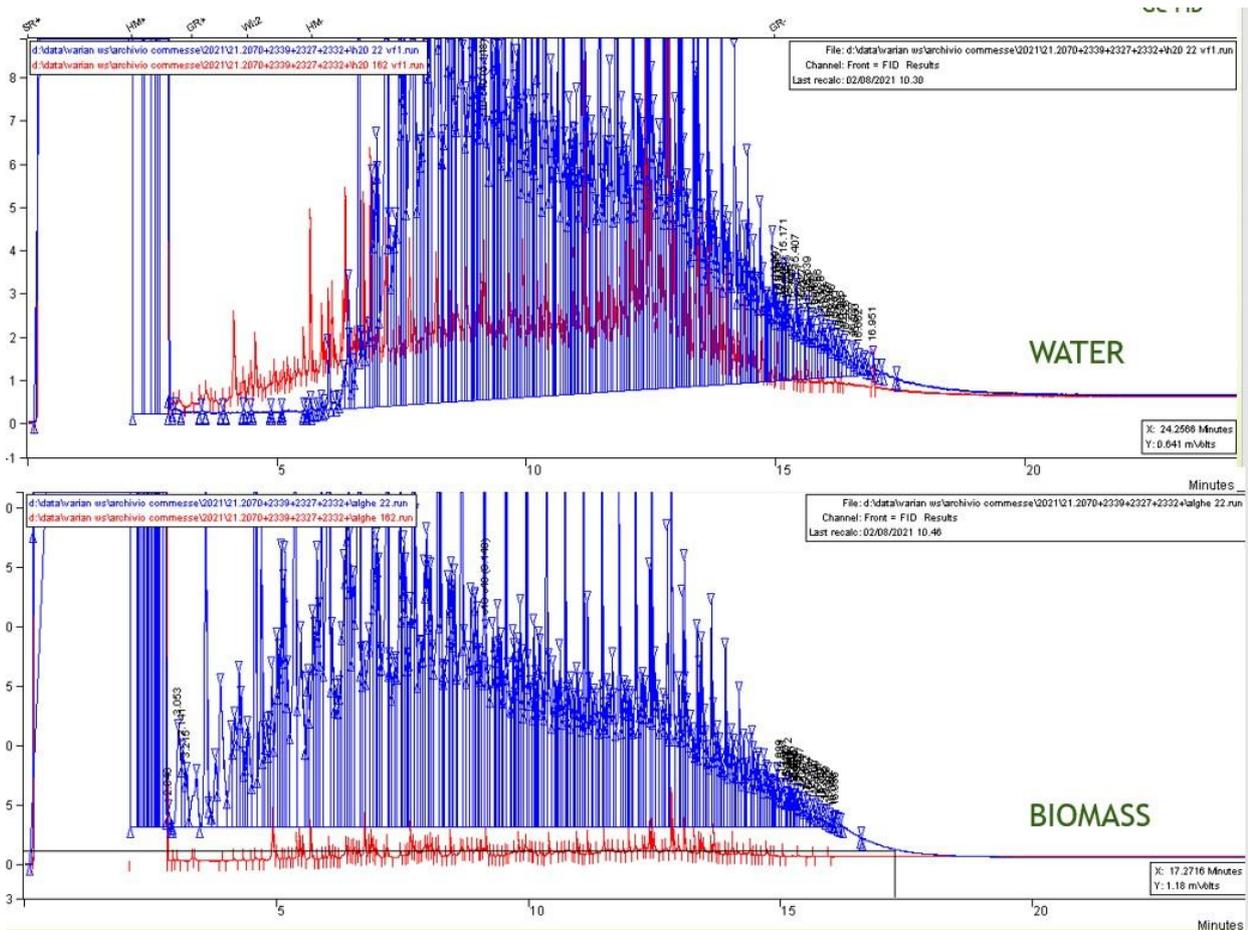


Figura 10.: GC-FID spectra. In blue idrocarburi giorno 20, in rosso idrocarburi giorno 160

4.2 Bilancio di massa impianto di depurazione

La Basilicata è la regione d'Italia più ricca in termini di giacimenti di petrolio, in Val D'agri esiste il più grande giacimento onshore Europeo. In questo territorio la salvaguardia dell'ambiente e la tutela delle risorse idriche, coinvolte nei processi di estrazione e lavorazione del petrolio, costituiscono un importante punto di ispirazione per il presente lavoro di tesi.

Principalmente le acque di lavorazione del petrolio vengono per due terzi re-iniettate nel sottosuolo (Figura 11) [in Basilicata ciò è regolamentato dal provvedimento D.D.75A/2001/D1010 ("Autorizzazione allo scarico nel sottosuolo delle acque derivanti dall'estrazione e separazione idrocarburi del Centro Olio"), rilasciato dall'Ufficio Regionale Ciclo dell'Acqua, e dai successivi rinnovi], mentre un terzo viene depurato in centri idonei.

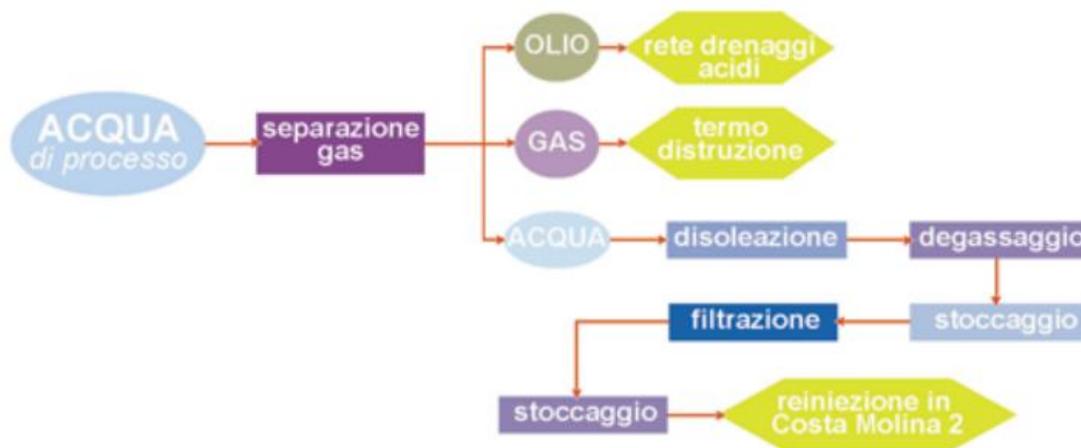


Figura 11: Processo del trattamento dell'acqua di estrazione re-iniettata [46].

Prima di procedere, però è necessario sottolineare diversi punti fondamentali riguardo l'applicazione delle microalghe in impianti tradizionali e, quindi, il passaggio da uno scale up laboratoriale ad uno industriale. Bisogna considerare che il trattamento di acque contaminate porta con sé una quota batterica che, inevitabilmente, si ritrova in contatto con la popolazione microalgale. Durante le prove laboratoriali, non è stata mantenuta una condizione di sterilità, proprio per emulare in maniera più veritiera le condizioni ambientali. Per questo motivo, quando si parla di biorisanamento, si parla di popolazioni ibride costituite da alghe e batteri, i quali instaurano una sopravvivenza reciproca simbiotica. Questo consorzio, infatti, permette un miglioramento dell'efficienza di biorisanamento rispetto all'impiego di popolazioni axeniche [41]. Le configurazioni impiantistiche da applicare variano in base alle caratteristiche del refluo e all'impianto di trattamento che si ipotizza realizzare. Considerando quanto detto precedentemente, quindi, le microalghe potrebbero essere applicate dopo i trattamenti primari effettuati ad esempio con fanghi attivi, oppure ipotizzando una coltivazione parallela terziaria in cui le microalghe attuano la bioremediation solo sulla frazione acquosa e la loro crescita è finalizzata soprattutto al recupero di nutrienti attivi [47]; così facendo è possibile ottenere la rimozione da reflui tipicamente caratterizzati da alte concentrazioni di inquinanti organici, i cui carichi hanno contribuito pesantemente all'eutrofizzazione dei corpi idrici e all'inquinamento delle falde in quelle zone ad alta intensità estrattiva.

In questo schema, riportato in Figura 12, si è ipotizzato di impiegare la coltivazione di microalghe all'interno di un impianto di depurazione già esistente.

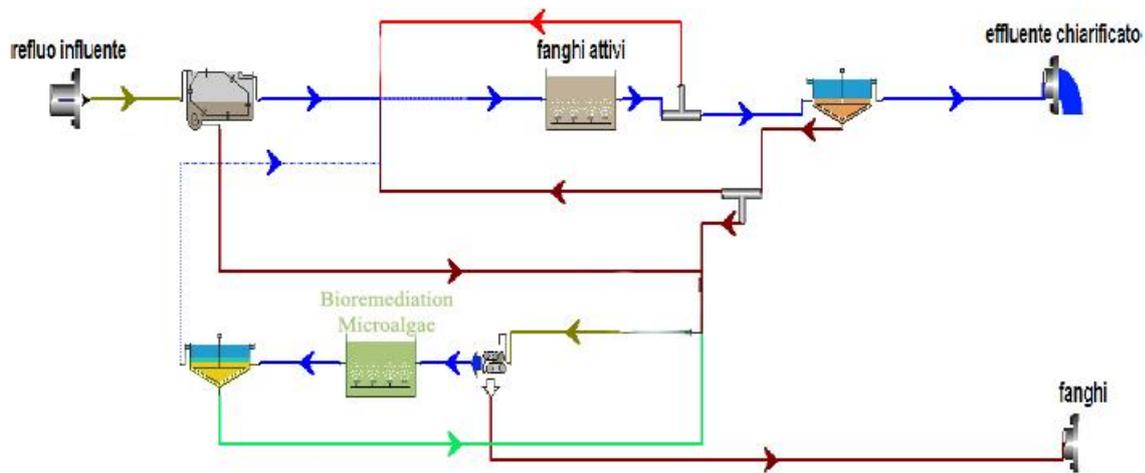


Figura 12: ipotesi di impianto di depurazione acque reflue e coltivazione microalghe

In questo impianto, il trattamento iniziale tramite fanghi attivi ha lo scopo di rimuovere i principali contaminanti solidi presenti nell'acqua contaminata, la quale poi, viene sottoposta a trattamento tramite la coltivazione delle microalghe. A valle del PBR, è presente un'ulteriore separazione solido/liquida per recuperare la biomassa algale e l'acqua di coltivazione.

L'impianto ipotizzato prevede la ripartizione dei flussi in tre linee come indicato in Figura 12

1. Linea acque:
 - Pretrattamenti
2. Linea Fanghi:
 - Separazione solido/liquida
3. Linea alghe:
 - Unità di coltivazione microalgale
 - Separazione
 - Riciclo della biomassa algale

Per effettuare un'analisi corretta per l'implementazione del ciclo algale nei processi di trattamento delle acque tradizionali, si è deciso di effettuare un esempio di bilancio di massa con relativa analisi di sensitività su un ipotetico impianto tradizionale di depurazione. Tale bilancio serve a:

- Calcolare i flussi di Azoto;
- Calcolare l'Azoto rimosso con e senza la soluzione innovativa del fotobioreattore.

I calcoli del bilancio sono stati eseguiti focalizzando l'attenzione sullo stream dell'Azoto, nutriente fondamentale per la crescita algale ed ulteriore contaminante delle falde acquifere (oltre ai già citati idrocarburi trattati nel capitolo precedente), al fine di calcolare e verificare se l'introduzione di un

fotobioreattore, in un impianto tradizionale di depurazione, possa dare ulteriore contributo al biorisanamento delle acque di processo.

4.2.1 Calcoli

Solitamente l'azoto è presente nelle acque contaminate in quantità pari a un apporto medio di 12 gN/(AE·d) [48], di questi il 15%, cioè mediamente 1.8 gN/(AE·d), transita attraverso la linea fanghi [49], sotto forma di fanghi primari e fanghi di supero secondari. Durante il processo di digestione anaerobica avvengono reazioni idrolitiche che trasformano la sostanza particolata in solubile. Grazie a tali reazioni si verifica un incremento della frazione solubile, ma non di entità tale da inibire l'attività batterica dei metanogeni.

Solitamente dal trattamento con i fanghi attivi, lo stream del digerito viene inviato a un'operazione unitaria di tipo fisico impiegata per la riduzione del contenuto di acqua dei fanghi al fine di:

- Ridurre i volumi di fango da smaltire, con conseguente risparmio dei costi di trasporto e smaltimento;
- Facilitare la manipolazione dei fanghi, poiché i fanghi disidratati possono essere manipolati in modo più semplice rispetto ai fanghi liquidi o ispessiti;
- Rimuovere l'eccesso di acqua.

Il processo considerato è la centrifugazione, la quale trova una larga applicazione nelle industrie presenti sul territorio, al fine di separare i liquidi di diversa densità, ispessire le sospensioni e rimuovere i residui solidi. In una centrifuga a tamburo rotante, ad esempio, largamente utilizzata nei principali impianti di depurazione, l'alimentazione del refluo è effettuata a portata costante ottenendo due flussi che s'identificano col nome di "centrato" e "torta". Il centrato, contenente solidi di dimensioni minute e di bassa densità, è solitamente ricircolato in testa alla linea di trattamento acque. La torta, caratterizzata da un contenuto di acqua variabile tra il 70 e l'80%, viene estratta dalla centrifuga mediante un trasportatore a vite e scaricata all'interno di tramogge o su nastri trasportatori.

Dai dati riportati in bibliografia, si possono calcolare le caratteristiche della "torta" di fango, e per differenza le caratteristiche del "surnatante".

$$\text{capacità di trattenimento della centrifuga} = \eta_{ST} = \frac{Kg \text{ centrato}}{Kg \text{ alimento}} \times 100 = 95\%$$

Nell'impianto ipotizzato, il concentrato ottenuto viene utilizzato come alimento al fotobioreattore (PBR) per lo sviluppo delle microalghe. Tale linea identificata come IN-PBR ha delle caratteristiche precise in termini di carico di Azoto, il particolato infatti è imputabile esclusivamente alla frazione che non viene trattenuta dalla sezione di centrifugazione (3%) e vale circa $0.02 \text{ gN}/(\text{AE}\cdot\text{d})$, mentre il solubile è pari alla quantità di Azoto solubile presente nella linea che fuoriesce dai fanghi, moltiplicata per il rapporto di ripartizione tra le portate (93%) e vale $1.54 \text{ gN}/(\text{AE}\cdot\text{d})$ circa [48].

Nel PBR l'Azoto presente in forma solubile viene trasformato ad opera delle microalghe in Azoto particolato, cioè in altra biomassa algale. La resa di questa reazione è stimata intorno all'80%.

All'uscita del PBR, rispetto allo stream d'entrata, si riscontra un incremento di biomassa algale, da $0.02 \text{ gN}/(\text{AE}\cdot\text{d})$ si passa a $1.25 \text{ gN}/(\text{AE}\cdot\text{d})$ di Azoto particolato, mentre per quanto riguarda l'Azoto solubile si registra una diminuzione da $1.54 \text{ gN}/(\text{AE}\cdot\text{d})$ a $0.31 \text{ gN}/(\text{AE}\cdot\text{d})$.

In conclusione, il carico di Azoto totale rimane invariato, all'interno del fotobioreattore la parte solubile viene semplicemente metabolizzata dalle cellule delle microalghe, quindi viene trasformata in particolato e accumulata nella biomassa algale, la quale in seguito ad ulteriore processo può essere recuperata ad esempio per produrre biocarburanti.

Conclusioni

Oggigiorno l'attenzione scientifica e mediatica è sempre più concentrata sulla possibilità di cercare metodi alternativi per la produzione di energia rinnovabile; tuttavia, poco ci si è focalizzati sul risanamento di ciò che i metodi, fino ad ora utilizzati, hanno contaminato. L'estrazione petrolifera, ad esempio oltre ad essere una delle principali fonti di inquinamento atmosferico (caratterizzato soprattutto alla combustione dei sottoprodotti derivanti dalla sua raffinazione), rappresenta un grande problema per quelle che sono le falde acquifere ed i suoli. È noto, infatti, che durante i processi estrattivi venga prodotta una grande quantità di acque di lavorazione ad elevato contenuto di idrocarburi ed elementi tossici. Queste acque in parte vengono re-iniettate nei pozzi di lavorazione ed in parte vengono smaltite secondo le normative che regolano il trattamento di acque contaminate. Questo processo, oltre ad essere molto dispendioso, ha comunque un impatto sull'ecosistema, dato che vengono impiegati mezzi pesanti per il trasporto delle acque nei siti idonei alla bonifica, e reagenti chimici i quali devono essere, poi, a loro volta smaltiti, senza trascurare i numerosi incidenti che spesso, purtroppo, avvengono durante il trasporto con conseguente formazione di ulteriori siti contaminati dovuti proprio allo sversamento del materiale trasportato. Sulla base dei risultati ottenuti in uno studio condotto dalla Dott.ssa Radice, si è reso evidente come alcuni microorganismi eucariotici siano in grado di eliminare gli idrocarburi presenti nelle acque di scarico in maniera del tutto ecologica, restituendo poi un'acqua depurata e una biomassa algale sfruttabile per scopi secondari, come ad esempio, la produzione di biometano o biocarburanti in generale. L'idea del presente lavoro, quindi, è stata quella di creare un impianto ad hoc per la depurazione di queste acque, in grado di svecchiare i vecchi processi, con l'inserimento del processo di biorisanamento microalgale all'interno di un impianto di depurazione standard già esistente. Il pretrattamento con fanghi attivi e l'applicazione delle microalghe, nel caso specifico una selezione appartenente al ceppo delle *Haematococcus pluvialis*, rendono un processo già conosciuto, innovativo e all'avanguardia. Le previsioni effettuate su un impianto pilota, dimostrano che l'applicazione di uno step intermedio, rappresentato dalle microalghe, abbatte non solo gli idrocarburi presenti all'interno delle acque contaminate, ma anche altri contaminanti come ad esempio l'azoto, noti per rendere difficile il riutilizzo delle acque di scarto.

In conclusione, possiamo asserire che la ricerca, oltre a concentrarsi sulle nuove tecnologie, dovrebbe anche considerare gli impatti economici ed ecologici che queste hanno nel momento in cui debbano soppiantare in toto le vecchie. Per questo motivo bisognerebbe cercare metodi green e biologici in grado di incrementare l'efficienza e l'ecosostenibilità ambientale di ciò che già esiste, come in questo elaborato di tesi si è cercato di fare.

Bibliografia

- [1] T. C. Hazen, R. C. Prince, and N. Mahmoudi, “Marine Oil Biodegradation,” *Environ Sci Technol*, vol. 50, no. 5, pp. 2121–2129, Mar. 2016, doi: 10.1021/acs.est.5b03333.
- [2] “PETROLIO – ORIGINE E COMPOSIZIONE – centro studi naturalistici.” Accessed: May 26, 2021. [Online]. Available: <https://centrostudnaturalistici.com/2020/07/02/petrolio-origine-e-composizione/>
- [3] P. Arulazhagan, N. Vasudevan, and I. T. Yeom, “Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment,” *Int. J. Environ. Sci. Tech*, vol. 7, no. 4, pp. 639–652, 2010.
- [4] B. A. McKew, F. Coulon, A. M. Osborn, K. N. Timmis, and T. J. McGenity, “Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK,” *Environ Microbiol*, vol. 9, no. 1, pp. 165–176, Jan. 2007, doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01125.x.
- [5] “(PDF) The role of algae in bioremediation of organic pollutants.” Accessed: May 26, 2021. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/285887445_The_role_of_algae_in_bioremediation_of_organic_pollutants
- [6] “Sfruttamento delle microalghe: tra realtà e prospettive.” Accessed: May 26, 2021. [Online]. Available: <https://doczz.net/doc/1198312/sfruttamento-delle-microalghe--tra-realtà-e-prospettive>
- [7] L. Zhu, Z. Li, and E. Hiltunen, “Microalgae *Chlorella vulgaris* biomass harvesting by natural flocculant: Effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction,” *Biotechnol Biofuels*, vol. 11, no. 1, p. 183, Jun. 2018, doi: 10.1186/s13068-018-1183-z.
- [8] J. Sheehan, V. Camobreco, J. Duffield, M. Graboski, and H. Shapouri, “An Overview of Biodiesel and Petroleum Diesel Life Cycles,” 1998.
- [9] Y. Chisti, “Biodiesel from microalgae,” *Biotechnology Advances*, vol. 25, no. 3. Elsevier, pp. 294–306, May 01, 2007. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.
- [10] A. I. Barros, A. L. Gonçalves, M. Simões, and J. C. M. Pires, “Harvesting techniques applied to microalgae: a review”, doi: 10.1016/j.rser.2014.09.037.
- [11] A. Raheem, P. Prinsen, A. K. Vuppaladadiyam, M. Zhao, and R. Luque, “A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments,” *J Clean Prod*, vol. 181, pp. 42–59, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.01.125.

- [12] “Colture cellulari: tipi, modalità di crescita e strumenti - BioPills.” Accessed: May 15, 2021. [Online]. Available: <https://www.biopills.net/colture-cellulari/>
- [13] A. Suresh, A. Ayele, and S. Benor, “Isolation and morphological identification of some indigenous microalgae from Ethiopia for phycoprospecting,” *Ethiopian Journal of Science and Sustainable Development*, vol. 6, no. 2, pp. 56–60, Sep. 2019, doi: 10.20372/EJSSDASTU:V6.I2.2019.102.
- [14] M. Ras, J. P. Steyer, and O. Bernard, “Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production,” *Rev Environ Sci Biotechnol*, vol. 12, no. 2, pp. 153–164, Jun. 2013, doi: 10.1007/s11157-013-9310-6.
- [15] A. L. Gonçalves, J. C. M. Pires, and M. Simões, “The effects of light and temperature on microalgal growth and nutrient removal: An experimental and mathematical approach,” *RSC Adv*, vol. 6, no. 27, pp. 22896–22907, Feb. 2016, doi: 10.1039/c5ra26117a.
- [16] T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, “Microalgae for biodiesel production and other applications: A review,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, no. 1. Pergamon, pp. 217–232, Jan. 01, 2010. doi: 10.1016/j.rser.2009.07.020.
- [17] A. Converti, A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego, and M. Del Borghi, “Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production,” *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, vol. 48, no. 6, pp. 1146–1151, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.cep.2009.03.006.
- [18] M. P. Rai and S. Gupta, “Effect of media composition and light supply on biomass, lipid content and FAME profile for quality biofuel production from *Scenedesmus abundans*,” *Energy Convers Manag*, vol. 141, pp. 85–92, 2017, doi: 10.1016/j.enconman.2016.05.018.
- [19] S. Hu *et al.*, “Effects of elevated pCO₂ on physiological performance of marine microalgae *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Chlorophyceae,” *J Oceanol Limnol*, vol. 36, no. 2, pp. 317–328, Mar. 2018, doi: 10.1007/s00343-018-6278-7.
- [20] S. Srinuanpan, B. Cheirsilp, P. Prasertsan, Y. Kato, and Y. Asano, “Strategies to increase the potential use of oleaginous microalgae as biodiesel feedstocks: Nutrient starvations and cost-effective harvesting process,” *Renew Energy*, vol. 122, pp. 507–516, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.renene.2018.01.121.
- [21] S. P. Singh and P. Singh, “Effect of CO₂ concentration on algal growth: A review,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 38. Elsevier Ltd, pp. 172–179, 2014. doi: 10.1016/j.rser.2014.05.043.

- [22] K. Ying, J. Gilmour, and W. B. Zimmerman, "Effects of CO₂ and pH on Growth of the Microalga *Dunaliella salina*," *J Microb Biochem Technol*, vol. 6, no. 3, pp. 167–173, 2014, doi: 10.4172/1948-5948.1000138.
- [23] K. L. Yeh and J. S. Chang, "Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels," *Biotechnol J*, vol. 6, no. 11, pp. 1358–1366, Nov. 2011, doi: 10.1002/biot.201000433.
- [24] J. U. Grobbelaar, "Physiological and technological considerations for optimising mass algal cultures," *J Appl Phycol*, vol. 12, no. 3–5, pp. 201–206, 2000, doi: 10.1023/A:1008155125844/METRICS.
- [25] M. A. Borowitzka, "Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters," *J Biotechnol*, vol. 70, no. 1–3, pp. 313–321, Apr. 1999, doi: 10.1016/S0168-1656(99)00083-8.
- [26] C. C. Flores, J. M. Peña-Castro, L. B. Flores-Cotera, and R. O. Cañizares-Villanueva, "Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas," *Interciencia*, vol. 28, no. 8, pp. 450–456, 2003, Accessed: Sep. 07, 2023. [Online]. Available: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003000800004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- [27] V. Di Martino and B. Stancanelli, "Colture indoor di microalghe finalizzate alla produzione di biomasse da destinare a produzioni zootecniche e bio-energetiche. 1° Contributo- Generalità. Algenesellschaften und Nutzung zur Bioindikation-algal communities and the use for bioindication View project." [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/312919104>
- [28] D. M. Mei, "Sistemi per la produzione di microalghe da inserire a valle del processo di digestione anaerobica MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO".
- [29] O. Pulz, "Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 57, no. 3, pp. 287–293, 2001, doi: 10.1007/S002530100702/METRICS.
- [30] R. Profssa Francesca Bosco Bernardo Ruggeri Jean-Philippe Steyer Nabil Grimi Candidato Angela Rosa Angelica Maragno, "Ottimizzazione delle performance dei fotobiorreattori al fine di aumentare la produttività di microalghe Luglio 2020".
- [31] M. Vidali, "Bioremediation. An overview," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 73, no. 7, pp. 1163–1172, Jul. 2001, doi: 10.1351/PAC200173071163/MACHINEREADABLECITATION/RIS.

- [32] M. M. El-Sheekh, R. A. Hamouda, and A. A. Nizam, "Biodegradation of crude oil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions," *Int Biodeterior Biodegradation*, vol. 82, pp. 67–72, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.ibiod.2012.12.015.
- [33] A. Özkara, D. Akyıl, M. Konuk, A. Özkara, D. Akyıl, and M. Konuk, "Pesticides, Environmental Pollution, and Health," *Environmental Health Risk - Hazardous Factors to Living Species*, Jun. 2016, doi: 10.5772/63094.
- [34] S. B. Ummalyma, A. Pandey, R. K. Sukumaran, and D. Sahoo, "Bioremediation by Microalgae: Current and Emerging Trends for Effluents Treatments for Value Addition of Waste Streams," *Energy, Environment, and Sustainability*, pp. 355–375, 2018, doi: 10.1007/978-981-10-7434-9_19/COVER.
- [35] S. Chandra, R. Sharma, K. Singh, and A. Sharma, "Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon," *Ann Microbiol*, vol. 63, no. 2, pp. 417–431, Jun. 2013, doi: 10.1007/S13213-012-0543-3/METRICS.
- [36] A. K. Sahu, J. Siljudalen, T. Trydal, and B. Rusten, "Utilisation of wastewater nutrients for microalgae growth for anaerobic co-digestion," *J Environ Manage*, vol. 122, pp. 113–120, Jun. 2013, doi: 10.1016/J.JENVMAN.2013.02.038.
- [37] S. R. Subashchandrabose, B. Ramakrishnan, M. Megharaj, K. Venkateswarlu, and R. Naidu, "Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation," *Environ Int*, vol. 51, pp. 59–72, Jan. 2013, doi: 10.1016/J.ENVINT.2012.10.007.
- [38] K. H. Kim, S. A. Jahan, E. Kabir, and R. J. C. Brown, "A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (IPAs) and their human health effects," *Environ Int*, vol. 60, pp. 71–80, Oct. 2013, doi: 10.1016/J.ENVINT.2013.07.019.
- [39] M. Rossberg *et al.*, "Chlorinated Hydrocarbons," *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Jul. 2006, doi: 10.1002/14356007.A06_233.PUB2.
- [40] J. S. Gray, "Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist," *Mar Pollut Bull*, vol. 45, no. 1–12, pp. 46–52, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0025-326X(01)00323-X.
- [41] R. P. Radice, V. De Fabrizio, A. Donadoni, A. Scopa, and G. Martelli, "Crude Oil Bioremediation: From Bacteria to Microalgae," *Processes*, vol. 11, no. 2. MDPI, Feb. 01, 2023. doi: 10.3390/pr11020442.
- [42] K. Ben Chekroun, E. Sánchez, and M. Baghour, "The role of algae in bioremediation of organic pollutants," *International Research Journal of Public and Environmental Health*,

- vol. 1, no. 2, pp. 19–32, 2014, Accessed: Sep. 14, 2023. [Online]. Available: <http://www.journalissues.org/irjpeh/>
- [43] D. Carrera-Martinez, A. Mateos-Sanz, V. Lopez-Rodas, and E. Costas, “Adaptation of microalgae to a gradient of continuous petroleum contamination,” *Aquatic Toxicology*, vol. 101, no. 2, pp. 342–350, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.aquatox.2010.11.009.
- [44] C. Posten, “Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae,” *Eng Life Sci*, vol. 9, no. 3, pp. 165–177, Jun. 2009, doi: 10.1002/ELSC.200900003.
- [45] A. P. Carvalho, L. A. Meireles, and F. X. Malcata, “Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances,” *Biotechnol Prog*, vol. 22, no. 6, pp. 1490–1506, Nov. 2006, doi: 10.1021/BP060065R.
- [46] “Trattamento dell’acqua - Osservatorio Val d’Agri.” Accessed: Oct. 19, 2023. [Online]. Available: <http://www.osservatoriovaldagri.it/web/guest/trattamento-dell-acqua>
- [47] A. Pizzera *et al.*, “Digestate treatment with algae-bacteria consortia: A field pilot-scale experimentation in a sub-optimal climate area,” *Bioresour Technol*, vol. 274, pp. 232–243, Feb. 2019, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2018.11.067.
- [48] Luca. Bonomo, “Trattamenti delle acque reflue,” 2008.
- [49] J. W. Mulder, M. C. M. Van Loosdrecht, C. Hellings, and R. Van Kempen, “Full-scale application of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering,” *Water Science and Technology*, vol. 43, no. 11, pp. 127–134, Jun. 2001, doi: 10.2166/WST.2001.0675.
- [50] Metcalf & Eddy, “Ingegneria delle acque reflue: trattamento e riuso,” pp. 1–2, 2006, Accessed: Oct. 19, 2023. [Online]. Available: <https://www.hoepli.it/libro/ingegneria-delle-acque-reflue/9788838661884.html>