



Università  
Ca'Foscari  
Venezia

Corso di Dottorato di ricerca  
in Scienze Ambientali, Informatica e  
Statistica  
ciclo 34°

Tesi di Ricerca

**Trattamento dei reflui di  
cantina mediante  
digestione anaerobica e  
microalghe in ottica di  
economia circolare**

Possibilità di applicazione dei processi  
biotecnologici su piccola scala nel panorama  
italiano

SSD: ING-IND/25

**Coordinatore del Dottorato**

ch. prof. Enrico Bertuzzo

**Supervisore**

ch. prof.ssa Cristina Cavinato

**Dottorando**

Paolina Scarponi  
Matricola 956427

*“Quisquis amans sequitur fugitivae gaudia formae  
fronde manus implet baccas seu carpit amaras.”*  
*“Colui che ama e insegue i gaudi della bellezza fugace,  
colma la mano di fronde e coglie amare bacche.”*

## Indice

<b>1</b>	<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
1.1	PRODUZIONE VINICOLA.....	1
1.1.1	Normativa .....	4
1.2	DIGESTIONE ANAEROBICA.....	6
1.3	MICROALGHE.....	9
1.3.1	Accoppiamento dei processi microalghe-DA .....	13
1.4	IL CONCETTO DI ECONOMIA CIRCOLARE APPLICATO ALLA PRODUZIONE VITIVINICOLA: LA BIORAFFINERIA.....	16
1.5	APPLICAZIONE DELLA FECCIA DI VINIFICAZIONE PER LA COLTIVAZIONE MICROALGALE.....	20
<b>2</b>	<b>SCOPO DEL LAVORO DI TESI.....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>24</b>
3.1	CARATTERIZZAZIONE DEL DIGESTATO DA TRATTAMENTO DELLA FRAZIONE ORGANICA DEI REFLUI URBANI.	24
3.2	CONDIZIONI OPERATIVE DEL DIGESTORE ANAEROBICO PER IL TRATTAMENTO DELLA FECCIA DI VINIFICAZIONE	25
3.3	METODI ANALITICI.....	26
3.3.1	Analisi sulla frazione liquida del digestato .....	26
3.3.2	Ceppi microalgali e mezzi di crescita .....	26
3.3.3	Monitoraggio della crescita cellulare .....	27
3.3.4	Caratterizzazione della biomassa .....	27
3.4	CONDIZIONI SPERIMENTALI.....	29
3.4.1	Valutazione di differenti pretrattamenti meccanici del digestato per la coltivazione microalgale.....	29
3.4.2	Test in piastra Petri: screening dei ceppi microalgali su digestato da FORSU .....	30
3.4.3	Valutazione dell'applicazione di basse diluizioni del digestato per la coltura microalgale .....	30
3.4.4	Test in batch: confronto effetto digestato da FORSU e digestato vinicolo su <i>C. vulgaris</i> .....	31
3.4.5	Test a due fasi di coltivazione batch-semicontinuo di <i>C. vulgaris</i> su digestato vinicolo.....	32
3.4.6	Test in semicontinuo in PBR a differenti HRT .....	32
3.4.7	Coltivazione di <i>C. vulgaris</i> su feccia di vinificazione .....	33
3.4.7.1	Test in batch: coltivazione di <i>C. vulgaris</i> su feccia di vinificazione ad elevata diluizione.....	34
3.4.7.2	Test in batch: coltivazione di <i>C. vulgaris</i> su feccia di vinificazione a bassa diluizione .....	34
3.4.7.3	Test in batch: coltivazione di <i>C. vulgaris</i> su feccia con pretrattamenti meccanici .....	34
3.5	BIOCHEMICAL METHANE POTENTIAL (BMP).....	35
<b>4</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>36</b>
4.1	DIGESTIONE ANAEROBICA DELLA FECCIA DI VINIFICAZIONE .....	36
4.2	IDENTIFICAZIONE DEI PRETRATTAMENTI SUL DIGESTATO DA FORSU E METABOLISMO CELLULARE PER LA COLTIVAZIONE MICROALGALE .....	40
4.3	SCREENING SU PIASTRA PETRI .....	44
4.3.1	Valutazione della crescita microalgale a concentrazioni maggiori di digestato FORSU .....	46
4.4	EFFETTO SULLA COLTIVAZIONE DI <i>C. VULGARIS</i> DEL DIGESTATO DA FORSU E DIGESTATO DA FECCIA DI VINIFICAZIONE .....	50
4.4.1	Acclimatazione di <i>C. vulgaris</i> .....	50
4.4.2	Effetto dell'applicazione di differenti digestati a basse diluizioni sulla biomassa microalgale .....	50
4.4.3	Caratterizzazione della biomassa coltivata su DIG-FORSU e DIG-WL .....	52
4.5	COLTIVAZIONE IN SEMI-CONTINUO .....	58
4.5.1	Coltivazione preliminare a due step.....	58
4.5.2	Effetto sulla produzione di biomassa e densità cellulare dei differenti HRT .....	62
4.5.3	Effetto fitodepurativo della coltivazione microalgale.....	64
4.5.3.1	Caratterizzazione biomassa uscente del sistema in semi-continuo.....	69
4.5.3.2	Frazione lipidica: caratterizzazione e valutazione per la produzione di biocarburanti.....	71

4.5.4	Considerazioni generali dell'applicazione del sistema accoppiato DA-microalghie in un impianto di trattamento delle acque reflue di cantina.....	78
4.6	COLTIVAZIONE DI <i>C. VULGARIS</i> SU FECCIA DI VINIFICAZIONE .....	81
4.6.1	Coltivazione <i>C. vulgaris</i> di differenti fecce di vinificazione a differenti diluizioni.....	82
4.6.2	Applicazione di due pretrattamenti meccanici per la coltivazione <i>C. vulgaris</i> .....	87
4.6.2.1	Lieviti nella produzione vitivinicola .....	91
4.7	VALORIZZAZIONE DELLA BIOMASSA MICROALGALE MEDIANTE DIGESTIONE ANAEROBICA (TEST BMP) .....	92
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>101</b>
5.1	PUBBLICAZIONI E PARTECIPAZIONI A CONGRESSO.....	102
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>103</b>

## Indice delle figure

<b>Figura 1:</b>	Processo di produzione del vino e identificazione dei processi produttivi che portano alla produzione della feccia di vinificazione (frecce grigie). .....	2
<b>Figura 2:</b>	Immagine estratta dal lavoro di Ioannidou et al. [10] per lo sviluppo del processo di bioraffineria per l'estrazione di prodotti secondari ad alto valore aggiunto per la feccia di vinificazione. La quantificazione del refluo vinicolo viene riportata in valore umido ed i composti estratti su base secca.....	3
<b>Figura 3:</b>	Schema del sistema sintrofico negli impianti di digestione anaerobica. ....	7
<b>Figura 4:</b>	Schema del metabolismo autotrofo, mixotrofico ed eterotrofo. ....	10
<b>Figura 5:</b>	Le diverse tipologie reattoristiche per la coltivazione microalgale in mixotrofia (da Carvalho et al. [45]). .....	12
<b>Figura 6:</b>	Schema dell'economia circolare. Nello schema vengono riportati i flussi dei materiali tecnologici e biologici [88]. .....	16
<b>Figura 7:</b>	Schema dell'applicazione della coltivazione microalgale associata alla digestione anaerobica sviluppata in questo studio. ....	19
<b>Figura 8:</b>	Impianto sperimentale con PBR tubolari verticali, volume 4 litri.....	33
<b>Figura 9:</b>	Metodo quantitativo di misurazione del biogas con cilindro graduato e setto di deviazione del biogas in uscita per collezionarlo all'interno delle gasbag. ....	36
<b>Figura 10:</b>	Monitoraggio del sistema DA alimentato a feccia bianca (WL), feccia rossa (RL) e feccia rosa (PL). a) monitoraggio dell'alcalinità parziale, alcalinità totale e pH; b) monitoraggio dell'OLR e SGP. <b>Errore. Il segnalibro non è definito.</b>	
<b>Figura 11:</b>	Condizioni sperimentali con digestato da FORSU diluito 1:10 senza pretrattamenti (noPT), dopo centrifugazione (AC), dopo filtrazione a 0.45 µm (AUF). .....	42
<b>Figura 12:</b>	Screening in piastra Petri dei ceppi <i>S. obliquus</i> (1 e 2) e <i>C. vulgaris</i> (3 e 4) su digestato da FORSU diluito 1:5 e 1:10 con ISO 8692 (DIG+ISO) o acqua di rete (DIG+TW).....	45
<b>Figura 13:</b>	Screening con Nile red sulle colonie microalgali dei ceppi <i>S. obliquus</i> (1 e 2) e <i>C. vulgaris</i> (3 e 4) coltivate su digestato 1:5 e 1:10 diluito con mezzo sintetico (ISO) e acqua di rete (TW) a differenti intensità di irradiazione luminosa (2.1 klux e 3.9 klux). L'immagine vede l'irraggiamento con luce UV dopo 20 minuti al buio dall'applicazione del colorante per identificare l'emissione da parte del reagente se legato a composti idrofobici.....	45
<b>Figura 14:</b>	Concentrazione di clorofilla a, b (Ch a e b) e carotenoidi totali nella biomassa di <i>C. vulgaris</i> e <i>S. obliquus</i> al termine del test in batch nelle condizioni di controllo (mezzo sintetico, ISO, e acqua di rete, TW) e sperimentali: digestato da FORSU 1:5 diluito con mezzo sintetico o acqua di rete (DIG+ISO e DIG+TW). .....	48
<b>Figura 15:</b>	a) Rimozione degli ioni (%) di <i>C. vulgaris</i> e <i>S. obliquus</i> nelle condizioni sperimentali in presenza di digestato da FORSU diluito 1:5 con acqua di rete (DIG+TW) o mezzo sintetico (DIG+ISO); b) Rimozione	

giornaliera in $\text{mg}_{\text{ione rimosso}} \text{g}_{\text{biomassa}}^{-1}$ nelle condizioni sperimentali in presenza di digestato da FORSU diluito 1:5 con acqua di rete (DIG+TW) o mezzo sintetico (DIG+ISO). .....	49
<b>Figura 16:</b> Produzione di biomassa del ceppo <i>C. vulgaris</i> acclimatato e rimozione di ammonica in presenza di digestato da FORSU (DIG-FORSU) e digestato vinicolo (DIG-WL) con diluizione 1:5. ....	51
<b>Figura 17:</b> a) conta cellulare e b) peso secco di <i>C. vulgaris</i> durante la coltivazione a due step. ....	59
<b>Figura 18:</b> Foto al microscopio ottico da banco con micrometro, ingrandimento 40X, al termine del primo ciclo di alimentazione in semi-continuo, identificando un ingrandimento delle cellule di <i>C. vulgaris</i> (diametro di 0.15 $\mu\text{m}$ al termine dell'HRT). ....	59
<b>Figura 19:</b> Output $\text{Na}^+$ , $\text{NH}_4^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Mg}^{2+}$ e $\text{Ca}^{2+}$ durante la coltivazione a due step batch e semi-continuo con DIG-WL. ....	60
<b>Figura 20:</b> Analisi del peso secco durante le alimentazioni con digestato da feccia di vinificazione in semi-continuo ad HRT di 47, 20 e 10 giorni. La linea tratteggiata indica i vari cicli di HRT. ....	62
<b>Figura 21:</b> Analisi della densità cellulare in termini di milioni di cellule $\text{ml}^{-1}$ durante l'alimentazione in semi-continuo applicando HRT di 47, 20 e 10 giorni. La linea tratteggiata indica i vari cicli di HRT. ....	63
<b>Figura 22:</b> a) Carta del rischio di percolazione di azoto nei suoli della pianura veneta e b) zone vulnerabili ai nitrati nel bacino scolante in laguna di Venezia (ARPAV Veneto). ....	69
<b>Figura 23:</b> Schema della sintesi dei lipidi nelle microalghe, modificato da Bellou et al. [223]. ACC: acetil-CoA carbossilasi; GPAT: glicerolo-3-fosfato aciltransferasi; G3P: glicerato-3-fosfato; ACP: proteina carrier acil-; LACS: sintetasi acil-CoA a lunga catena; KAS: 3-chetoacil-ACP sintetasi; ATP:CL: citrato liasi ATP-dipendente; CoA: coenzima A; LPAAT: aciltransferasi dell'acido liso-fosfatidico; DGAT: diacilglicerol aciltransferasi; LPAT: aciltransferasi lido-fosfatidicolina; FAS: sintetasi acidi grassi; PDB: complesso della piruvato deidrogenasi; FAT: tioesterasi acidi acil-ACP; TAG: triacilglicerolo; G3P: glicerato-3-fosfato. ....	75
<b>Figura 24:</b> Applicazione del trattamento in semi-continuo del sistema accoppiato DA-microalghe in un sistema di trattamento. La linea tratteggiata indica il tipico ricircolo della frazione liquida del digestato in un impianto, la linea verde indica il nuovo indirizzamento della frazione liquida per il ricircolo, la linea blu indica il processo di biogas upgrading per la produzione di biometano. ....	80
<b>Figura 25:</b> Schema di applicazione della feccia di vinificazione come substrato di crescita per la biomassa microalgale. ....	82
<b>Figura 26:</b> Sperimentazione di coltivazione di <i>C. vulgaris</i> in mixotrofia con feccia di vinificazione bianca e rossa diluita 1:10 a) all'inizio del test batch, b) al termine del test. ....	83
<b>Figura 27:</b> Analisi del peso durante la sperimentazione in batch con feccia di vinificazione bianca (WL) e rossa (RL) a diluizione 1:10, 1:5 e 1:2. ....	83
<b>Figura 28:</b> Monitoraggio del peso secco durante la coltivazione in batch su feccia di vinificazione rossa (RL), previa centrifugazione e filtrazione, a diluizione 1:5 e 1:2. ....	88
<b>Figura 29:</b> a) Ingrandimento 40X a microscopio ottico da banco della condizione di controllo al termine del test in batch in condizione 1:5; b) Ingrandimento 40X a microscopio ottico da banco della condizione sperimentale feccia rossa filtrata diluita 1:5 al termine della sperimentazione. ....	88
<b>Figura 30:</b> Schema del ciclo dell'acido citrico con identificazione dei punti della via metabolica dove interviene lo ione calcio. ....	90
<b>Figura 31:</b> a) PL, BU e WAS utilizzati per il test BMP; b) BU e BL utilizzate come substrato per i test BMP. ....	93
<b>Figura 32:</b> Test BMP per la biomassa di <i>C. vulgaris</i> : biomassa liofilizzata (BL), biomassa post congelamento (BU), biomassa liofilizzata + feccia rosa + fango attivo (BL+PL+WAS), biomassa post congelamento + feccia rosa + fango attivo (BU+PL+WAS), feccia rosa + fango attivo (PL+WAS) e condizioni di controllo (bianco). ....	94
<b>Figura 33:</b> Produzione specifica di biogas (SGP) ( $\text{Nl}_{\text{biogas}} \text{g}_{\text{TVS}}^{-1}$ ) per la degradazione della biomassa liofilizzata (BL), biomassa umida (BU), BL + feccia rosa + fango attivo (BL+PL+WAS), BU + feccia rosa + fango attivo (BU+PL+WAS) e feccia rosa + fango attivo (PL+WAS). ....	95

<b>Figura 34:</b> Confronto attività ( $\text{Nm}^3 \text{kg}_{\text{TVS}}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) del sistema DA nel test di BMP per la degradazione di a) biomassa microalgale liofilizzata (BL), b) biomassa microalgale umida (BU), c) feccia rosa e WAS (PL+WAS), d) BU + PL + WAS, e) BL + PL + WAS.....	97
--	----

## Indice delle tabelle

<b>Tabella 1:</b> Applicazione di <i>C. vulgaris</i> per il trattamento di digestato o acqua reflua in coltivazioni in batch e semi-continuo. ....	15
<b>Tabella 2:</b> Sintesi del piano sperimentale volto all'identificazione di un trattamento efficiente mediante microalghe del digestato e feccia di vinificazione.....	23
<b>Tabella 3:</b> Caratterizzazione digestato da FORSU.....	25
<b>Tabella 4:</b> Caratterizzazione del fango attivo (WAS), feccia di vinificazione bianca (WL), rossa (RL) e rosa (PL).....	26
<b>Tabella 5:</b> Caratterizzazione cationica ed anionica delle differenti condizioni sperimentali: ISO 8692 (ISO), acqua di rete (TW), digestato da FORSU diluito 1:5 con acqua di rete (DIG+TW) o mezzo sintetico (DIG+ISO) prima della coltivazione microalgale. ....	31
<b>Tabella 6:</b> Caratterizzazione dei differenti digestati proveniente dalle alimentazioni del sistema con feccia di vinificazione bianca (DIG-WL), rossa (DIG-RL) e rosa (DIG-PL) durante lo stato stazionario (SSC). . <b>Errore. Il segnalibro non è definito.</b>	
<b>Tabella 7:</b> Conta cellulare e tasso di crescita di <i>C. vulgaris</i> e <i>S. obliquus</i> nelle differenti condizioni metaboliche di crescita (autotrofia, mixotrofia ed eterotrofia) nelle condizioni di controllo ( $1 \text{ g l}^{-1}$ di glucosio) ed in presenza di digestato senza pretrattamenti (noPT), dopo centrifugazione (AC) e filtrazione (AUF) con diluizione 1:10. ....	43
<b>Tabella 8:</b> Conta cellulare, densità ottica (OD) e peso secco dei ceppi <i>C. vulgaris</i> e <i>S. obliquus</i> nelle differenti condizioni sperimentali: mezzo sintetico (ISO), acqua di rete (TW), digestato da FORSU diluito 1:5 con acqua di rete (DIG+TW) o mezzo sintetico (DIG+ISO). ....	47
<b>Tabella 9:</b> Composizione ionica iniziale e finale e rimozione percentuale ionica del mezzo di crescita in presenza di digestato da FORSU (DIG-FORSU) e da feccia di vinificazione bianca (DIG-WL) diluiti 1:5..	52
<b>Tabella 10:</b> Caratterizzazione della biomassa di <i>C. vulgaris</i> acclimatato in presenza di DIG-FORSU e DIG-WL in termini di percentuale totale di proteine, amido e lipidi e caratterizzazione della frazione lipidica (% w/w). ....	54
<b>Tabella 11:</b> Confronto produzione di biomassa, ceppi microalgali, mezzi di coltura, lipidi e composizione.	56
<b>Tabella 12:</b> Analisi di caratterizzazione dell'effluente uscente dal PBR in termini di concentrazione e rimozione di ammonio, polifenoli, sCOD e cromatografia anionica per DIG-WL, DIG-RL e DIG-PL pre- e post- trattamento microalgale (in e out) con l'applicazione di differenti HRT (47 e 20 giorni) con alimentazione a giorni alterni. ....	65
<b>Tabella 13:</b> Limiti di legge per lo scarico di reflui in acque superficiali ed in rete fognaria [209]. ....	67
<b>Tabella 14:</b> Caratterizzazione della biomassa microalgale di <i>C. vulgaris</i> coltivata su digestato vinicolo da feccia di vinificazione rossa, rosa e bianca con differenti HRT (47 e 20 giorni) con alimentazione a giorni alterni.....	70
<b>Tabella 15:</b> Caratterizzazione della frazione lipidica durante l'alimentazione in semi-continuo e confronto bibliografico. ....	73
<b>Tabella 16:</b> Valori teorici per l'applicazione dell'olio microalgale per la produzione di biodiesel in termini di CN, $\rho$ , $\delta$ , HHV e LHV.....	77
<b>Tabella 17:</b> Valori di crescita e composizione della biomassa di <i>C. vulgaris</i> coltivata in batch su feccia di vinificazione bianca (WL) e rossa (RL) a diluizione 1:10, 1:5 e 1:2 con i rispettivi controlli (BG11) in mixotrofia. ....	85

<b>Tabella 18:</b> Analisi di monitoraggio e composizione della biomassa al termine del test in batch su feccia di vinificazione rossa filtrata con diluizione 1:2 e 1:5 con i rispettivi controlli in BG11.....	89
<b>Tabella 19:</b> Quantificazione degli anioni e cationi in soluzione per le condizioni sperimentali con feccia di vinificazione rossa (RL) filtrata 0.2 $\mu\text{m}$ a diluizione 1:2 e 1:5.....	90
<b>Tabella 20:</b> Costanti di idrolisi ( $K_{\text{idrolisi}}$ ) e SMP sperimentale (produzione specifica di metano) per i vari substrati testati nel test BMP: biomassa liofilizzata (BL), biomassa umida (BU), BU + feccia rosa + fango attivo (BU+PL+WAS), BL + feccia rosa + fango attivo (BL+PL+WAS) e feccia rosa + fango attivo (PL+WAS).....	98
<b>Tabella 21:</b> Caratterizzazione effluente al termine del test BMP per i differenti substrati: biomassa liofilizzata (BL), biomassa umida (BM), BL + feccia rosa + fango attivo (BL+PL+WAS), BU + feccia rosa + fango attivo (BU+PL+WAS) e feccia rosa + fango attivo (PL+WAS). ....	100

## Acronimi

DA: Digestione anaerobica	TS: Solidi totali	$\delta$ : Viscosità
GHG: emissioni gas serra	TVS: Solidi totali volatili	HHV: Potere calorifero massimo
PBR: Fotobioreattore	TKN: Azoto totale di Kjeldahl	LHV: Potere calorifero minimo
S/I: Rapporto superficie - volume	P <sub>org</sub> : Fosforo organico	ACC: acetil-CoA carbossilasi
FORSU: Frazione organica dei reflui urbani	VFA: Acidi grassi volatili	GPAT: glicerolo-3-fosfato aciltransferasi
WAS: Fango secondario attivo	HRT: Tempo di ritenzione idraulica	G3P: glicerato-3-fosfato
WL: Feccia di vinificazione bianca	OLR: Velocità di carico organico	ME: enzima malico
RL: Feccia di vinificazione rossa	SGP: Produzione di gas specifica	ACP: proteina carrier acil-
PL: Feccia di vinificazione rosa	GPR: Velocità di produzione di biogas	LACS: sintetasi acil-CoA a lunga catena
RWE: Effluenti da produzione di vino rosso	SSC: Condizione di stato stazionario	KAS: 3-chetoacil-ACP sintetasi
WWE: Effluente da produzione di vino bianco	COD: Domanda chimica di ossigeno	ATP:CL: citrato liasi ATP-dipendente
DIG-WL: Digestato da feccia di vinificazione bianca	sCOD: Domanda chimica di ossigeno solubile	CoA: coenzima A
DIG-RL: Digestato da feccia di vinificazione rossa	Ch a: Clorofilla a	LPAAT: aciltransferasi dell'acido liso-fosfatidico
DIG-PL: Digestato da feccia di vinificazione rosa	Ch b: Clorofilla b	DGAT: diacilglicerol aciltransferasi
noTP: Assenza di pretrattamenti	ATP: Adenosinatrifosfato	LPAT: aciltransferasi lido-fosfatidicolina
AC: Dopo centrifugazione	AE: Abitanti equivalenti	FAS: sintetasi acidi grassi
AUF: Dopo centrifugazione e filtrazione	EPS: Esopolisaccaridi	PDB: complesso del piruvato deidrogenasi
ISO: Mezzo sintetico di crescita ISO 8692	BMP: Biometanazione	FAT: tioesterasi acidi acil-ACP
DIG+ISO: Digestato + mezzo sintetico di crescita ISO 8692	BU: Biomassa umida	TAG: triacilglicerolo
TW: Acqua di rete	BL: Biomassa liofilizzata	G3P: glicerato-3-fosfato
DIG+TW: Digestato + acqua di rete	BU+F+W: Biomassa umida + feccia + WAS	NADPH: nicotinammide adenina dinucleotide fosfato
	BL+F+W: Biomassa liofilizzata + feccia + WAS	ACCasi: Acetil-CoA carbossilasi
	F+F: Feccia + WAS	
	CN: Numero di centano	
	$\rho$ : Densità	



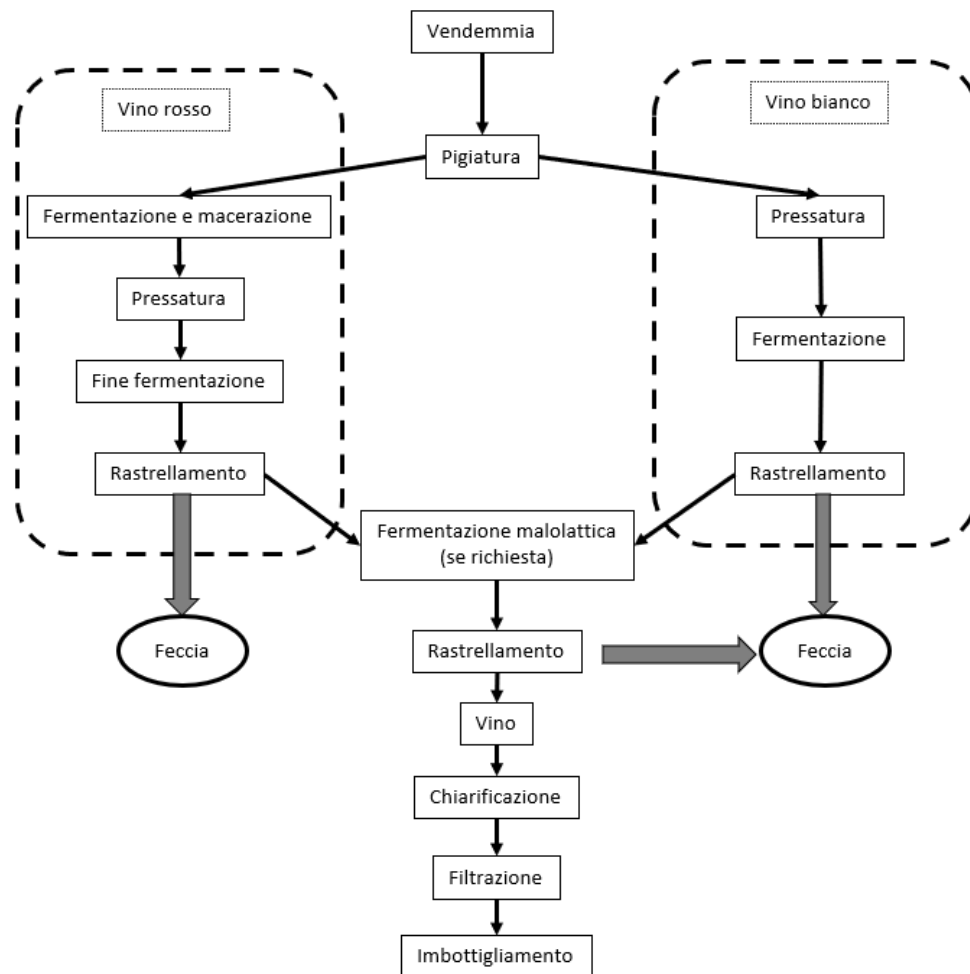
PDATs: fosfolipid-DAG aciltransferasi

# 1 Introduzione

Il primo capitolo riporta una introduzione generale al lavoro di tesi. Viene descritta la filiera produttiva del vino e la valorizzazione degli scarti mediante applicazioni biotecnologiche come la digestione anaerobica e l'utilizzo di microalghe in un processo integrato con un approccio circolare.

## 1.1 Produzione vinicola

In Italia, l'agricoltura risulta il settore più sviluppato ed economicamente importante e, nello specifico, la produzione vitivinicola rappresenta il settore agrario più rilevante del bacino mediterraneo, con terreni adibiti alla coltivazione di uva estesi su tutto il territorio nazionale. Le produzioni agricole hanno un impatto ambientale considerevole, come riportato dall'Organizzazione Agricola e del Cibo (FAO), in quanto l'agricoltura produce un rifiuto agricolo associato al prodotto finale volto alla vendita. Il rifiuto agricolo è stato correlato al quantitativo di terra fertile consumata per produrlo, corrispondente a 1.4 bilioni di ettari (28% delle terre coltivabili), e all'emissione di gas serra, 3.6 giga tonnellate l'anno di emissioni di CO<sub>2</sub> equivalenti. La produzione di rifiuto agricolo mondiale risulta ad oggi di 1.3 bilioni di tonnellate annue, con una previsione di crescita associata all'aumento della popolazione umana [1]. La produzione vitivinicola subisce, come tutte le produzioni agricole, l'impatto del rifiuto prodotto associato al prodotto finale, dove per rifiuto vitivinicolo si intende il rifiuto solido organico prodotto durante la lavorazione dell'uva, le emissioni CO<sub>2</sub>, le fecce di vinificazione e le acque reflue prodotti durante il processo di vinificazione. La produzione maggiore di rifiuti vitivinicoli si incentra maggiormente nei mesi autunnali (Settembre-Ottobre-Novembre) durante la vendemmia, ma in realtà, considerando le diverse fasi di lavorazione del vino, la produzione risulta annuale (i.e. botti per l'invecchiamento) [2-4]. Il processo di vinificazione è un processo complesso e legato fortemente al prodotto che si vuole ottenere. In generale, il processo di vinificazione, partendo dalla vendemmia, prevede vari step di trattamento: pressatura, fermentazione, sedimentazione/decantazione, maturazione, chiarificazione e, in fine, l'imbottigliamento [5]. La quantificazione del rifiuto vinicolo è estremamente complessa e dipendente da molteplici fattori, dalle tecnologie applicate per la produzione al dimensionamento della cantina. Tipicamente, per ettolitro di vino prodotto, si ha la produzione di 196 l di acqua reflua, 0.1 kg di fango attivo secondario (*waste activated sludge*, WAS) e 1.6 kg di feccia vinicola [6]. In Italia, la produzione annuale di vino risulta di 53 milioni di quintali e la produzione stimabile di feccia risulta di 2.140 milioni di quintali, considerando sia la feccia prodotta durante la vendemmia che quella ottenuta dall'invecchiamento in botte del vino [4].

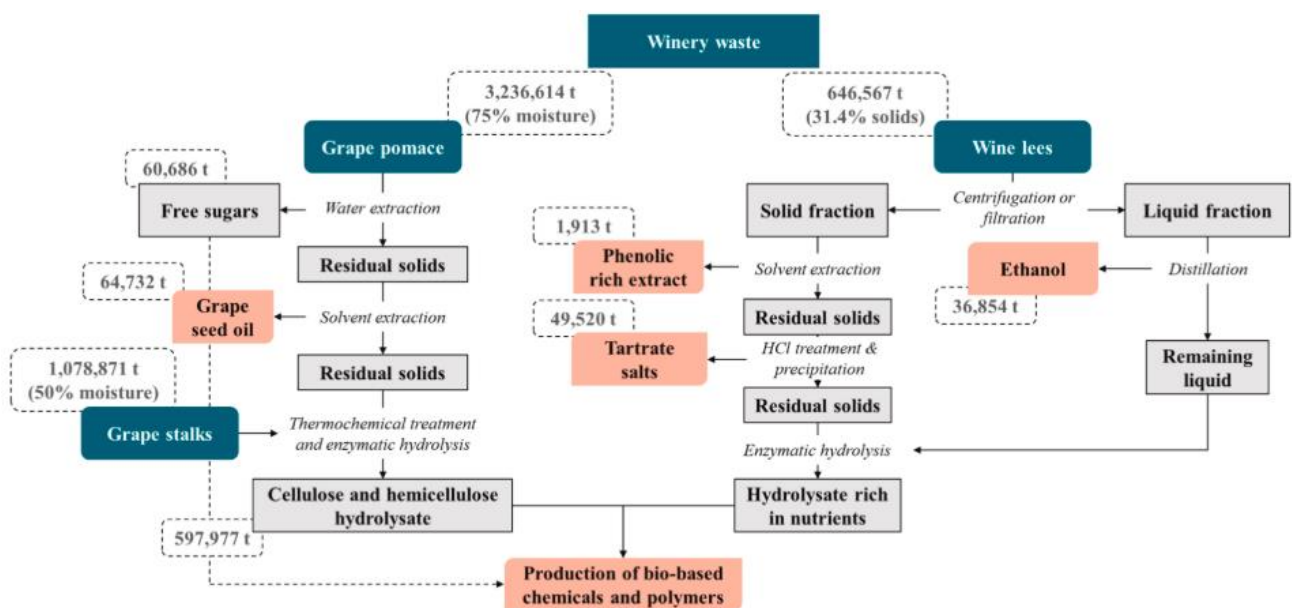


**Figura 1:** Processo di produzione del vino e identificazione dei processi produttivi che portano alla produzione della feccia di vinificazione (freccie grigie).

Ogni passaggio di lavorazione porta alla produzione di varie tipologie di scarti (polpa, feccia e acqua reflua); la feccia di vinificazione nella produzione vitivinicola gioca un ruolo cruciale per l'ottenimento di un prodotto di qualità. Infatti, la feccia di vinificazione favorisce la detossificazione naturale del prodotto finale da composti organici rilasciati dai microrganismi che effettuano la fermentazione. Tra i microrganismi che effettuano la fermentazione, ad esempio, vi sono funghi appartenenti alle specie *Penicillium* ed *Aspergillus*, che possono rilasciare sostanze tossiche come l'ocratossina A, microtossina cancerogena, ed il 4-etilfenolo e 4-etilguaicolo, prodotti dal lievito *Brettanomyces*, che causano un aroma di medicinale e di speziato al prodotto finale. La detossificazione di queste molecole dal vino risulta essenziale e tipicamente avviene tramite agenti chiarificanti, carbone attivo e bentonite, ma recenti studi hanno identificato la feccia come detossificante naturale per la loro rimozione [5]. In fine, la feccia di vinificazione gioca un ruolo cruciale nella produzione vitivinicola, in quanto interagisce con i composti polifenolici che danno le proprietà di colore ed organolettiche del prodotto finale (vino); liberano enzimi, grazie alla presenza di lieviti, permettendo l'idrolisi dei composti fenolici complessi in acido gallico o acido ellagico [7]. La feccia, ad

oggi, non trova applicazioni alternative, come accade invece per la vinaccia, rimanendo così un rifiuto con un costo di smaltimento [4]. Negli ultimi anni, la valorizzazione della feccia di vinificazione è stata studiata principalmente con il fine di recuperare sostanze di interesse, come antiossidanti e bioetanolo [8], ma con costi associati ancora elevati. Ioannidou et al. [9] hanno riassunto e quantificato i prodotti ad interesse economico ricavabili dal trattamento della feccia, distinguendo differenti trattamenti applicabili alle due frazioni, liquida e solida, post centrifugazione. La feccia rappresenta il 2-6 % della produzione vinicola italiana, corrispondente a 646,567 tonnellate annue, di cui il 31.4 % è frazione solida, con alte concentrazioni di biomassa (lievito) e di zuccheri, che può essere quindi convertita in idrolizzato ricco in nutrienti per via fermentativa. L'estrazione con solventi applicata alla frazione solida, porta ad un estratto ricco in fenoli; le rimanenze di questo processo possono essere ulteriormente trattate con HCl e precipitazione per ottenere sale tartrato. Con un approccio a cascata, anche la rimanenza di questo secondo passaggio può essere ulteriormente valorizzata con idrolisi enzimatica per ottenere un idrolizzato ricco in nutrienti per produzione di polimeri e composti chimici (Figura 2). La frazione liquida può essere invece distillata per il recupero dell'etanolo, mentre la rimanenza liquida può essere valorizzata mediante idrolisi enzimatica per ottenere un idrolizzato ricco in nutrienti per la produzione di polimeri e prodotti chimici.

La feccia di vinificazione, grazie alla presenza di zuccheri, può essere trattata anche mediante processi di fermentazione, la cui resa di conversione degli zuccheri in acidi grassi volatili risulta stimata al 50 %. Per questo motivo, lo sviluppo di questo processo di bioraffineria necessita di una disponibilità di carboidrati fermentabili superiore alle 100,000 tonnellate l'anno [10]. I reflui vinicoli prodotti in Italia, come per la Spagna e la Francia, possono fornire 164,103 tonnellate annue di carboidrati fermentabili da fecce di vinificazione, ma il processo di trattamento risulta ad oggi dispendioso [10].



**Figura 2:** Immagine estratta dal lavoro di Ioannidou et al. [10] per lo sviluppo del processo di bioraffineria per l'estrazione di prodotti secondari ad alto valore aggiunto per la feccia di vinificazione. La quantificazione del refluo vinicolo viene riportata in valore umido ed i composti estratti su base secca.

La produzione vinicola italiana ha subito negli anni cambiamenti relativi alle metodologie di coltivazione, gestione e produzione associate al loro impatto ambientale. La necessità di modificare le pratiche vitivinicole risulta necessaria in risposta al cambiamento climatico in corso, dove l'aumento delle temperature e la variazione delle precipitazioni hanno influenzato fortemente questo settore, influenzando sulle produzioni e qualità dei prodotti finali [11–13]. Dal punto di vista socio-economico, il cambiamento climatico ha colpito in modo estremamente negativo il settore della produzione vitivinicola, portando ad una diminuzione dell'8% della produzione a livello globale. Eventi internazionali, quali Vinitaly ed Enoforum (2013-2014), hanno posto l'attenzione sulle applicazioni innovative per il trattamento e valorizzazione dei reflui vitivinicoli, mostrando l'interesse da parte dei produttori italiani nella ricerca ed innovazione nell'ambito dell'economia circolare [13,14].

Lo studio della produzione vitivinicola vede inoltre un ambiente particolare nel panorama italiano; la produzione di vino annua (51 milioni di ettolitri) distribuita su 795,000 ettari di terreno fertile è affidata a diverse classi di produttori: piccole aziende private familiari (42-46%), cooperative che trattano le uve di piccoli produttori (42-46%) e da grandi enti privati che trasformano le uve di terzi (8-16%).

In conclusione, la produzione vitivinicola italiana è composta principalmente da entità familiari, che a loro volta influenzano il panorama regionale italiano in termini di produzione percentuale di vino. Tra le regioni italiane, il Veneto spicca nella produzione vitivinicola coprendo sul mercato il 17.1% di tutto il vino prodotto annualmente in Italia.

Lo scenario che si mostra analizzando le produzioni e le tipologie di aziende che cooperano nella produzione vitivinicola, sottolinea la forte influenza delle piccole aziende, che necessitano dell'identificazione di nuove metodologie di coltivazione e gestione del rifiuto applicabili, e di semplice gestione, per i piccoli produttori. L'identificazione di applicazioni alternative del refluo vinicolo, anche rivolte ad un aumento del guadagno per le piccole aziende, potrebbe portare ad una riduzione dell'impatto ambientale con una riduzione della pratica di travaso ambientale non autorizzato, che avviene tipicamente in fognatura o nei corsi d'acqua [15–17].

### 1.1.1 Normativa

La normativa che regola la produzione vitivinicola e lo smaltimento del refluo ad esso associato è la legge 234/2016 “Disciplina organica delle coltivazione della vite e della produzione e del commercio del vino”, Gazzetta Ufficiale n. 302 del 28 dicembre 2016, conosciuta come “Testo Unico del vino”. Le indicazioni relative allo smaltimento e stoccaggio delle fecce di vinificazione definiscono [18,19]:

- *Che la feccia uscente dall'impianto di vinificazione deve avere un tenore alcolico di minimo 4 litri di alcol anidro/100 kg;*
- *Il divieto di sovrappressione delle fecce e rifermentazione delle vinacce per scopi diversi dalla distillazione o produzione del vinello (allegato VI, lettera D, regolamento CE n.479/2008);*

- *Che prima del trasporto esterno dalla cantina le fecce debbano essere denaturate con modalità specifiche utilizzando sostanze rivelatrici e segnalate sul registro telematico;*
- *Che la consegna dei sottoprodotti (fecce e vinacce) ad un distillatore (art. 14 della legge n. 82 del 20 febbraio 2006) o ritiro sotto controllo (art.5) debba essere effettuato entro il 30esimo giorno dalla svinatura del vino;*
- *Che le fecce ad uso agronomico debbano essere denaturate con solfato ferroso alla dose di 100 grammi/100 kg;*
- *L'esonero di consegna in distilleria e ritiro sotto controllo delle fecce di vinificazione per i produttori con produzione di mosto fino a 25 hl, per produttori di vini spumanti e frizzanti di qualità di tipo aromatico con mosti di uve o mosti di uve parzialmente fermentati acquistati e sottoposti a trattamenti di stabilizzazione per eliminare le fecce;*
- *Che risulta consentita la cessione di fecce e vinacce non ancora avviate alla distillazione tra distillerie autorizzate ed utilizzatori di sottoprodotti della trasformazione dei prodotti vitivinicoli a scopo energetico.”*

Nello specifico, durante la vendemmia, il ritiro delle fecce di vinificazione deve essere effettuato entro il 31 luglio di ciascuna campagna, prendendole in carico il giorno stesso in cui vengono separate dai mosti e dai vini. Lo smaltimento sotto controllo delle fecce o delle vinacce viene permesso in toto o in parte a tutti i produttori vinicoli, e la loro applicazione potrà essere in ambito agronomico diretto, indiretto (compostaggio), prodotti agroalimentari (vitamine, agenti microbici, antiossidanti [20]), energetico o farmaceutico/cosmetico.

L'unica deroga ad ora presente per lo smaltimento delle fecce riguarda la lavorazione di alcuni vini ungheresi e slovacchi, dove la filiera produttiva prevede il trattamento di pressatura della feccia/mosto, che costituisce la caratteristica essenziale del vino. I vini in considerazione vedono il “Tokaji fordítás” o il “Tokajský fordítás”, che si ottengono dal versamento del mosto o vino su pasta di «aszú»/«výber» pressata, e il “Tokaji másolás” o il “Tokajský másolás”, che si ottiene dal versamento del mosto o vino su fecce di «szamorodni»/«samorodné» o di «aszú»/«výber». L'unico vincolo presente per questa tipologia di vino è l'uso di prodotti provenienti dalla stessa vendemmia.

Le violazioni al Testo unico del vino prevedono sanzioni amministrative pecuniarie:

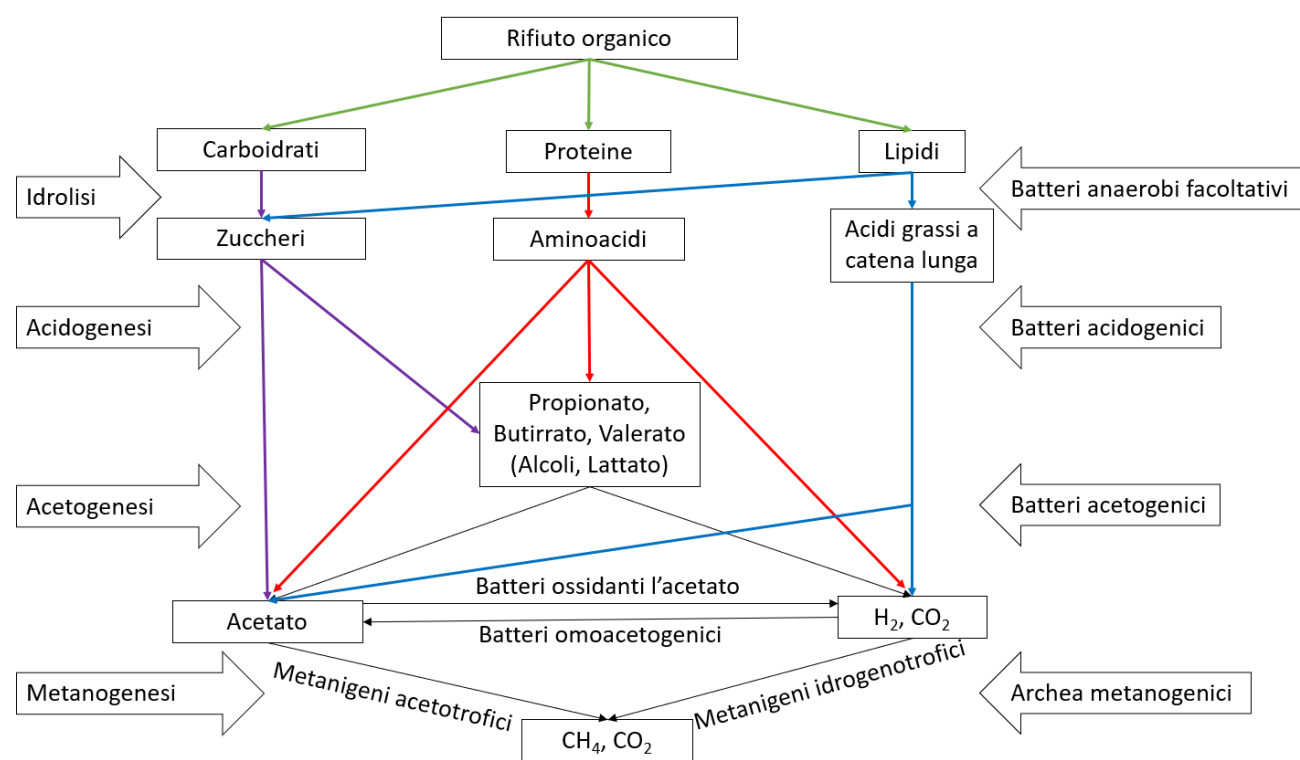
- *“Violazione all'eliminazione dei sottoprodotti previsti dall'allegato VIII, parte II, lettera D, del regolamento (UE) n. 1308/2013 comportano sanzioni amministrative pecuniarie: da 15 euro a 75 euro per ogni 100 chilogrammi di prodotto;*
- *Violazione del divieto di rifermentazione comporta una sanzione pecuniaria amministrativa da 45 a 250 euro per ogni 100 chilogrammi di prodotto e comunque non inferiore a 250 euro. Se vi è la reiterazione dell'illecito, la sanzione amministrativa pecuniaria viene raddoppiata e vi è l'applicazione di una sanzione accessoria della chiusura dell'impianto da tre mesi ad un anno;*

- *Dall'art. 63 del testo unico, chiunque non denatura le fecce di vino prima dell'estrazione dalla cantina con le sostanze rilevatrici individuate dal decreto di cui l'articolo 13, comma 5, e chi impiega la sostanza denaturante in difformità delle modalità previste ai sensi del medesimo comma, è soggetto alla sanzione amministrativa pecuniaria da 100 euro a 5.000 euro e l'infrazione è diffidabile sono per quantitativi inferiori a 2 tonnellate;*
- *Chiunque non avvia alle distillerie autorizzate le vinacce e le fecce di vino in violazione delle disposizioni dell'articolo 13, comma 2 è soggetto alla sanzione amministrativa pecuniaria da 100 euro a 1.000 euro."*

Il trasporto della feccia di vinificazione, come richiesto da normativa, ammonta a 100 €/ton [21] comportando un impegno economico considerevole, considerando il quantitativo di feccia prodotta annualmente anche nelle piccole industrie vitivinicole. La normativa che prevede la consegna della feccia in distilleria è stata redatta onde evitare sovrappressioni o torchiature eccessive al fine di produrre vini scadenti, contrabbando o frode ed evitare al massimo il travaso non autorizzato in corsi d'acqua o sul terreno.

## 1.2 Digestione anaerobica

La digestione anaerobica (DA) è un processo biotecnologico adoperato per la degradazione della sostanza organica in assenza di ossigeno (anaerobiosi), ottenendo come prodotti in uscita dal sistema il biogas ed il digestato [22]. Il funzionamento del sistema DA si basa sul sistema sintrofico delle popolazioni batteriche che collaborano nella degradazione del rifiuto organico. Come riportato in Figura 3, nel processo DA avvengono le reazioni di idrolisi, acidogenesi, acetogenesi e metanogenesi tramite un processo sintrofico dei microrganismi, quindi con un approccio "multi-step biochimico". Effetti inibitori per il sistema DA sono l'accumulo di ammoniaca e acidi grassi volatili (VFA) prodotti dai processi degradativi delle proteine e dei lipidi [23].



**Figura 3:** Schema del sistema sintrofico negli impianti di digestione anaerobica.

Diverse ricerche si sono incentrate sullo studio del trattamento di differenti substrati nei processi di DA, dai reflui e rifiuti organici industriali e municipali, reflui zootecnici, rifiuti agricoli ad acque reflue da impianto di trattamento acque [24].

Il refluo di vinificazione è caratterizzato da un alto valore di domanda chimica di ossigeno (COD, tipicamente nella frazione solubile) un'alta concentrazione di zuccheri, polifenoli, acidi organici ed etanolo [6,25–27]. La caratterizzazione della feccia di vinificazione mostra la presenza di microrganismi (lieviti, che hanno permesso precedentemente la fermentazione alcolica del vino), polifenoli, lignina, metalli, proteine, sali organici (tartrati), bucce, semi, grappoli e piccioli, pH estremamente bassi (circa 3), alta domanda chimica di ossigeno (COD) ed alta domanda biologica di ossigeno (BOD) che ne impedisce il rilascio ambientale in termini di legge e necessita di pretrattamenti [18]. Dal punto di vista ambientale, il rilascio di feccia sul suolo causa carsismo delle componenti calcaree, in ambiente anaerobico comporta la produzione di metano ed anidride carbonica con alto rischio esplosivo ed in ambiente acquatico comporta una sterilizzazione del biota [17]. In generale, il trattamento del refluo di vinificazione mediante DA risulta ad oggi poco esplorato, identificando però la necessità di co-digestione con fanghi secondari (WAS) [6] o altri residui dei processi di produzione del vino (feccia o scarti pressati) [28] nell'ottica di incrementare la produzione di biogas, rendendo così il sistema DA economicamente vantaggioso. Tra i vari rifiuti vinicoli che si possono ottenere dalla produzione vitivinicola, la feccia di vinificazione, o feccia vinicola, risulta un interessante substrato per i sistemi DA data l'alta biodegradabilità, alto contenuto organico, disponibilità annuale associata all'invecchiamento in botte, e richiesta di trattamenti prima del successivo smaltimento



[6,29]. La feccia di vinificazione è tipicamente composta dal 10.4 % di proteine, 1.2 % acidi grassi, 5.6 % di ceneri e 20.7 % di acido tartrarico [9]. Per quanto la produzione di feccia di vinificazione risulti annuale, durante il periodo autunnale vi è un incremento considerevole di produzione; l'applicazione di un impianto di trattamento dei reflui di vinificazione necessita quindi di una flessibilità del sistema in risposta alle fluttuazioni di reflu prodotto durante l'anno [10].

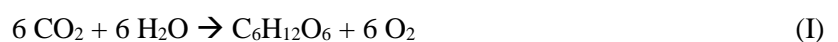
La possibilità di utilizzo della feccia di vinificazione nei sistemi DA deve infine considerare le diverse tipologie di fecce ottenibili dalla produzione vinicola. Vi è una distinzione relativa alla tipologia di vino prodotto, rosso o bianco, che determina la produzione di fecce rosse e bianche e una miscela delle due ("rosa") derivante principalmente dai consorzi che producono insieme vini rossi e bianchi, ed è associata alle condizioni operative dei sistemi di produzione ed uva utilizzata. Date le sue caratteristiche e la necessità di trattamento, Ioannou et al. (2015) hanno testato le efficienze di trattamento della feccia in DA mostrando performance inferiori per effluenti da vino rosso (RWE) rispetto agli effluenti da vino bianco (WWE) posti nelle medesime condizioni operative (mesofilia), con una rimozione del COD inferiore, 85% e 92% e  $0.24 \text{ l g}^{-1}_{\text{CODrimosso}}$  e  $0.35 \text{ l g}^{-1}_{\text{CODrimosso}}$  per RWE e WWE rispettivamente [10]. Queste differenze di performance sono legate alle differenti caratteristiche dei reflui da vinificazione rossa e bianca, dove un esempio è la concentrazione di acido acetico che risulta maggiore del 25% nel WWE rispetto al RWE [30]. Le caratteristiche chimico-fisiche della feccia di vinificazione sono associate a diversi fattori che comprendono il processo di vinificazione effettuato, il tipo di uva trattata e lo stoccaggio dell'effluente [31]. Tipicamente la feccia contiene un alto valore di composti organici biodegradabili, tra cui lieviti, acidi organici e proteine, un basso contenuto di solidi volati associato alla presenza di bentonite, materiale inerte, che viene applicato per la rimozione delle particelle colloidali e dei solidi sospesi durante la produzione del vino [29]. Nella feccia di vinificazione la maggior parte del COD è rappresentata dalla frazione solubile contenente zuccheri, acidi grassi e alcool, con alte concentrazioni di azoto e fosforo associate alle metodologie di vinificazione applicate [6]. Data la variabilità della feccia di vinificazione, legata all'uva utilizzata e metodologie di produzione del vino, per comprendere l'applicabilità nei sistemi di trattamento biologici di questo rifiuto risulta essenziale una valutazione del trattamento su tutte le tipologie di fecce che possono essere ottenute dal processo di vinificazione (feccia bianca, rossa e rosa) nel lungo periodo. La ricerca sull'applicazione di processi DA per il trattamento della feccia risulta ridotta. Pochi lavori hanno valutato l'applicazione della feccia, tra cui Hungria et al. [31], trattandola in DA in condizione di mesofilia, ha identificato una produzione di metano di  $315 \text{ L}_{\text{STP}} \text{ CH}_4 \text{ kg}_{\text{VS}}^{-1}$  associato all'alta biodegradabilità della feccia di vinificazione (52.92%). I valori risultano confrontabili con quelli ottenuti da Da Ros et al. [29] in test in batch di bio-metanazione (BMP), con  $488 \text{ L}_{\text{STP}} \text{ CH}_4 \text{ kg}_{\text{VS}}^{-1}$ . Montalvo et al. [28] sottolinea la necessità di una co-digestione feccia-WAS per incrementare la produzione di metano, dove nei test di BMP porta ad una produzione di  $876 - 690 \text{ L}_{\text{STP}} \text{ CH}_4 \text{ kg}_{\text{VS}}^{-1}$ . Da Ros et al. [32] definisce come OLR applicabile per il trattamento mesofilo in DA della feccia valori inferiori a  $3.2 \text{ kg}_{\text{COD}} \text{ m}^3 \text{ }^{-1} \text{ d}^{-1}$ , applicando un HRT di 23 giorni; in un anno di sperimentazione utilizzando sola feccia di vinificazione bianca, l'SGP ottenuto è di  $0.38 \text{ Nm}^3 \text{ kg}_{\text{CODalimento}}^{-1}$  con una composizione del 65 % di metano durante l'SSC. Applicando feccia di vinificazione bianca, contenete un

valore esiguo di polifenoli, non è stato identificato un effetto inibitorio legato alla presenza di polifenoli, ma la presenza di rame, legata ai sistemi di trattamento dell'uva durante la coltivazione, e ammoniaca potrebbero influire negativamente sull'attività batterica all'interno del sistema DA, diminuendo la produzione di biogas su lungo termine. Le caratteristiche del digestato ottenuto da Da Ros et al. [32] mostra valori di solidi totali e volatili nel digestato di  $23.0 \pm 3.7 \text{ g}_{\text{TS}} \text{ kg}^{-1}$  e  $16.1 \pm 3.2 \text{ g}_{\text{VS}} \text{ kg}^{-1}$  rispettivamente, dove la frazione volatile rappresentava il 65 % del totale. Il trattamento DA in mesofilia ha portato un abbattimento dell'88 % della frazione polifenolica in uscita dal sistema ( $51 \pm 8.2 \text{ mg}_{\text{a.gallico equivalenti}} \text{ l}^{-1}$ ). La concentrazione di ammoniaca in uscita dal sistema è risultata di  $1.29 \pm 0.25 \text{ g}_{\text{N-NH}_4} \text{ l}^{-1}$ , COD totale  $15.3 \text{ g}_{\text{COD}} \text{ kg}^{-1}$  di cui solo il 15 % solubile ( $1167 \pm 841 \text{ mg}_{\text{sCOD}} \text{ kg}_{\text{ww}}^{-1}$ ), pH di  $7.8 \pm 0.2$ , alcalinità parziale e totale di  $3.42 \pm 0.58 \text{ g}_{\text{CaCO}_3} \text{ l}^{-1}$  e  $5.28 \pm 0.84 \text{ g}_{\text{CaCO}_3} \text{ l}^{-1}$  rispettivamente. Dato sicuramente interessante è relativo alla concentrazione dei metalli nel digestato, che potrebbero avere effetto inibente per il potenziale utilizzo come substrato per la coltivazione di microrganismi, come identificato da Da Ros et al. [32] che evidenzia concentrazioni di zinco ( $1199 \text{ mg kg}_{\text{dw}}^{-1}$ ), rame ( $929 \text{ mg kg}_{\text{dw}}^{-1}$ ), piombo ( $115 \text{ mg kg}_{\text{SS}}^{-1}$ ), cromo ( $48 \text{ mg kg}_{\text{dw}}^{-1}$ ), nickel ( $26 \text{ mg kg}_{\text{dw}}^{-1}$ ), cadmio ( $1.6 \text{ mg kg}_{\text{dw}}^{-1}$ ) e mercurio ( $0.4 \text{ mg kg}_{\text{dw}}^{-1}$ ). Per quanto la maggior parte dei metalli identificati risulti non elevata, rame e zinco mostrano valori molto elevati associati alla tipologia di feccia che può contribuire fino al 70 % per il rame in entrata nel sistema DA. L'aumento dei metalli pesanti nell'effluente DA può essere il fattore limitante il trattamento.

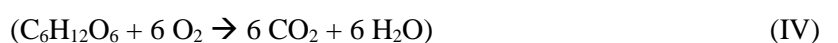
### 1.3 Microalghe

Le microalghe sono microrganismi eucarioti fotosintetici, ubiquitari in ambiente acquatico. Ad oggi sono note circa 30,000 specie, ma ne è stato ipotizzato un numero nettamente maggiore [33]. La classificazione delle specie microalgali vede una prima classificazione sulla base del *pathway* metabolico utilizzato per la produzione di adenosintrifosfato (ATP), dalla quale si ricavano tre macrocategorie (Figura 4) [34]:

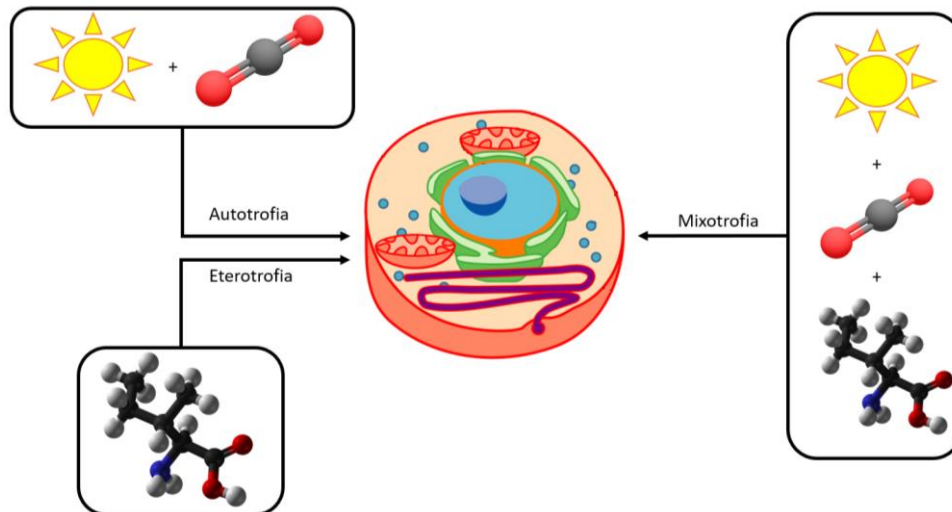
- Autotrofe o fototrofe: dove l'organizzazione del carbonio inorganico (Reazione I) è dipendente da una prima fase "luce dipendente" (Reazione II) ed una successiva fase "luce indipendente" (Reazione III) che permette l'ossidazione riduzione del carbonio inorganico della  $\text{CO}_2$ , che viene ridotto a materiale organico, e l'acqua viene ossidata ad  $\text{O}_2$  che viene rilasciato nell'ambiente.



- Eterotrofe: l'energia per la produzione di ATP è associata al consumo di substrato organico come donatore di elettroni (Reazione IV).



- Mixotrofiche: la produzione di ATP è associata sia all'attività fotosintetica che al consumo di substrato organico.



**Figura 4:** Schema del metabolismo autotrofo, mixotrofico ed eterotrofo.

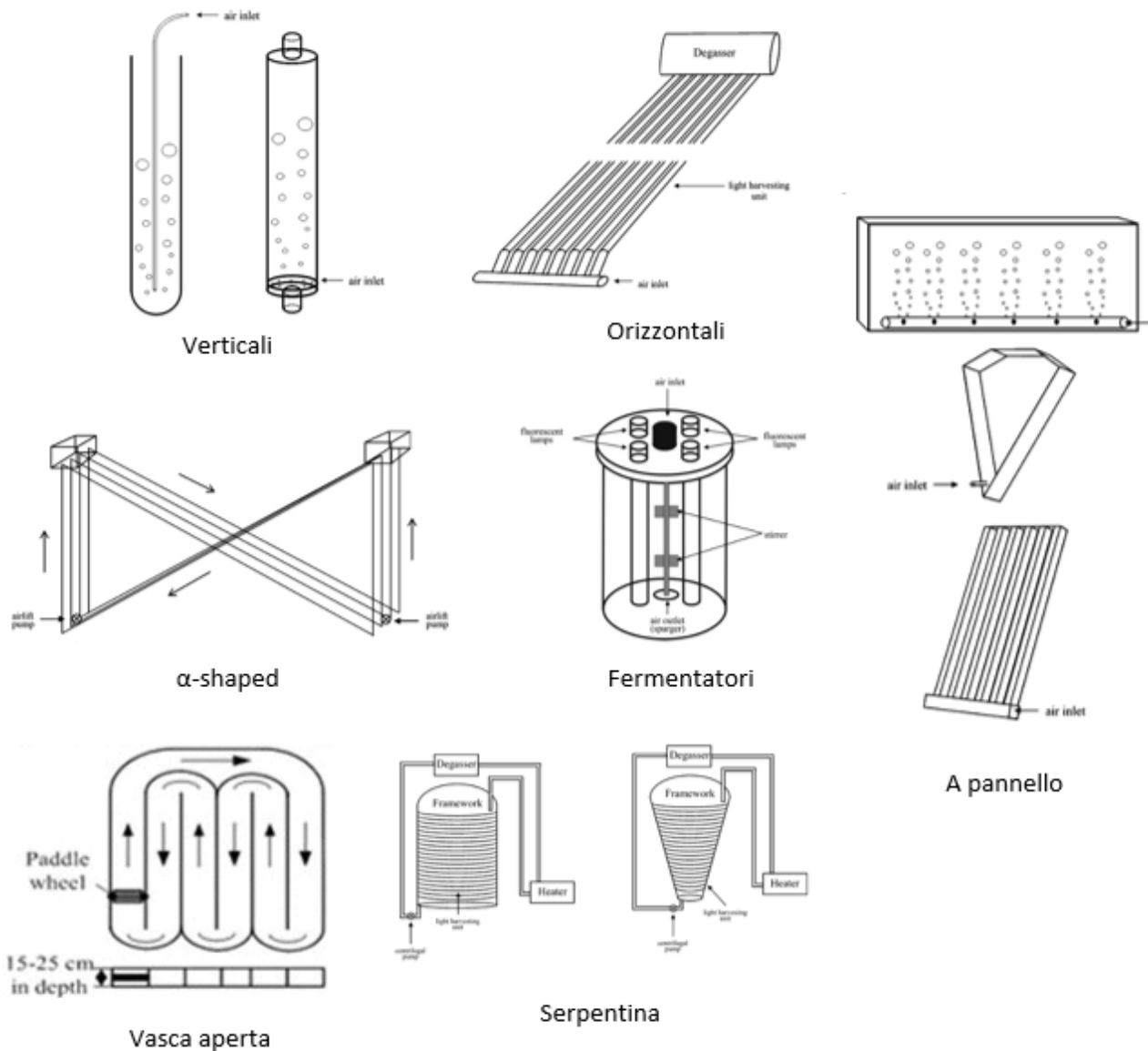
Tra le tre classi di metabolismi, il metabolismo mixotrofico risulta il più vantaggioso per la proliferazione microalgale in quanto l'aumento della biomassa prodotta è associato al maggior quantitativo di ATP prodotto grazie all'uso sia del sistema fotosintetico sia del consumo dei substrati organici. Data la capacità metabolica e la possibilità di utilizzare il metabolismo mixotrofico, la presenza di microalghe nei corsi d'acqua risulta abbondante, associata all'assimilazione di composti essenziali per la riproduzione cellulare, quali azoto, fosforo e metalli e all'attività fotosintetica [1].

Un'altra classificazione delle microalghe vede la distinzione sulla base morfologica (flagelli, corpi inclusi, composizione della membrana) e di colorazione, in quanto, essendo microrganismi fotosintetici, accumulano pigmenti necessari per effettuare la fotosintesi. Questa classificazione porta a sette gruppi tassonomici: Cyanophyta, Chlorophyta, Chrysophyta, Euglenophyta, Phaeophyta, Pyrrophyta e Rhodophyta [35]. La morfologia delle specie microalgali è estremamente variabile, da forma sferica a bastoncino, fuso, mezzaluna o spirale [36]. Essendo cellule eucariote, contengono organelli cellulari, nucleo, vacuolo e cloroplasto. Il cloroplasto contiene un DNA circolare e le clorofille per la fotosintesi. In generale, tutte le microalghe contengono clorofilla *a* ed altri tipi di clorofille che possono essere specie specifiche e permettono l'assorbimento di specifiche lunghezze d'onda della luce per la produzione di energia tramite la fotosintesi [36].

Nella coltivazione industriale delle microalghe ci sono due fattori importanti da prendere in considerazione; il primo riguarda la tipologia di metabolismo applicabile per le produzioni di prodotti secondari ad alto valore aggiunto/biomassa, il secondo riguarda le tipologie di reattori utilizzabili per la coltivazione. Il metabolismo microalgale influisce sulla tipologia di reattore che verrà utilizzato per la coltivazione, infatti l'applicazione di coltivazioni eterotrofe risulta vantaggiosa dal punto di vista reattoristico, in quanto richiede reattori più semplici (*tank* chiusi ed oscurati) e con minor superficie necessaria alla coltivazione, ma richiede elevate fonti di carbonio, che devono risultare economiche, ed un elevato rischio di contaminazione [37]. L'applicazione di coltivazione mixotrofiche può risultare la chiave di volta nelle coltivazioni microalgali, in quanto offre il miglior *carbon footprint* associato all'uso di carbonio inorganico ed organico [38]. Data la richiesta di nutrienti elevata per la coltivazione microalgale, l'applicazione di reflui, che forniscono i nutrienti essenziali (C, N, P, Fe, K, S, etc), può portare ad un abbattimento dei costi produttivi ed un effetto fitodepurativo del refluo [39]. In particolare, l'azoto presente nel refluo viene assimilato nella biomassa microalgale sia in forma inorganica ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ) sia in forma organica (urea o amminoacidi) [40]. La concentrazione di azoto nella coltura gioca un ruolo cruciale nella coltivazione microalgale, in quanto se superiore a  $160 \text{ mg l}^{-1}$  risulta tossico [41], mentre se limitante nel mezzo, al termine della coltura, comporta un arresto della proliferazione della biomassa ed accumulo di lipidi fino al 33 % - 38 % nella biomassa al termine della coltivazione [42]. Altro elemento fondamentale per la proliferazione microalgale è il fosforo che, contrariamente all'azoto e carbonio ottenibili da fonti rinnovabili, risulta reperibile principalmente da fonti non rinnovabili (rocce fosfatiche fossili). L'applicazione di reflui per la coltivazione microalgale comporta un apporto di fosforo, in differenti forme; in particolare, l'ortofosfato risulta la forma più facilmente assimilabile dalle microalghe [43,44]. L'applicazione di reflui per la coltivazione microalgali permette dunque di effettuare un'eutrofizzazione controllata del refluo, dove per eutrofizzazione si intende una proliferazione eccessiva delle specie microalgali in acque contaminate comportando anossia dell'ambiente acquatico; l'applicazione in reattori chiusi porta alla depurazione dell'acqua contaminata e produzione di biomassa microalgale applicabile per la produzione di prodotti secondari ad alto valore aggiunto [1].

Dal punto di vista reattoristico, i reattori utilizzabili per le coltivazioni mixotrofiche delle microalghe possono essere di diverse tipologie, come riportato in Figura 5. Il reattore più semplice risulta il fotobioreattore (PBR) tubolare verticale/orizzontale, cioè un reattore *airlift* o colonna a bolle, trasparente per permettere la penetrazione dell'irradiazione luminosa e con insufflaggio di aria tramite gorgogliamento. Questa tipologia di reattore risulta la più semplice ed economica in quanto composta da tubi in polietilene rigidi o *bags*. Il problema associato a questa tipologia di reattori risulta il rapporto superficie/volume (S/I), che se elevato e con alte densità cellulari non permette un'illuminazione omogenea in tutto il reattore. Per ovviare a questo limite è necessario ridurre il diametro del reattore, trasformandolo in un PBR di tipo "capillare". Altra tipologia reattoristica per la coltivazione microalgale è il sistema "a pannello", con spessore di pochi centimetri, risolvendo il problema del rapporto S/I. Questo sistema permette il cambio di inclinazione del PBR, ottenendo quindi l'assorbimento massimo della luce solare incidente

perpendicolarmente al reattore. Per la coltivazione in sistemi aperti, tipicamente vengono utilizzati reattori a vasca aperta, dove la coltura microalgale occupa pochi centimetri di profondità ed il movimento viene conferito da un sistema a pale rotanti. Per quanto questa tipologia reattoristica risulta estremamente economica, mostra una serie di svantaggi, tra cui l'evaporazione o diluizione del mezzo di coltura associata alle condizioni climatiche e all'alto tasso di contaminazione. Recentemente sono stati sviluppati anche reattori "misti" o con conformazioni particolari, quali a serpentine, fermentatori ad illuminazione interna, che risultano però costosi sia dal punto di vista di costruzione che di gestione dell'impianto [45].



**Figura 5:** Le diverse tipologie reattoristiche per la coltivazione microalgale in mixotrofia (da Carvalho et al. [45]).

### 1.3.1 Accoppiamento dei processi microalghe-DA

La valutazione della crescita microalgale su reflui per l'identificazione di un trattamento biologico terziario efficiente, è stata valutata sia su singole specie microalgali che su consorzi microalgali o microalghe-batteri [46,47]. L'applicazione di policolture microbiologiche come trattamento terziario dei reflui mostra vantaggi nella robustezza ed efficienza del trattamento, influenzando positivamente la depurazione del refluo tramite l'effetto sintrofico associato alle colture miste (come nei sistemi di digestione anaerobica) ed incremento della robustezza del sistema in risposta a variazioni ambientali e resistenza a patogeni [46,48,49]. Tra i molteplici studi di applicabilità dei ceppi microalgali nel trattamento dei reflui, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis salina* e *Chlorella pyrenoidosa*, sono risultate le specie microalgali più studiate [1,46,50].

Tra i reflui maggiormente studiati per l'applicazione come substrato di crescita di colture microalgali, l'effluente di digestione anaerobica (digestato) ha mostrato grandi potenzialità di utilizzo data l'abbondanza di ammonio e fosforo. Le problematiche associate all'applicazione di questo sistema di trattamento sono principalmente associate alla necessità di irradiazione luminosa per le colture mixotrofiche, in quanto la torbidità del digestato e la sua presenza di solidi sospesi impediscono la penetrazione dell'irradiazione luminosa [51]. L'applicazione del digestato come substrato di crescita microalgale necessita quindi di pretrattamenti prima della suo utilizzo, quali filtrazione [52], sedimentazione [53], sterilizzazione [54], diluizione [55], centrifugazione [56], ozonazione [54], fino al trattamento con ultravioletti [57]. L'aumento dei pretrattamenti necessari implica un aumento dei costi del sistema e per questo motivo si ricercano metodologie con minor impatto economico [1].

Il digestato è caratterizzato da alte concentrazioni di ammonio che ne limita il suo utilizzo; l'ammonio risulta inibente per la proliferazione microalgale a concentrazioni specie-specifiche anche se rappresenta la principale fonte di azoto per la proliferazione microalgale [58]. L'ammonio presente nel digestato si trova in due forme dipendenti dal pH della soluzione, la forma protonata,  $\text{NH}_4^+$  (ammonio), risulta predominante a pH maggiori di 9, mentre la forma gassosa,  $\text{NH}_3$  (ammoniaca), a pH inferiori di 8 [1]. La tossicità dell'ammonio per le microalghe è strettamente legata al suo trasporto attivo e passivo attraverso la membrana cellulare. Tipicamente l'ammonio viene trasportato attivamente attraverso la membrana, con una assunzione regolata, ma ad alte concentrazioni l'assimilazione avviene passivamente comportando un effetto tossico sulla coltura [59]. L'effetto tossico dell'ammonio sulle colture microalgali è associato alla sua interazione con l'apparato fotosintetico, dove distrugge o inibisce il complesso del fotosistema II nel cluster del manganese (PSII) [60], inibendo il trasporto degli elettroni nella fotofosforillazione [61] e comportando un aumento di equivalenti redox che interferiscono con i processini di ossidazione mitocondriale per il trasporto degli elettroni generando una produzione elevata di specie reattive dell'ossigeno (ROS) [62]. Per ovviare all'inibizione della proliferazione microalgale associata alle elevate concentrazioni di ammonio nel digestato ( $> 400 \text{ mg l}^{-1}$ ) tipicamente si effettua una diluizione dell'effluente, portando la concentrazione di ammonio in soluzione tra i  $50 \text{ mg l}^{-1}$  e i  $100 \text{ mg l}^{-1}$  [63–65].

Recenti studi hanno approfondito alcune strategie di ottimizzazione del processo basato sull'uso del digestato come substrato per la coltivazione microalgale, per esempio attraverso: insufflaggio della CO<sub>2</sub> che favorisce sia l'incremento della biomassa microalgale che la regolazione del pH [66] e con la selezione, acclimatazione e diversificazione dei ceppi microalgali utilizzati [1]. L'acclimatazione di diversi ceppi microalgali ha permesso l'identificazione di molte specie applicabili per la coltivazione su digestato, dove il processo di acclimatazione ha aumentato la capacità di depurazione dell'effluente [67]. Oltre all'applicazione di specie singole, l'applicazione di consorzi microalgali per il trattamento dei reflui ha mostrato robustezza del sistema alla presenza di sostanze tossiche e patogeni, alte produttività di biomassa ed effetti depurativi maggiori dati dall'effetto sintrofico della coltura per la rimozione di nutrienti [67,68]. L'applicazione di consorzi risulterebbe più economica e di semplice mantenimento abbassando i costi operativi [69].

Tra le molteplici specie microalgali studiate, *Chlorella vulgaris* risulta la microalga Chlorophyta più coltivata a livello mondiale con applicazioni dalla produzione di integratori alimentari alla farmaceutica e cosmesi, al trattamento di effluenti di varia natura. Come per le altre specie microalgali, la composizione in proteine, lipidi, carboidrati ed altri prodotti secondari ad alto valore aggiunto è strettamente legata alle condizioni colturali quali temperatura, irradiazione luminosa e concentrazioni di nutrienti [70,71]. Di particolare interesse è stata l'applicazione di *C. vulgaris* per il trattamento di reflui associato alla produzione di prodotti secondari ad alto valore aggiunto (i.e. lipidi per la produzione di biodiesel) [72–75] tramite differenti metodologie di coltivazione: batch, semi-continuo e continuo [76] (Tabella 1). L'applicazione di coltivazioni in semi-continuo e continuo possono rappresentare la chiave di volta nell'uso delle colture microalgali nel trattamento dei reflui, permettendo il continuo rifornimento di nutrienti, dal refluo, con continua produzione di biomassa e refluo depurato in uscita dal sistema [76].

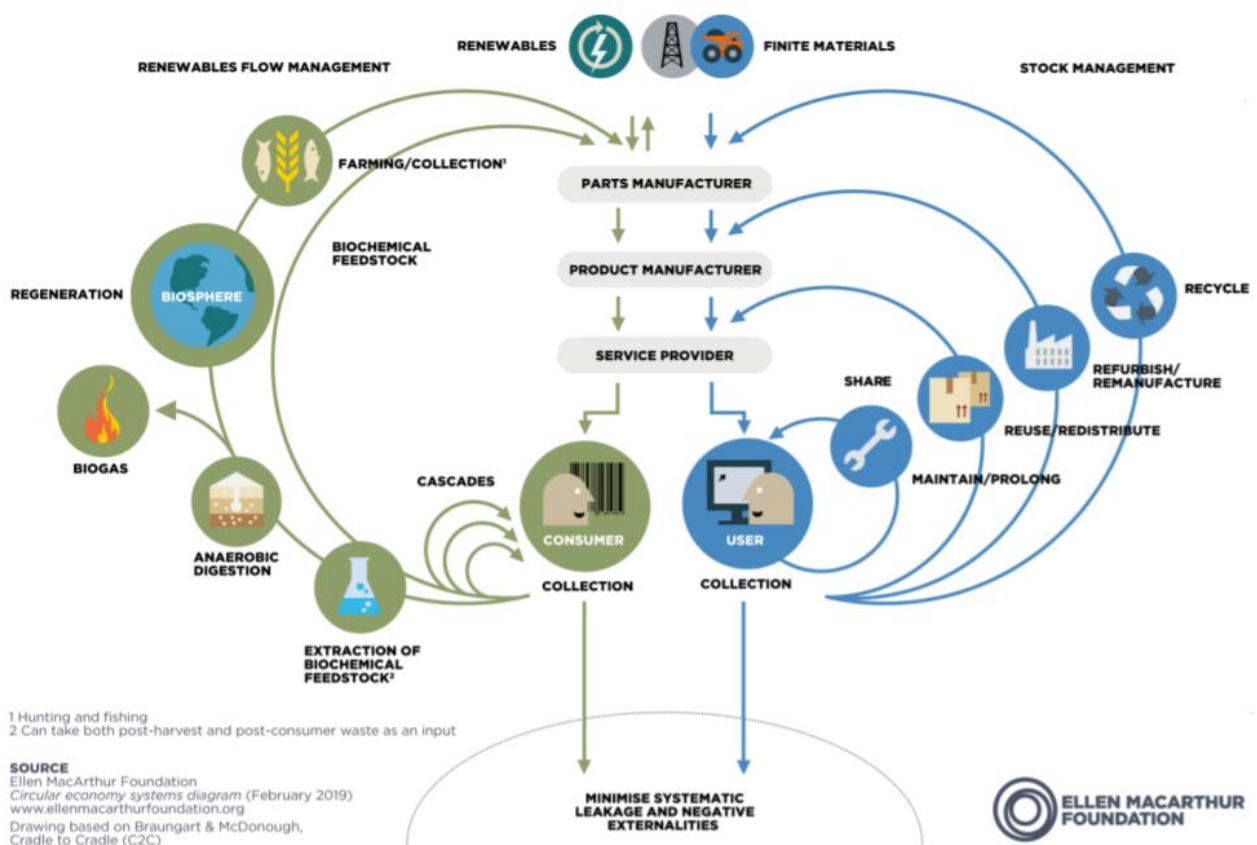
**Tabella 1:** Applicazione di *C. vulgaris* per il trattamento di digestato o acqua reflua in coltivazioni in batch e semi-continuo.

Substrato	Specie microalgale	Coltivazione	HRT (giorni)	Volume reattore	Ammonio iniziale (g l <sup>-1</sup> )	Rimozione di ammonio	Rimozione fosforo (%)	Rimozione COD (%)	Biomassa (g l <sup>-1</sup> )	Ref
Acqua reflua (da liquame)	<i>Chlorella sp.</i>	Batch	-	0.5 l	0,01 ± 0.03	95.44 ± 0.32 %	86.2 ± 0.02	72.52 ± 0.03	0.83 ± 0.00	[77]
Digestato da amido	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Batch	-	2 l	0.21 - 0.33	20 - 84 %	50-100	50- 20	1.50 - 2.50	[53]
Refluo secondario municipale	<i>C. vulgaris</i>	Batch	-	0.2 l	0.07	20 - 82 %	20-100	-	0.13 g l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	[78]
Digestato da letame suino	<i>Chlorella sp.</i>	Semi-continuo	5	150 l	0.80 - 1.60	40.9 - 63.7 (mgN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> l <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> )	-	-	0.04 - 0.09 g l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	[79]
Digestato da letame	<i>C. vulgaris</i>	Semi-continuo	5	0.5 l	0.03 - 0.11	-	-	-	9.00	[80]
Digestato da biomassa microalgale ispessita	<i>Microalgae-Cyanobacteria consortium</i>	Semi-continuo	8	35.8 l	0.01 ± 0.00	58%	-	50.6	0.67	[81]
Digestato da letame suino	<i>Chlorella sp.</i>	Semi-continuo	3	-	0.06 ± 0.00	95%	85	73	0.55	[82]
Refluo da allevamento suino	<i>Chlorella sp.</i>	Semi-continuo	10	0.15 l	0.19 ± 0.02	86 - 88 %	0.4 - 2	33 -38	0.80 ± 0.06	[83]
Mezzo sintetico	<i>C. vulgaris</i>	Continuo	-	3 l	-	-	-	-	-	[72]
Digestato da letame	<i>C. vulgaris</i>	Semi -continuo	5	1 l	0.05 - 0.06	99.00 ± 0.40 %	92.00 ± 1.00	75.50 ± 2.40	0.40 - 0.76	[55]
			10			58.00 ± 1.00 %	82.40 ± 2.80	41.20 ± 5.40		
			20			100 ± 0.00 %	89.20 ± 1.70	55.40 ± 0.40		



#### 1.4 Il concetto di economia circolare applicato alla produzione vitivinicola: la bioraffineria

Per “economia circolare” si intende l’applicazione ed utilizzo di nuove tecnologie volte all’uso dei rifiuti come nuova materia prima per la produzione di nuovi prodotti economicamente ed ambientalmente sostenibili [84]. Il concetto di economia circolare è oramai parte integrante delle strategie governative a lungo termine, con l’obiettivo principale di affrontare il problema della scarsità di materia prima legata all’incremento della domanda energetica globale [85]. L’applicazione del modello economico lineare “prendi-produci-usa-smaltisci” adottato fino ad ora non risulta più sostenibile; quindi, vi è la necessità dell’applicazione di un modello circolare dove il rifiuto diventa nuova materia prima (Figura 6). L’applicazione reale del modello circolare risulta fondamentale per uno sviluppo sostenibile, permettendo così un riequilibrio dell’attività socio-economica associata all’utilizzo di risorse naturali [86]. Concettualmente parlando, l’economia circolare si basa sul principio naturale che “nulla si crea, nulla si distrugge, tutto si trasforma”, perciò un rifiuto non deve essere considerato solo come tale ma può diventare nuovamente materia prima [13]. L’inquinamento deriva da un utilizzo scorretto o incompleto delle risorse, la soluzione alla sua riduzione è legata all’uso di prodotti o materiali a lungo utilizzo e riciclabili. [87].



**Figura 6:** Schema dell'economia circolare. Nello schema vengono riportati i flussi dei materiali tecnologici e biologici [88].

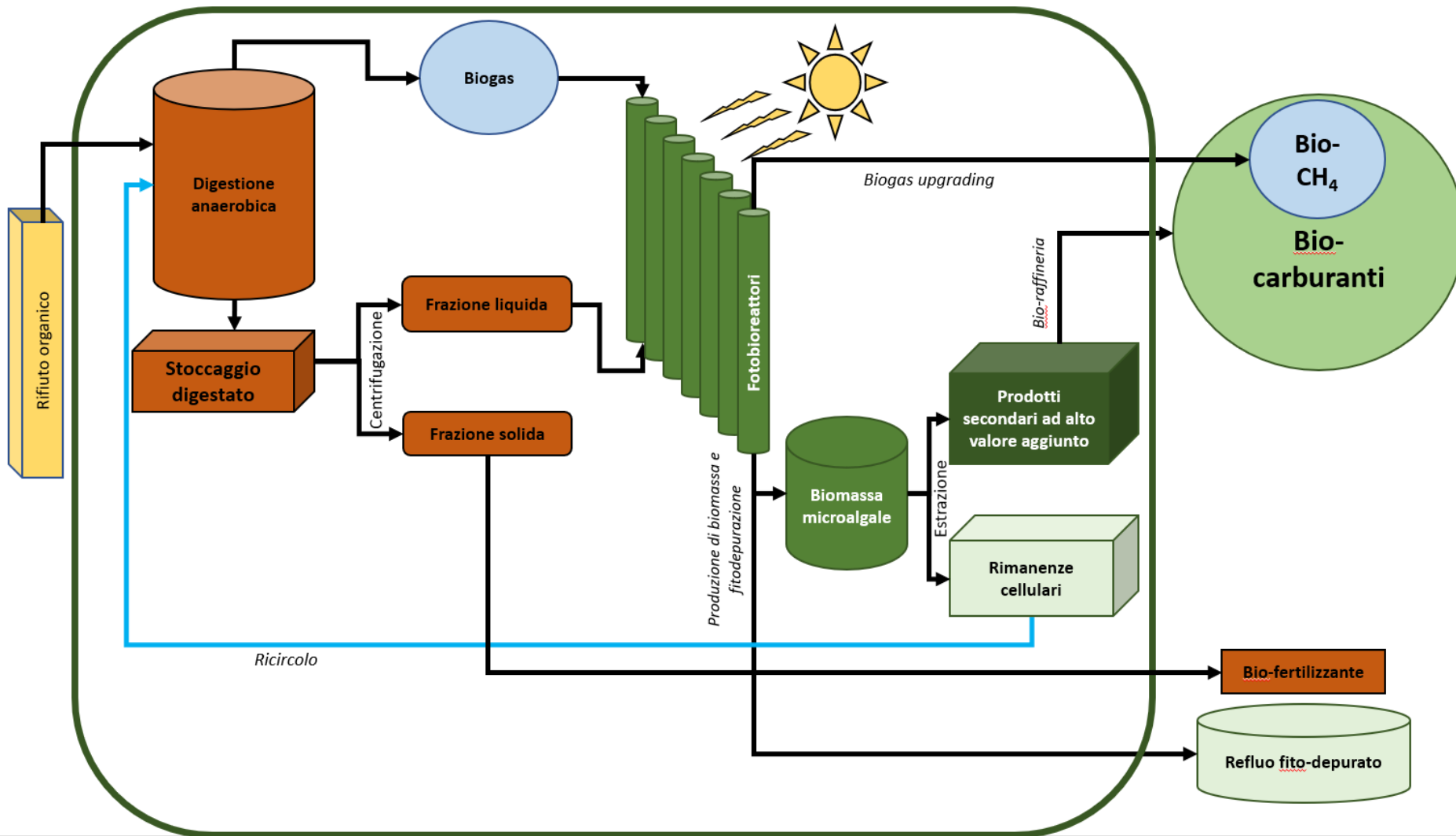
Ad oggi l'imperativo primario è la trasformazione del rifiuto in nuovo prodotto o energia [89] ed uno dei primi processi applicati per la valorizzazione dei rifiuti organici è stato il processo di digestione anaerobica (DA), dal digestato al biogas prodotto [90]. La composizione del digestato effluente dal sistema DA è strettamente legata alla tipologia di rifiuto applicata come substrato e può essere classificato come rifiuto in dipendenza della sua composizione chimica, alte concentrazioni di macronutrienti, quali il fosforo, azoto, potassio, calcio e sodio, ed elementi in tracce (i.e nichel e ferro) ne impediscono il rilascio ambientale [91]. Normalmente il digestato viene separato meccanicamente in due frazioni, liquida e solida, con caratteristiche e destini diversi, e dove la frazione liquida contiene la maggior parte dei nutrienti ed azoto in forma inorganica. Date le caratteristiche chimiche della frazione liquida, il rilascio ambientale risulta regolato in accordo con la Direttiva EC dei Nitrati (91/676/EEC) e la legislazione per le aree vulnerabili per i nitrati (NVZ) [92]. Date quindi le caratteristiche chimiche del digestato vi è la necessità di effettuare trattamenti volti all'abbattimento dei composti organici ed inorganici presenti, i problemi per il suo trattamento vedono la necessità di spazi specifici adibiti per lo stoccaggio e l'applicazione di sistemi di trattamento costosi volti alla rimozione dell'azoto e del fosforo per permettere il suo riciclo negli impianti di trattamento [93]. Per quanto concerne invece il biogas prodotto, vi è la necessità di trattamento (*biogas upgrading*) al fine di ottenere concentrazioni di metano elevate, rimozione della CO<sub>2</sub>, acqua e H<sub>2</sub>S, per essere immesso in rete come "nuova" fonte energetica, con applicazioni come carburante (biometano) o di inserimento nella rete di distribuzione di gas naturale [94]. Il *biogas upgrading* può essere effettuato mediante diverse tecnologie di tipo chimico fisico (adsorbimento su ossidi di metallo o carbone attivo, scrubbing con ammine, sistemi a membrana, scrubbing ad acqua pressurizzata) che permettano la rimozione dei composti indesiderati.

Nell'applicazione dell'economia circolare si inserisce il concetto della bioraffineria, dove si intende, in modo molto simile alla raffineria petrolchimica, l'utilizzo di biomassa rinnovabile che diventa materia prima per la produzione di prodotti commerciali, da combustibili ad integratori alimentari [95]. Semplificando il concetto si può affermare che le differenze tra raffineria petrolchimica e bioraffineria sono, in sintesi, il materiale di partenza (biomassa rinnovabile) e le tecnologie utilizzate per l'ottenimento di prodotti di interesse (*green chemistry*). L'ottimizzazione dei processi estrattivi per i prodotti secondari ad alto valore aggiunto da biomasse ridurrebbe la produzione di scarti di lavorazione, soppiantando l'uso di fonti non-rinnovabili e diminuendo l'impatto ambientale associato all'attività antropica [96]. Nell'applicazione della bioraffineria, le biomasse microalgali hanno suscitato un crescente interesse dato l'alto contenuto proteico, di carboidrati ed oli che possono essere applicati in svariati settori di produzione [97]. I costi associati agli *upstream* e *downstream* della coltivazione microalgale influiscono negativamente sul processo di bioraffineria, per gli *upstream* i costi maggiori sono associati ai nutrienti necessari alla coltivazione microalgale (azoto e fosforo), ceppi microalgali utilizzati, necessità di insufflaggio della CO<sub>2</sub> e costi energetici associati all'illuminazione del sistema di coltivazione; per i costi di *downstream* l'influenza principale è associata alle metodologie di recupero della biomassa estrazione e purificazione dei prodotti di interesse.[97]. Ad oggi gli alti costi associati all'utilizzo di solventi chimici, macchinari e tecnologie specifiche per la separazione dei composti, che limitano al minimo la degradazione delle altre frazioni biologiche provenienti dalla biomassa

microalgale, influenzano negativamente l'applicabilità della biomassa microbiologica nella bioraffineria. La tipologia di trattamento (conversione biochimica, termochimica, transesterificazione e cella a combustione microbiologica) che viene applicata sulla biomassa microalgale, viene identificata sulla base della quantità e qualità della biomassa, valutazione economica dell'applicabilità del trattamento, prodotto desiderato e struttura dell'impianto [96].

Per queste ragioni, la necessità di identificare tecnologie di coltivazioni che diminuiscano i costi di *upstream* e *downstream* risulta essenziale. L'applicazione di un sistema accoppiato DA-microalghe può rappresentare una soluzione per abbassare i costi di *upstream* del processo di coltivazione microalgale, in quanto l'applicazione del digestato come substrato e l'insufflaggio di biogas uscenti dal sistema DA fornirebbero i nutrienti (azoto, fosforo e CO<sub>2</sub>) per la coltivazione microalgale unendo in un unico sistema (bioraffineria) il trattamento del biogas per l'ottenimento biologico di biometano, biogas upgrading, trattamento del digestato e produzione di biomassa, chiudendo il *loop* dell'economia circolare (Figura 7) [90].

La letteratura scientifica relativa all'applicazione dell'economia circolare nell'ambito della produzione vinicola risulta estremamente ridotta. Come riportato da Berardi e Dias [13], effettuando una ricerca su differenti database di pubblicazione scientifica, solo 41 articoli risultano focalizzati sull'applicazione dell'economia circolare nelle produzioni vinicole, di cui 33 riguardano complessivamente studi a scala laboratorio preliminari di valorizzazione del rifiuto vinicolo, relativi al trattamento e recupero di energia, non prendendo in considerazione la potenziale applicabilità della CO<sub>2</sub> prodotta durante il processo fermentativo che potrebbe essere applicata nei sistemi di coltivazione microalgale, ottenendo un abbattimento delle emissioni.



**Figura 7:** Schema dell'applicazione della coltivazione microalgale associata alla digestione anaerobica sviluppata in questo studio.

## 1.5 Applicazione della feccia di vinificazione per la coltivazione microalgale

La letteratura scientifica risulta povera nella ricerca di applicazioni della feccia di vinificazione direttamente come substrato per la coltivazione microalgale, come per la sua applicazione come co-substrato nei sistemi DA. Gli studi identificati risultano ancora molto generici ed esplorativi per quanto riguarda il potenziale utilizzo della feccia per la coltivazione microalgale ed applicano in via preliminare la sola feccia di vinificazione bianca. Solo un lavoro, Salati et al. (2017) [98], vede lo studio di *C. vulgaris*, con risultati promettenti, per la coltivazione diretta su feccia di vinificazione. Lo studio mostra il potenziale utilizzo applicando un'alimentazione in continuo (HRT 5 giorni), in quanto i dati in batch identificavano tassi di crescita confrontabili tra condizione sperimentale e controllo. Nella condizione in continuo, la biomassa in uscita dal sistema risultava di  $1.75 \pm 0.05 \text{ g l}^{-1}$ . Questo studio però risulta l'unico dove è stata svolta una caratterizzazione della biomassa microalgale, indicando in composizione: 17-18 % di acidi grassi, 6-7 % amido e 48.49 % di proteine, la restante frazione è identificata come carboidrati. L'alto contenuto proteico identificato viene associato alla condizione metabolica di coltivazione (mixotrofia) e tipologia di fonte carboniosa fornita, che influenzerebbe l'accumulo di proteine. Veronesi et al. [99] ha effettuato la stessa metodologia di coltivazione, mixotrofica su feccia bianca, utilizzando *Nannochloropsis salina* SAG 40.85 in batch, riscontrando che l'incapacità di crescita di *N. salina* SAG 40.85 fosse correlata dalla contaminazione funginea nella coltivazione. L'ipotesi è che la capacità di crescita, consumo del substrato e resistenza alla contaminazione microbiologica per le coltivazioni su feccia di vinificazione potrebbe essere specie-specifica. Dati i dati ottenuti da Salati et al. [98], l'ipotesi potrebbe essere corretta, ponendo *C. vulgaris* come ceppo promettente per il trattamento diretto della feccia di vinificazione e produzione di biomassa contenente prodotti secondari ad alto valore aggiunto. Come sottolinea Salati et al. [98], l'alto contenuto proteico della biomassa microalgale coltivata su feccia di vinificazione bianca ha mostrato una composizione amminoacidica promettente dato che un terzo degli amminoacidi prodotti risultava composto da amminoacidi essenziali, con valori maggiori rispetto a quelli presenti nella soia e carne, stimando una produzione di 0.52 kg di proteine per kg di rifiuto utilizzato per la coltivazione.

Altri due studi valutano la coltivazione microalgale su reflui vitivinicoli, ma riguardano l'applicazione di estratti di feccia e acqua reflua di cantina. Martin-Gordillo ed al. [100] valuta la variazione di pigmenti in *Chlorella sorokiniana* in risposta a diverse concentrazioni di estratto, evidenziando che una diluizione di 1:10 dell'estratto porta ad una crescita migliore ed accumulo di pigmenti, mentre diluizioni inferiori (1:2) risultano tossiche. Tsoch et al. [101] utilizzando una coltura mista di cianobatteri (*Leptolyngbya* sp.) e *Ochromonas* sp. (microalga, presenza del 5 % nella coltura) effettua dei test in batch su acqua reflua di cantina, non specificando la diluizione applicata, adoperando come pretrattamento la sola filtrazione e non sterilizzazione. I dati ottenuti mostrano che la coltura mista ha un tasso di crescita di  $0.24 \text{ d}^{-1} - 0.29 \text{ d}^{-1}$ , produttività di  $98.3 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1} - 123.2 \text{ mg l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e una percentuale di lipidi nella biomassa di  $11 \pm 1.1 \%$  e  $7 \pm 0.9 \%$ . La rimozione di sCOD identificata è risultata del 92.8 %, con concentrazione iniziale di  $3700 \text{ mg l}^{-1}$ . Lo studio ha sottolineato che se la rimozione di sCOD risultasse inferiore al 90 % potrebbe essere associato alla presenza di composti colloidali o composti organici con lenta biodegradabilità.  $\text{NO}^2^-$  risulta rimosso

totalmente nelle prime 24h di coltivazione e  $\text{NO}_3^-$  contrariamente permane nella coltura con una rimozione variabile dal  $38.4 \pm 4.4 \%$  al  $51.2 \pm 6.8 \%$ . Il fosfato mostrava una rimozione dal  $92.4 \pm 1.4 \%$  e  $97.0 \pm 0.7 \%$  e l'elevata rimozione è associata al suo utilizzo nella sintesi di proteine ed acidi nucleici.

Per quanto i risultati dell'applicazione della feccia e/o dei suoi estratti per la crescita microalgale siano promettenti per, lo studio e ricerca per il suo utilizzo risultano molto scarni e preliminari, ponendo questo lavoro di tesi come primo studio approfondito sulle potenziali applicazioni per la coltivazione microalgale.

## 2 Scopo del lavoro di tesi

La particolarità e l'importanza della produzione vinicola italiana, soprattutto nella regione Veneto, necessita dell'identificazione di un sistema di trattamento efficiente per il rifiuto vitivinicolo. In particolare, l'identificazione di applicazioni innovative della feccia di vinificazione in ottica di economia circolare risulta essenziale. L'applicazione innovativa di un sistema DA-microalghe applicabile anche su piccola scala porterebbe ad una diminuzione dello sversamento non autorizzato del refluo, sovrappressure o torchiature eccessive per la produzione di vini scadenti, frodi o contrabbando e favorirebbe lo sviluppo di nuove fonti di guadagno economico per le aziende che produrrebbero biomasse rinnovabili per la produzione di prodotti secondari ad alto valore aggiunto.

Sulla base di questi presupposti, lo scopo generale della ricerca è stato quello di verificare differenti condizioni di crescita di colture microalgali per il trattamento del digestato da feccia di vinificazione, definendo quindi i parametri ottimali per l'integrazione dei due processi.

Nello specifico, gli obiettivi della tesi sono:

- Verificare l'adattabilità del processo di digestione anaerobica dei fanghi di depurazione da reflui di cantina e le fecce di vinificazione sul lungo periodo, con particolare attenzione ai cambi di tipologia della feccia stessa prodotta durante l'anno;
- Ottimizzare la crescita di *C. vulgaris* su digestato da refluo vinicolo prodotto, con attenzione alla variazione delle caratteristiche del digestato;
- Verificare la possibilità di utilizzo della feccia di vinificazione direttamente come substrato per la coltivazione microalgale.
- Valutare il potenziale di biometanazione della biomassa algale prodotta sia in mono-digestione che in co-digestione con fanghi e feccia,

Al fine di raggiungere gli obiettivi individuati, è stato messo a punto un piano sperimentale qui riassunto (Tabella 2) e articolato maggiormente nel capitolo 3:

**Tabella 2:** Sintesi del piano sperimentale volto all'identificazione di un trattamento efficiente mediante microalghe del digestato e feccia di vinificazione.

---

Valutazione dei pretrattamenti meccanici del digestato per la coltivazione microalgale
Screening in Piastra Petri dei ceppi microalgali con digestato da FORSU
Applicazione di basse diluizioni del digestato da FORSU per la coltivazione microalgale
Test in batch: confronto coltivazione di <i>Chlorella vulgaris</i> su digestato da FORSU e vinicolo a basse diluizioni
Test preliminare batch-semicontinuo: coltivazione di <i>C. vulgaris</i> su digestato vinicolo
Coltivazione in semi-continuo: applicazione di differenti HRT e diversi digestati vinicoli (DIG-WL, DIG-RL e DIG-PL)
Test batch di coltivazione di <i>C. vulgaris</i> su feccia di vinificazione previa centrifugazione a differenti diluizioni
Test batch di coltivazione di <i>C. vulgaris</i> su feccia di vinificazione previa filtrazione a differenti diluizioni
Test BMP: valutazione degradabilità della biomassa microalgale nei sistemi DA

---



### 3 Materiali e metodi

Nel seguente capitolo sono riportati:

- la caratterizzazione del digestato da Frazione Organica dei Reflui Urbani (FORSU) utilizzato nella prima parte sperimentale della tesi (§ 3.1);
- le condizioni operative del digestore anaerobico lab scale alimentato a feccia di vinificazione e monitorato nel corso dei 3 anni di tesi (§ 3.2);
- i metodi analitici utilizzati per la caratterizzazione del digestato e della biomassa microalgale prodotta (§ 3.3);
- le condizioni sperimentali applicate (§ 3.4)
- test di biometanazione su biomassa microalgale ed in combinazione con reflui vinicoli (§ 3.5)

#### 3.1 Caratterizzazione del digestato da trattamento della Frazione Organica dei Reflui Urbani

Il digestato della frazione organica dei reflui urbani (FORSU) è stato utilizzato come primo substrato di screening delle colture microalgali prima dell'applicazione del digestato da feccia di vinificazione. Il suo utilizzo è stato effettuato al fine di identificare i pretrattamenti necessari al digestato prima della coltivazione microalgale, screening dei ceppi microalgali ed acclimatazione. Il digestato è stato campionato da un impianto di trattamento dei reflui municipali (Nord Italia) dove il trattamento della FORSU veniva eseguito mediante co-digestione anaerobica di fango si supero e FORSU. L'impianto risulta di volume di 2000 m<sup>3</sup>, con un carico organico (OLR) di 1.8 kgVS m<sup>-3</sup>d<sup>-1</sup> e produzione specifica di gas (SGP) 0.6 ± 0.1 m<sup>3</sup>kgVS<sup>-1</sup> in condizioni mesofile (37 ± 2 °C). La caratterizzazione del digestato da FORSU è stata effettuata tramite metodologia APHA e APHAT-IRSA/CNR [102,103] per la quantificazione in termini di domanda chimica di ossigeno solubile (sCOD), totale degli acidi grassi solubili totali (VFA), pH, alcalinità totale e parziale, solidi totali e volatili (TS e TVS). La concentrazione di ammonio e fosfati è stata effettuata tramite cromatografia anionica e cationica. La caratterizzazione del digestato da FORSU viene riportata in Tabella 3.

Il digestato da FORSU è stato adoperato come terreno di screening preliminare relativo al metabolismo e pretrattamenti meccanici necessari per la coltivazione i due ceppi microalgali: *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*. Inoltre, il digestato da FORSU è stato utilizzato per effettuare l'adattamento di *C. vulgaris* per la coltivazione a diluizioni inferiori di digestato (da 1:10 a 1:5).

Tabella 3: Caratterizzazione digestato da FORSU

	DIG-FORSU
TS (gTS kg <sup>-1</sup> )	17.26 ± 0.93
TVS (gTVS kg <sup>-1</sup> )	9.60
Azoto ammoniacale (gN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> l <sup>-1</sup> )	0.79 ± 0.01
Fosforo (mgP l <sup>-1</sup> )	45.65
Azoto (gN l <sup>-1</sup> )	1.52
pH	7.74 ± 0.12
Alcalinità totale (g CaCO <sub>3</sub> l <sup>-1</sup> )	5.18 ± 0.70
Alcalinità parziale (g CaCO <sub>3</sub> l <sup>-1</sup> )	3.66 ± 0.65
VFA <sub>totali</sub> (gCOD l <sup>-1</sup> )	0.41
sCOD (gO <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> )	0.47 ± 0.01

### 3.2 Condizioni operative del digestore anaerobico per il trattamento della feccia di vinificazione

Il digestato da feccia di vinificazione è stato ottenuto tramite l'ausilio di un digestore anaerobico in scala da laboratorio con volume di 4 l presso i laboratori dell'Università Ca' Foscari (Venezia, Italia). La feccia di vinificazione ed il WAS sono stati ottenuti dalla ditta Serena Wines S.P.A. (Conegliano, Italia). Sono state applicate tutte le differenti fecce di vinificazione ottenibili dai processi vitivinicoli, quindi bianca, rossa e una miscela delle due tipicamente ottenibile nei consorzi vitivinicoli al termine della vendemmia per la produzione di vino rosso e rosa, definita in questo lavoro come "rosa". Per tutte le fecce di vinificazione utilizzate per l'alimentazione del sistema DA, il tempo di ritenzione idraulica (HRT) applicato è stato di 20 giorni. Durante le condizioni di stato stazionario (SSC) di alimentazione a feccia bianca, rossa e rosa di vinificazione, il digestato è stato collezionato, caratterizzato ed utilizzato per i test di crescita microalgale previa centrifugazione a 9000 rpm per 5 minuti per la rimozione dei solidi sospesi. Non è stata effettuata nessuna sterilizzazione del digestato.

Il carico organico applicato (OLR) è stato di  $3.77 \pm 0.38$  gCOD l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> per tutte le fecce di vinificazione utilizzate nel sistema DA.

La caratterizzazione della feccia di vinificazione bianca, rossa, rosa e WAS ha seguito le linee guida riportate nei protocolli APHA e APAT-IRSA/CNR [102,103]. I dati di caratterizzazione dei substrati sono riportati in Tabella 4. Il contenuto di CH<sub>4</sub> è stato quantificato mediante un misuratore della composizione di biogas (ETG, Portable biogas analyzer MCA 100 Bio-P) ed il volume di biogas prodotto totale tramite un MilligasCounter.

**Tabella 4:** Caratterizzazione del fango attivo (WAS), feccia di vinificazione bianca (WL), rossa (RL) e rosa (PL).

	WAS	WL	RL	PL
TS (gTS kg <sup>-1</sup> )	171.26	95.95	126.60 ± 0.03	116.00 ± 0.05
TVS (gTVS kg <sup>-1</sup> )	152.17	24.50	59.38 ± 1.39	39.33 ± 1.01
N ammoniacale (mgN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> l <sup>-1</sup> )	-	2.75 ± 0.25	12.90 ± 0.00	4.60 ± 2.50
Fosfati (mg l <sup>-1</sup> )	8.00 ± 2.00	1.50 ± 0.10	1,985 ± 12.75	500.98 ± 50.29
TKN (mgN l <sup>-1</sup> )	168.10	13.92	-	-
COD sul secco (gO <sub>2</sub> gTS <sup>-1</sup> )	0.66 ± 0.21	474.39 ± 9.75	629.00 ± 58.31	490.45 ± 166.65
pH	7.42	3.37	3.01 ± 0.04	3.43 ± 0.01
sCOD (gO <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> )	-	185.00 ± 3.53	137.79 ± 0.58	165.00 ± 0.70

### 3.3 Metodi analitici

#### 3.3.1 Analisi sulla frazione liquida del digestato

Le analisi di caratterizzazione della frazione liquida del digestato, feccia di vinificazione ed l'effluente al termine della crescita microalgale sono state: pH, sCOD, alcalinità totale e parziale, acidi grassi volatili (VFA) in accordo con i metodi APHA, APAT AWWA WET e IRSA-CNR [102,103]. La cromatografia cationica ed anionica per l'identificazione in mg l<sup>-1</sup> degli ioni Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> è stata applicata utilizzando per la cromatografia cationica eluente H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 22 mN con precolonna Guard Ion Pac OG12A (2-50 mm, Dionex), soppressore con autorigenerazione CSRS ULTRA II (4 mm, Dionex), ED50 Electrochemical detector, GS50 Gradient pump, LC25 Chromatography Oven. La cromatografia anionica (761 Compact IC, Metrohm) ha utilizzato una precolonna di separazione Guard Ion Pac AG18 (2-50 mm, Dionex), colonna di separazione AS18 (2-250 mm, Dionex) con NaOH 23 mM come eluente. La concentrazione di polifenoli totali è stata effettuata applicando il metodo del Folin-Ciocalteu [104].

#### 3.3.2 Ceppi microalgali e mezzi di crescita

I ceppi microalgali delle specie *C. vulgaris* e *S. obliquus* sono stati concessi dalla collezione ACUF (Algal Collection of University of Federico II, Napoli, Italia). La scelta nell'utilizzo e valutazione di queste specie microalgali è stata determinata dall'abbondanza di studi per l'applicazione nel trattamento del digestato. Il mantenimento dei ceppi è stato effettuato nelle prime fasi sperimentali utilizzando il mezzo sintetico di crescita ISO 8692 (Standard ISO per i test di inibizione delle cellule algali unicellulari) applicando

un'illuminazione di 3 klux, areazione di 2.3 lh<sup>-1</sup> vvm ed agitazione magnetica di 330 rpm in beute Erlenmeyer da 300 ml a temperatura di 20 ± 1 °C. La scelta del mezzo ISO 8692 per il mantenimento ed i test preliminari si è basata sulla composizione del mezzo sintetico, che risulta minimo e di solo mantenimento e tipicamente viene applicato nei saggi di fitotossicità in quanto non interagisce sull'effetto dell'inquinante sulla cultura microbica. I test di screening su digestato da FORSU in mezzo liquido e solido (piastre Petri) sono stati utilizzati per identificare il ceppo con migliori capacità di crescita, condizioni metaboliche e valutazione dell'effetto del digestato se applicato a concentrazioni maggiori nel mezzo di coltura. Successivamente all'identificazione del ceppo, il mezzo di crescita è stato sostituito con BG11 modificato (78% in meno di nitrato di sodio per valutare l'effettiva rimozione dei composti azotati dei ceppi microalgali dal digestato) e sono state valutate le performance di crescita sui diversi effluenti DA in condizioni batch e semi-continuo in fotobioreattori (PBR) con volume di 4 litri.

### 3.3.3 Monitoraggio della crescita cellulare

Il monitoraggio della crescita cellulare è stato effettuato tramite misurazione spettrofotometrica ( $\lambda$  680 nm e 750 nm), conta cellulare con microscopio ottico da banco Leika DMIL con l'ausilio della camera di Bürker con ingrandimento 40X e peso secco tramite filtri in acetato di cellulosa con porosità di 0.45  $\mu$ m (Whitman). Il tasso di crescita specifico ( $\mu$ , d<sup>-1</sup>) della biomassa è stato calcolato tramite l'equazione 1 riportata da Dickinson [105]:

$$\mu (d^{-1}) = \frac{\ln X_f - \ln X_i}{t_f - t_i} \quad (1)$$

Dove  $X_f$  rappresenta la concentrazione di biomassa finale,  $X_i$  la concentrazione di biomassa iniziale,  $t_f$  e  $t_i$  il tempo iniziale e finale rispettivamente.

### 3.3.4 Caratterizzazione della biomassa

La caratterizzazione della biomassa è stata effettuata mediante l'uso di varie metodologie estrattive di chimica classica. La quantificazione delle clorofille a (Ch *a*), b (Ch *b*) e carotenoidi totali contenuti nella biomassa presente in un campione di soluzione (1ml) è stata concentrata applicando una centrifugazione a 12000 rpm per 5 minuti. Il pellet di biomassa prima dell'estrazione dei pigmenti è stato lavato risospingendolo in acqua distillata e centrifugato nuovamente. Il pellet di biomassa finale ottenuto è stato utilizzato per l'estrazione dei pigmenti aggiungendo 3ml di metanolo (Sigma Aldrich) e ponendolo in bagno termico a 60°C per 60 minuti. Al termine, i campioni sono stati centrifugati a 9000 rpm per 5 minuti ed il surnatante è stato utilizzato per la quantificazione dei pigmenti mediante metodo spettrofotometrico a  $\lambda$  470 nm, 652.4 nm e 665.2 nm seguendo le equazioni 2, 3 e 4 [106,107].

$$\text{Ch a (mg l}^{-1}\text{)} = (16.72 * \text{DO}_{665.2}) - (9.16 * \text{DO}_{652.4}) \quad (2)$$

$$\text{Ch b (mg l}^{-1}\text{)} = (34.09 * \text{DO}_{652.4}) - (15.28 * \text{DO}_{665.2}) \quad (3)$$

$$\text{Carotenoidi totali (mg l}^{-1}\text{)} = \frac{((1000 * \text{DO}_{470}) - (1.63 * \text{Ch a}) - (104.96 * \text{Ch b}))}{221} \quad (4)$$

Per la caratterizzazione percentuale della biomassa microalgale in termini di proteine, amido e lipidi, la biomassa microalgale collezionata è stata centrifugata a 9000 rpm per 5 minuti, lavata distillata e centrifugata nuovamente. Il pellet è stato successivamente congelato per effettuare la liofilizzazione tramite il macchinario EDWARDS Freeze Dryer Modlyo (con temperatura settata a -40 °C) e pompa a vuoto EDWARDS A653-01-93.

Il contenuto di proteine totali è stato ottenuto campionando 10 mg di biomassa liofilizzata finemente tritata, inserito 1 ml di NaOH 0.5M e posto a bagno termico a 80°C per 10 minuti. Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 12,000 rpm per 5 minuti. Il procedimento estrattivo è stato ripetuto tre volte sullo stesso campione di biomassa liofilizzata e il surnatante è stato collezionato per ottenere 3 ml finali di campione [108–110]. La quantificazione è stata ottenuta mediante il campionamento di 1 ml di estratto ed aggiungendo 2 ml di reagente Biuret (Kit Biuret, Merk, Germania). Dopo 20 minuti di reazione a temperatura ambiente, l'assorbanza a  $\lambda$  540 nm è stata misurata e la quantificazione delle proteine totali è stata ottenuta tramite retta di calibrazione con siero di albumina bovina (Sigma Aldrich) con concentrazioni da 0.4 a 2.0 mg ml<sup>-1</sup> [108–110].

Il contenuto di amido percentuale nella biomassa liofilizzata finemente tritata è stato ottenuto tramite l'utilizzo del kit di analisi per l'amido totale (Method 76-13.01, Megazyme, Irlanda) e reazione colorimetrica effettuata con il reagente GOPOD (Megazyme, Irlanda) e lettura spettrofotometria a  $\lambda$  510 nm.

La quantificazione di lipidi totali ha applicato il metodo Folch [111] utilizzando una soluzione cloroformio-metanolo 2:1 su 0.02 g di biomassa liofilizzata finemente tritata. Il campione con 4 ml di soluzione cloroformio-metanolo è stato posto in sonicatore per 1 ora ed al termine è stato centrifugato a 9000 rpm per 5 minuti. Il surnatante ottenuto è stato lavato con acqua distillata per ottenere la separazione di fase e la fase acquosa è stata rimossa. La soluzione cloroformio-metanolo contenente la frazione lipidica è stata successivamente essiccata in Rotavapor a 30°C per 25 minuti. L'equazione per i lipidi totali è riportata nell'equazione 5.

$$\text{Lipidi totali (\%)} = \left( \frac{P_1 - P_0}{g_{\text{biomassa}}} \right) * 100 \quad (5)$$

Dove P<sub>0</sub> è il peso del pallone vuoto (g), P<sub>1</sub> è il peso del pallone con la frazione lipidica essiccata (g).

La caratterizzazione della frazione lipidica è stata ottenuta campionando 0.2 – 0.3 mg di biomassa liofilizzata applicando il metodo di derivatizzazione per gli acidi grassi della frazione lipidica [112–118]. Il contenuto lipidico dei campioni è stato trasformato nei loro corrispondenti metilesteri tramite una transesterificazione a singolo step utilizzando 50  $\mu$ l di m(trifluorometilfenil)trimetilammonio idrossido, 2.5% in metanolo, a temperatura ambiente. Un microlitro di ogni campione derivatizzato è stato iniettato automaticamente tramite autocampionatore AS1310 (Thermoscientific) nel sistema Trace GC 1300 (Thermoscientific) equipaggiato

con un detector spettrometro di massa ISQ 7000 con un analizzatore quadripolo (ThermoScientific). La separazione cromatografica è stata effettuata con una colonna capillare a ponti di silicio DB-5MS (30 m di lunghezza, 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ -5% fenil metil polisilossano), utilizzando l'elio come gas carrier (velocità di flusso 1 ml  $\text{min}^{-1}$ ). La temperatura di iniezione era di 280 °C, l'interfaccia MS a 280 °C. la linea di trasferimento è stata mantenuta a 280 °C e la fonte MS era a temperatura di 300°C. è stata applicata la rampa di temperatura da 50 °C a 320 °C a 10 °C  $\text{min}^{-1}$ , mantenendo la temperatura stabile per 5 minuti, per la misurazione. L'MS ha corso in Full Scan mode (m/z 40-650), 1.9 scans/s. L'energia di ionizzazione elettronica era di 70 eV. I composti sono stati identificati tramite confronto con le librerie NIST e MS Search 1.7 di Spettri di Massa e una libreria creata per i campioni. L'analisi quantitativa è stata ottenuta utilizzando l'acido nonadecanoico come standard interno e la soluzione standard conteneva acidi saturi (miristico, palmitico e stearico) e insaturi (oleico, linoleico, linolenico e palmitoleico) e glicerolo. I dati quantitativi sono espressi come percentuale di acido grasso su totale di acidi grassi estratti (%w/w).

### 3.4 Condizioni sperimentali

#### 3.4.1 Valutazione di differenti pretrattamenti meccanici del digestato per la coltivazione microalgale

I ceppi microalgali *C. vulgaris* e *S. obliquus* sono stati testati mediante coltivazioni in batch su digestato da FORSU con diluizione di 1:10, valutando i differenti metabolismi: autotrofia, mixotrofia ed eterotrofia. La sperimentazione ha visto l'applicazione di beute da 300 ml (Erlenmeyer) con illuminazione di 2.01 klux (per le condizioni di autotrofia e mixotrofia), insufflazione d'aria a 137.5  $\text{lh}^{-1}$  vvm ed agitazione magnetica a 330 rpm applicati in continuo. Per la condizione eterotrofa l'unica differenza di coltivazione ha riguardato l'irradiazione luminosa che è stata assicurata assente tramite una copertura integrale delle beute con alluminio. L'esperimento è stato svolto a temperatura controllata di  $20 \pm 1$  °C. La condizione di controllo ha utilizzato il mezzo di crescita ISO 8692, che è stato utilizzato anche per effettuare la diluizione 1:10 del digestato. L'inoculo per i due ceppi microalgali aveva concentrazione di  $7 \pm 1$  milioni di cellule  $\text{ml}^{-1}$  e  $2.9 \pm 0.5$  milioni di cellule  $\text{ml}^{-1}$  per *S. obliquus* e *C. vulgaris* rispettivamente. Il digestato da FORSU è stato testato in condizione tal quale (senza nessun pretrattamento, noPT), dopo centrifugazione a 5000 rpm per 5 minuti (AC) e dopo filtrazione con filtri in acetato di cellulosa con porosità di 0.45  $\mu\text{m}$  (Whatman) (AUF). Le condizioni di controllo sperimentali sono state autotrofia (mezzo ISO 8692), mixotrofia (1 g  $\text{l}^{-1}$  di glucosio) ed eterotrofia (1 g  $\text{l}^{-1}$  glucosio) come riportato da Di Caprio [119]. Il glucosio è una molecola facilmente assimilabile dai microrganismi ma necessita di pathway metaboliche specifiche in condizione di mixotrofia ed eterotrofia per le specie microalgali (pathway del pentosio-fosfato ed Embden-Meyerhof rispettivamente). Per questo motivo la concentrazione di 1 g  $\text{l}^{-1}$  di glucosio è stata applicata per le condizioni di controllo valutando se vi fosse un effetto inibitorio della crescita. La durata del test è stata di 8 giorni, tutte le condizioni sperimentali avevano la loro corrispettiva copia sperimentale e le analisi di monitoraggio sono state effettuate in duplice copia su ogni condizione in batch.

### 3.4.2 Test in piastra Petri: screening dei ceppi microalgali su digestato da FORSU

Identificato il pretrattamento meccanico sul digestato migliore per la crescita su mezzo liquido dei ceppi *S. obliquus* e *C. vulgaris* è stato effettuato uno screening in piastra Petri utilizzando un terreno selettivo composto da digestato FORSU diluito 1:10 e 1:5 con ISO 8692 o acqua di rete. Il mezzo solido è stato ottenuto aggiungendo al mezzo liquido 1.5 % di Agar Agar (Sigma Aldrich). Le diluizioni 1:10 e 1:5 sono state necessarie in quanto la concentrazione di ammonio presente nel digestato ( $573 \pm 124 \text{ mg l}^{-1}$ ) risulta tossica per i ceppi microalgali, dove tipicamente il limite massimo di concentrazione è di  $160 \text{ mg l}^{-1}$  [41,120]. Sono state applicate sulle piastre Petri due differenti illuminazioni per valutare l'effetto dell'irradiazione luminosa sulla crescita microalgale su mezzo solido di 2.10 klux e 3.90 klux. Dopo 8 giorni dall'inoculo, una goccia di reagente Nile Red (Sigma Aldrich) è stata posta sulle colonie microalgali per osservare l'accumulo di composti idrofobici all'interno delle colonie. La preparazione del reagente ha seguito quella illustrata da Greenspan [121], la soluzione madre di Nile red ( $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) subisce diluizione di 1:100 con acetone (Sigma Aldrich) e successivamente viene utilizzata per l'analisi qualitativa sulle colonie microalgali. Su ogni colonia sono state poste due gocce di soluzione Nile Red e, dopo 20 minuti al buio, le piastre Petri sono state spostate a luce ultravioletta per identificare la fluorescenza del Nile Red. Tutti i test sono stati effettuati in duplicato e le condizioni di controllo per l'analisi qualitativa sono state esposte a luce UV senza applicazione del reagente onde evitare falsi positivi eliminando l'emissione di fondo.

### 3.4.3 Valutazione dell'applicazione di basse diluizioni del digestato per la coltura microalgale

*S. obliquus* e *C. vulgaris* sono state coltivate su digestato da FORSU diluito 1:5 con ISO 8692 e acqua di rete (DIG+ISO e DIG+TW rispettivamente). Le condizioni di controllo autotrofe sono state applicate con ISO 8692 o acqua di rete (ISO e TW rispettivamente). L'inoculo risultava con densità cellulare di  $3.8 \pm 0.5$  milioni di cellule  $\text{ml}^{-1}$  e  $6.0 \pm 1.0$  milioni di cellule  $\text{ml}^{-1}$  per *S. obliquus* e *C. vulgaris* rispettivamente. Agitazione magnetica (330 rpm) ed irradiazione luminosa (3.90 klux) sono state applicate in continuo, l'insufflazione di aria non è stata applicata per valutare l'effettivo consumo di azoto e minimizzare la rimozione dell'ammonio determinato dallo strippaggio. Tutte le condizioni sperimentali e di controllo erano in duplice copia in parallelo. Il test ha avuto durata di 8 giorni utilizzando beute da 300 ml (Kimax) a temperatura di  $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  con inoculo iniziale a diluizione 1:5 come le condizioni sperimentali. Sui vari terreni utilizzati è stata effettuata una caratterizzazione della frazione ionica prima della crescita microalgale (Tabella 5).

**Tabella 5:** Caratterizzazione cationica ed anionica delle differenti condizioni sperimentali: ISO 8692 (ISO), acqua di rete (TW), digerato da FORSU diluito 1:5 con acqua di rete (DIG+TW) o mezzo sintetico (DIG+ISO) prima della coltivazione microalgale.

	ISO	TW	DIG+TW	DIG+ISO
Cl <sup>-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	19.00 ± 5.00	8.00 ± 1.00	57.00 ± 4.00	64.00 ± 1.00
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	0.5.0 ± 0.20	16.60 ± 0.10	12.20 ± 0.20	0.90 ± 1.00
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	0.50 ± 0.00	0.50 ± 0.60	14.50 ± 0.10	18.00 ± 1.00
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	6.10 ± 0.20	15.00 ± 1.00	13.50 ± 0.30	5.40 ± 0.50
Na <sup>+</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	18.90 ± 0.10	8.60 ± 0.30	246.00 ± 6.00	253.00 ± 1.00
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	1.60 ± 0.10	0.00 ± 0.00	196.00 ± 13.00	203.00 ± 4.00
K <sup>+</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	1.30 ± 0.30	1.30 ± 0.20	104.00 ± 4.00	106.00 ± 1.00
Mg <sup>2+</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	3.80 ± 0.10	30.80 ± 0.10	184.00 ± 19.00	142.00 ± 5.00
Ca <sup>2+</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	4.00 ± 3.00	39.00 ± 7.00	490.00 ± 32.00	417.00 ± 9.00

#### 3.4.4 Test in batch: confronto effetto digerato da FORSU e digerato vinicolo su *C. vulgaris*

*C. vulgaris* è stata acclimatata alla crescita in presenza di digerato mediante inoculi seriali in fotobioreattori verticali tubolari (PBR) da un litro applicando un'irradiazione luminosa di 3.9 klux, agitazione magnetica (330 rpm) e areazione (2.3 lh<sup>-1</sup> vvm) in continuo. *C. vulgaris* è stata coltivata in batch utilizzando digerato da FORSU diluito 1:10 con concentrazione iniziale della biomassa microalgale di 0.1 g l<sup>-1</sup>. Il processo di acclimatazione del ceppo microalgale per la coltivazione su digerato a diluizioni inferiori è stato effettuato tramite inoculi seriali: in principio il ceppo è stato inoculato a diluizione 1:10 con digerato da FORSU con diluizione 1:10, monitorata la crescita della biomassa e identificata la fase esponenziale. La biomassa in fase esponenziale è stata prelevata ed utilizzata come inoculo per l'allestimento di tre colture in successione nelle medesime condizioni sperimentali (1:10). Successivamente, l'inoculo è stato inoculato in presenza di digerato da FORSU diluito 1:5 con BG11 ed è stato propagato per tre volte in fase esponenziale nella medesima condizione sperimentale. Al termine della fase di acclimatazione, la coltura ottenuta è stata utilizzata per il test in batch in PBR tubolari da 4 litri, applicando come substrato digerato da FORSU e digerato da feccia di vinificazione bianca (DIG-WL) diluiti 1:5. Il test in batch su PBR ha utilizzato un inoculo con concentrazione iniziale di biomassa di 0.20 ± 0.07 g l<sup>-1</sup>. Il test è stato effettuato in mixotrofia con illuminazione di 5.58 ± 0.78 klux utilizzando quattro lampade al neon da 100 w ed areazione con un aeratore da acquario (2.3 lh<sup>-1</sup> vvm, AMTRA Mouse) applicate in continuo. Il test ha avuto durata di 10 giorni.



#### 3.4.5 Test a due fasi di coltivazione batch-semicontinuo di *C. vulgaris* su digestato vinicolo

Il primo test di coltivazione preliminare di coltivazione in semi-continuo è stato effettuato applicando una coltivazione a due step su digestato vinicolo (DIG-WL). Nel primo step è stata utilizzata una coltivazione di tipo batch e, identificata la fase stazionaria (ottavo giorno), la coltivazione è stata convertita in semicontinuo applicando un HRT di 8 giorni (secondo step). È stato valutato solo un ciclo completo di HRT. Irradiazione luminosa di 3.9 klux, agitazione meccanica (330 rpm) e insufflazione d'aria ( $2.3 \text{ l h}^{-1} \text{ vvm}$ ) sono stati applicati in continuo. L'inoculo risultava con densità cellulare e peso secco di 40 milioni di cellule  $\text{ml}^{-1}$  e  $0.06 \pm 0.00 \text{ g l}^{-1}$  rispettivamente. Il test è stato svolto su PBR tubolare verticale con volume da 1 l (Pyrex, altezza 454 mm) (Figura 8). Il test è stato effettuato in duplice copia.

#### 3.4.6 Test in semicontinuo in PBR a differenti HRT

Sulla base dei dati ottenuti, la coltivazione microalgale è stata valutata in semicontinuo applicando differenti HRT (47 giorni, 20 giorni, 10 giorni) per il trattamento del digestato da feccia bianca, rossa e rosa (DIG-WL, DIG-RL e DIG-PL rispettivamente). L'alimentazione dei PBR con digestato da vinificazione è avvenuta a giorni alterni, in nessuna sperimentazione è stata ricircolata la biomassa microalgale uscente dal sistema. I test sono stati effettuati su PBR tubolari verticali da 4 litri (47 cm X 12 cm) (Figura 7), l'illuminazione è stata fornita da quattro lampade al neon bianche per ogni reattore ( $10.17 \pm 1.12 \text{ klux}$ ) ed aerazione ( $3.4 \text{ l min}^{-1}$ , Amtra Technik Mouse 4, Germania) in continuo. Il valore di peso secco iniziale dell'inoculo era di  $0.70 \pm 0.08 \text{ g l}^{-1}$  e l'analisi di conta cellulare è stata effettuata giornalmente per identificare variazioni morfologiche, potenziali contaminazioni (i.e. rotiferi) e monitoraggio della densità cellulare durante i test. Ogni test in coltivazione in semicontinuo è stato monitorato fino al termine del second/terzo ciclo di HRT. Ogni test è stato effettuato in duplicato. Il digestato utilizzato per l'alimentazione dei PBR ha subito la sola centrifugazione a 9000 rpm per 5 minuti come pretrattamento volto alla rimozione della sola frazione solida presente nel digestato.



**Figura 8:** Impianto sperimentale con PBR tubolari verticali, volume 4 litri.

### 3.4.7 Coltivazione di *C. vulgaris* su feccia di vinificazione

L'applicazione di coltivazioni microalgali su feccia diretta di vinificazione può potenzialmente aprire nuove applicazioni delle colture microalgali portando alla possibilità di coltivazioni dirette negli impianti di vinificazione e riducendo così i costi di impianto legati al trattamento anaerobico. Il pretrattamento comune della feccia di vinificazione prima della coltivazione microalgale è stata la centrifugazione a 9000 rpm per 5 minuti per la rimozione dei solidi sospesi. Le differenze che si possono evidenziare a visione ad occhio nudo della frazione liquida della feccia di vinificazione è la colorazione, che risulta quasi incolore per la feccia bianca e purpurea per la feccia rossa.

Per valutare l'applicabilità delle varie fecce per la coltivazione microalgale sono stati eseguiti test in batch con *C. vulgaris* a differenti diluizioni (1:10, 1:5 e 1:2). Il monitoraggio della crescita cellulare è stato eseguito mediante conta cellulare e peso secco, i substrati sono stati caratterizzati per identificare il quantitativo di sCOD, polifenoli e composti ionici presenti nel mezzo di crescita ed il potenziale effetto inibitorio della crescita microalgale dei bassi valori di pH della feccia. In nessun caso la feccia di vinificazione è stata sterilizzata mediante autoclave.

#### 3.4.7.1 Test in batch: coltivazione di *C. vulgaris* su feccia di vinificazione ad elevata diluizione

Il test di crescita è stato eseguito applicando una diluizione 1:10 alla frazione liquida della feccia di vinificazione bianca e rossa ottenuta dopo centrifugazione a 9000 rpm per 5 minuti. L'inoculo di *C. vulgaris* è stato applicato nelle varie condizioni sperimentale mantenendo la diluizione 1:10, la restante parte del mezzo era composta da BG11 modificato, per un volume totale di 200 ml. La condizione di controllo è stata impostata applicando una diluizione 1:10 dell'inoculo di *C. vulgaris* in BG11. Le condizioni mixotrofiche sono state mantenute applicando continua irradiazione luminosa di 3.9 klux, agitazione meccanica (330 rpm) e insufflazione d'aria (2.3 lh<sup>-1</sup> vvm). Il monitoraggio della biomassa è stato effettuato tramite conta cellulare, peso secco e monitoraggio delle clorofille e carotenoidi. Il test ha avuto durata di 18 giorni ed al termine la biomassa delle differenti condizioni sperimentali è stata collezionata e caratterizzata in termini di lipidi, amido e proteine totali (%). Sul surnatante delle differenti condizioni è stato monitorato periodicamente il pH, concentrazione di ammonio, polifenoli e sCOD.

Tutte le condizioni sperimentali e le analisi sono state svolte in copia.

#### 3.4.7.2 Test in batch: coltivazione di *C. vulgaris* su feccia di vinificazione a bassa diluizione

Dati i risultati sperimentali ottenuti dal test in batch a diluizione 1:10, è stata testata la capacità di crescita di *C. vulgaris* a concentrazioni maggiori di feccia rossa di vinificazione applicando diluizioni di 1:5 e 1:2. La feccia utilizzata è stata pretrattata con la sola centrifugazione a 9000 rpm per 5 minuti. La feccia diluita a 1:5 e 1:2 è stata testata applicando l'inoculo di *C. vulgaris* alle medesime condizioni di diluizione 1:5 e 1:2, la restante parte di mezzo di crescita (solo per la condizione 1:5) era composto da BG11 modificato, per un volume totale di 200 ml. Le condizioni di controllo applicate erano *C. vulgaris* in BG11 modificato con diluizioni di 1:5 e 1:2. Tutte le condizioni sperimentali sono state testate in condizione metabolica di mixotrofia applicando continua irradiazione luminosa di 3.9 klux, agitazione meccanica (330 rpm) e insufflazione d'aria (2.3 lh<sup>-1</sup> vvm). Il test ha avuto durata di 28 giorni. Le condizioni sperimentali e di controllo avevano le loro rispettive copie sperimentali. Le analisi di monitoraggio della crescita della biomassa (conta cellulare, peso secco e monitoraggio delle clorofille e carotenoidi) sono state svolte durante tutta la durata della sperimentazione, al termine del test la biomassa è stata collezionata e sono stati quantificati i lipidi, amido e proteine totali (%) per tutte le condizioni sperimentali. Sul surnatante è stati monitorati il pH, concentrazione di ionica, polifenoli e sCOD.

#### 3.4.7.3 Test in batch: coltivazione di *C. vulgaris* su feccia con pretrattamenti meccanici

Dati i dati sperimentali ottenuti dal test in batch con diluizione 1:5 e 1:2 della feccia rossa di vinificazione centrifugata, è stato svolto un ulteriore test in batch applicando centrifugazione e filtrazione come pretrattamenti della feccia di vinificazione rossa. La frazione liquida utilizzata per il test è stata ottenuta tramite centrifugazione a 9000 rpm per 5 minuti ed il surnatante ottenuto è stato filtrato a 0.2 µm tramite

filtri in acetato di cellulosa (Whatman). La feccia filtrata è stata caratterizzata in termini di pH, sCOD, polifenoli, cromatografia anionica e cationica e testata con diluizioni 1:5 e 1:2 in batch, per un volume totale di 200 ml. Le condizioni di controllo utilizzate hanno visto l'applicazione di *C. vulgaris* in mixotrofia con diluizione dell'inoculo di 1:5 e 1:2 in BG11 modificato. La mixotrofia è stata mantenuta applicando continuamente irradiazione luminosa (3.9 klux), agitazione meccanica (330 rpm) e insufflazione d'aria (2.3 lh<sup>-1</sup> vvm). Il test ha avuto durata di 28 giorni e le condizioni sperimentali e di controllo avevano le loro rispettive copie sperimentali. Il monitoraggio della biomassa è stato effettuato periodicamente (conta cellulare, peso secco e clorofille). Al termine della sperimentazione la biomassa ottenuta è stata collezionata e caratterizzata in termini di lipidi, amido e proteine totali (%) e sul surnatante sono stati monitorati pH, sCOD, concentrazioni di polifenoli, cromatografia anionica e cationica per identificare la rimozione degli ioni in soluzione.

### 3.5 Biochemical methane potential (BMP)

Il test di biometanazione della biomassa microalgale è stato svolto utilizzando come inoculo un digestato proveniente da un impianto di trattamento di fanghi da depurazione (municipali) nel nord Italia (Veneto). I substrati utilizzati per il test sono stati:

- Biomassa liofilizzata;
- Biomassa post congelamento;
- Biomassa liofilizzata (33%), feccia di vinificazione rosa (33%) e WAS (33%);
- Biomassa post congelamento (33%), feccia di vinificazione rosa (33%) e WAS (33%);
- Feccia di vinificazione rosa (50%) e WAS (50%).

Basandosi sullo studio di Angelidaki et al. [122], il test di biometanazione è stato svolto a temperatura di 39°C applicata in continuo, utilizzando bottiglie in vetro con volume di 150 ml sigillate con tappi in silicone e ghiera in modo da poter isolare il sistema e quantificare la produzione di biogas e la sua composizione. La scelta delle percentuali dei substrati utilizzati nelle prove BMP è stata dettata dalle condizioni di alimentazione utilizzate nell'impianto pilota DA alimentato a feccia di vinificazione, dove il rapporto in base TVS di feccia e WAS come input del sistema risulta del 50%. Per tutte le condizioni testate è stato applicato un rapporto substrato inoculo (S/I) di 0.5. Il test è terminato quando è stata identificata una produzione di biogas inferiore all'1 %, rispetto alla cumulativa, per tre giorni consecutivi [123]. Il digestato utilizzato per il test di BMP è stato caratterizzato prima della sperimentazione identificando i valori di TS e TVS, sCOD, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e VFAtot di 35.45 ± 0.06 gTS kg<sup>-1</sup>, 21.59 ± 0.75 gTVS kg<sup>-1</sup>, 356.87 ± 32.68 mgO<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>, 687.55 ± 9.40 mg l<sup>-1</sup> e 64.64 ± 0.57 mg l<sup>-1</sup> rispettivamente, alcalinità parziale e totale di 2825 mgCaCO<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> e 2162.5 mgCaCO<sub>3</sub> l<sup>-1</sup> rispettivamente.

La misurazione quantitativa del biogas prodotto è stata effettuata giornalmente mediante l'ausilio di un cilindro graduato contenente acqua acidificata per evitare la solubilizzazione della CO<sub>2</sub> (*water displacement*,

Figura 9). Il biogas ottenuto è stato collezionato in *gas bags* (Superlco, Tedlar, PA) e misurata la percentuale di CH<sub>4</sub> (ETG, Portable biogas analyzer MCA 100 Bio-P). I dati riportati sono stati standardizzati (Nl, 0°C a 1 atm [122]),



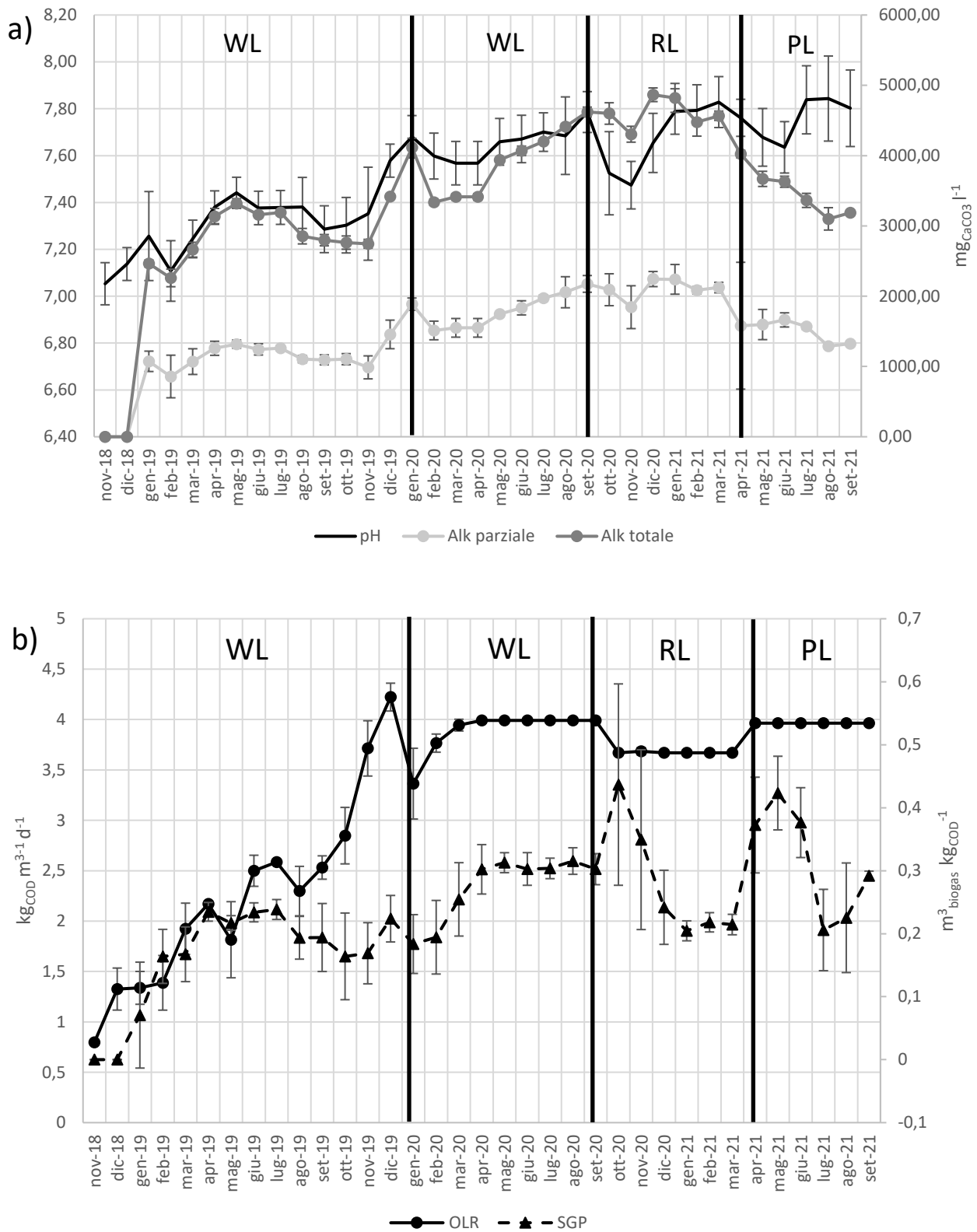
**Figura 9:** Metodo quantitativo di misurazione del biogas con cilindro graduato e setto di deviazione del biogas in uscita per collezionarlo all'interno delle gasbag.

## 4 Risultati e discussione

### 4.1 Digestione anaerobica della feccia di vinificazione

Attualmente, l'utilizzo della feccia di vinificazione come co-substrato nei sistemi DA risulta ancora poco approfondito. L'unico lavoro disponibile al riguardo è quello di Da Ros et al. [6], dove però il monitoraggio del sistema di DA risulta limitato all'applicazione di una sola tipologia di feccia di vinificazione come co-substrato per una durata complessiva di un anno. Data l'assenza di studi nel lungo periodo per il trattamento in DA della feccia di vinificazione, lo studio di tesi ha valutato l'applicazione di tutte le tipologie di feccia ottenibili dai processi di vinificazione nei sistemi DA a lungo termine. L'alimentazione del sistema è stata effettuata tramite *switch* diretti delle differenti tipologie di feccia applicate come co-substrato. La sperimentazione ha avuto una durata complessiva di tre anni ed ha valutato la produzione e composizione del biogas, la composizione del digestato in uscita dal sistema DA e la robustezza del trattamento al cambio repentino del substrato.

Il monitoraggio del sistema DA alimentato con differenti fecce di vinificazione (Figura 10) non ha evidenziato variazioni di pH né di accumulo di acidi grassi volatili al cambio di alimentazione. Le variazioni maggiori sono state riscontrate nella concentrazione dell'sCOD del digestato e nel biogas prodotto in risposta alla variazione delle fecce applicate come alimentazione del sistema DA.



**Figura 10:** Monitoraggio del sistema DA alimentato a fecchia bianca (WL), fecchia rossa (RL) e fecchia rosa (PL). a) monitoraggio dell'alcalinità parziale, alcalinità totale e pH; b) monitoraggio dell'ORL e SGP.

Il sistema di co-digestione del WAS e delle fecce di vinificazione è risultato stabile nei tre anni di sperimentazione. I valori stabili di alcalinità, che sottolineano la capacità tampone del sistema, unito alla bassa concentrazione di VFA ( $< 100 \text{ mg}_{\text{COD}} \text{ l}^{-1}$ ), la stabile percentuale di  $\text{CH}_4$  (63 %) e la stabilità generale dei parametri indicano un'attività di metanogenesi non inibita [29].

I dati relativi alla velocità di produzione del biogas (GPR) (Tabella 6) hanno evidenziato un abbassamento della produzione di biogas in corrispondenza dell'alimentazione con RL. L'abbassamento del GPR e l'aumento dell'sCOD durante l'alimentazione con RL possono essere associati all'alta concentrazione di polifenoli presenti in questa tipologia di feccia di vinificazione, portando ad una iniziale inibizione dei microorganismi, fatto evidenziato anche da un accumulo di sCOD che quindi non viene efficacemente convertito a gas. Come riportato da Da Ros et al. [29], l'etanolo presente nella feccia non risulta un composto limitante il processo DA, in quanto, anche se limitante la metanogenesi, dopo l'acclimatazione del sistema risulta facilmente e velocemente biodegradabile. Le analisi del bilancio di massa sui polifenoli dimostrano comunque un forte abbattimento della frazione polifenolica per tutte le fecce di vinificazione prese in esame, come identificato da Da Ros et al. [6], ottenendo una rimozione del 94 %. In questa sperimentazione, la quantificazione della rimozione polifenolica durante l'alimentazione con WL non è stata presa in esame data la bassa concentrazione di polifenoli iniziale, mentre per RL e PL la rimozione percentuale di polifenoli è risultata del 96.80 % e 89.72 % rispettivamente, in linea con i dati di Da Ros [6]. In Tabella 6 vengono riportati i dati di caratterizzazione dei differenti digestati ottenuti dall'alimentazione con feccia di vinificazione bianca (DIG-WL), rossa (DIG-RL) e rosa (DIG-PL). I dati ottenuti nella sperimentazione sul lungo periodo sono stati confrontati con l'unico lavoro disponibile in letteratura per il trattamento della feccia di vinificazione in mesofilia nei sistemi DA, condotto da Da Ros et al., [6]. I risultati evidenziano che nel lungo periodo la produzione di biogas, come la sua composizione in metano, risulta legata alla tipologia di feccia di vinificazione applicata come co-substrato e le concentrazioni di ammonio nell'effluente risultano pressoché stabili. La caratterizzazione del biogas in uscita dal sistema ha mostrato valori di metano percentuale di  $67.48 \pm 3.94 \%$ ,  $62.53 \pm 1.97 \%$  e  $62.46 \pm 2.64 \%$  per il biogas prodotto dalla degradazione di WL, RL e PL rispettivamente, in linea con Da Ros et al. che indica una percentuale di metano variabile dal 64 % al 73 % [6]. La percentuale di  $\text{CO}_2$  identificata durante la sperimentazione è risultata stabile nel tempo,  $22.79 \pm 0.65 \%$ ,  $23.68 \pm 0.81 \%$  e  $23.80 \pm 0.59 \%$  per il biogas prodotto dalla degradazione di WL, RL e PL rispettivamente.

**Tabella 6:** Caratterizzazione dei differenti digestati proveniente dalle alimentazioni del sistema con feccia di vinificazione bianca (DIG-WL), rossa (DIG-RL) e rosa (DIG-PL) durante lo stato stazionario (SSC).

	DIG-WL	DIG-RL	DIG-PL	Da Ros. et al. [6]
TS (gTS kg <sup>-1</sup> )	34.89 ± 1.74	38.09 ± 2.45	35.93 ± 4.47	24.30 ± 2.90
TVS (gTVS kg <sup>-1</sup> )	15.03 ± 1.12	17.90 ± 2.47	14.76 ± 2.01	14.20 ± 1.70
N ammoniacale (gN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> l <sup>-1</sup> )	0.84 ± 0.01	0.35 ± 0.07	0.36 ± 0.13	0.40 ± 0.05
Fosfati (mg l <sup>-1</sup> )	266.34 ± 19.31	161.65 ± 0.21	372.19 ± 12.02	213.84 ± 38.88
TKN (mgN gTS <sup>-1</sup> )	-	-	-	36.30 ± 4.50
COD sul secco (gO <sub>2</sub> gTS <sup>-1</sup> )	610.41 ± 10.59	868.05 ± 39.65	-	559.67
sCOD (gO <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> )	0.23 ± 0.04	0.41 ± 0.03	0.25 ± 0.04	0.40 ± 0.20
VFA tot (gCOD l <sup>-1</sup> )	0.14 ± 0.05	-	-	-
pH	7.69 ± 0.01	7.80 ± 0.02	7.78 ± 0.14	7.46 ± 0.19
Alcalinità totale (g CaCO <sub>3</sub> l <sup>-1</sup> )	2.27 ± 0.07	2.47 ± 0.09	1.85 ± 0.07	2.24 ± 0.2
Alcalinità parziale (g CaCO <sub>3</sub> l <sup>-1</sup> )	1.95 ± 0.11	2.14 ± 0.08	1.49 ± 0.17	1.37 ± 0.12
OLR (kgCOD m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	3.99	3.66	3.96	3.2
GPR (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> d <sup>-1</sup> )	1.23 ± 0.02	0.77 ± 0.02	0.85 ± 0.05	1.2
SGP (m <sup>3</sup> <sub>biogas</sub> kgCOD <sup>-1</sup> )	0.30 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.01	0.38 ± 0.04

La caratterizzazione del digestato riportata in Tabella 6 mostra caratteristiche del digestato similari per tutte le fecce di vinificazione testate e applicando lo stesso OLR per il trattamento di ognuna. Le differenze riscontrabili rispetto allo studio di Da Ros et al. [6] possono essere associate alla diversa tipologia di feccia utilizzata, in quanto le caratteristiche dei reflui di vinificazione risultano strettamente legati alla tipologia di processo produttivo applicato che può essere differente da cantina a cantina, rendendo i confronti complessi. Il sistema di trattamento DA è risultato stabile nel lungo periodo, anche se il cambio di feccia nell'alimentazione ha influito negativamente sul sistema DA, in particolar modo l'applicazione di RL e PL, contenenti un'alta concentrazione di sCOD e polifenoli ha comportato un probabile sovraccarico del sistema ed un abbassamento dell'SGP. La scelta di valutare il sistema DA applicando cambi di alimentazione senza riduzione dell'OLR per adattare il sistema biologico è stata svolta in ottica di valutazione della robustezza del sistema DA e potenziale applicazione nelle cantine per lo smaltimento della feccia, dove, per le



cooperative vinicole, tipicamente la produzione di differenti fecce risulta celere e necessita di veloce smaltimento. Come sottolineato da Da Ros et al. [6] e da ricerca bibliografica, non risultano studi né sull'applicazione a lungo termine della feccia di vinificazione nei sistemi DA né studi sull'applicazione nel sistema DA di tutte le fecce che derivano dai diversi processi produttivi del vino. Questo studio si pone quindi come primo studio a lungo termine per la valutazione del sistema DA nel trattamento della feccia di vinificazione, identificando l'effettivo trattamento della feccia di vinificazione a lungo termine per tutte le tipologie di feccia vinicola, ottenendo promettenti produzioni di biogas per la produzione di energia. La frazione liquida del digestato vinicolo ottenuto mostra concentrazioni di fosforo e ammonio che possono limitare la sua applicazione nel ricircolo negli impianti di trattamento aerobico, in quanto vi è la necessità di trattamenti specifici per la loro rimozione. Queste caratteristiche chimiche del digestato pongono però la frazione liquida come potenziale substrato idoneo alla coltivazione microalgale, permettendo così un trattamento biologico terziario che porterebbe alla fitodepurazione dell'effluente DA e produzione di biomassa microalgale applicabile per la produzione di prodotti secondari ad alto valore aggiunto o energia.

#### 4.2 Identificazione dei pretrattamenti sul digestato da FORSU e metabolismo cellulare per la coltivazione microalgale

Il lavoro riportato nel seguente capitolo è estratto dalla pubblicazione Scarponi P., Volpi Ghirardini A.M., Bravi M., Cavinato C. Evaluation of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* growth on pretreated organic solid waste. Waste Management 119, 235-241. 2021 [124].

Durante il primo periodo di alimentazione del sistema DA con feccia di vinificazione, il digestato uscente non risultava in condizioni di stato stazionario, quindi inapplicabile per le sperimentazioni di coltivazione microalgale. Dati i tempi di attesa necessari per l'utilizzo del digestato da feccia di vinificazione, i primi test sono stati effettuati utilizzando digestato da frazione organica di reflui municipali (FORSU), focalizzandosi sull'identificazione dei pretrattamenti necessari e condizioni metaboliche da utilizzare per la coltivazione microalgale. Il digestato da FORSU è un digestato facilmente reperibile data l'abbondanza di FORSU prodotta annualmente, circa 2.2 miliardi di tonnellate l'anno traducibili in 2kg pro capite al giorno [125]. Lo smaltimento della FORSU avviene solitamente tramite compostaggio dove però si hanno varie problematiche relative ai consumi legati all'aerazione dei cumuli, alle emissioni di GHG ed una valorizzazione energetica nulla [125]. Ad oggi, lo smaltimento della FORSU tramite sistemi integrati DA-compostaggio è in costante crescita, nello specifico con DA in condizioni semi-dry mediante co-digestione con WAS [126]. Come riportato da Bolzonella et al. [127], circa 400,00 tonnellate annue di FORSU vengono prodotte in Europa ed il processo di co-digestione porta alla produzione di 180,00 MWh termali e 112,00 MWh elettrici per anno. L'applicazione della FORSU negli impianti DA è associata alla sua elevata biodegradabilità, scarsa presenza di micro-contaminanti e materiali inerti, mostrando produzioni di 200 m<sup>3</sup> di biogas per tonnellata di FORSU trattata. Il biogas prodotto può essere convertito in 300 l kg<sup>-1</sup> solidi volatili totali di

metano, comportando una riduzione delle emissioni di CO<sub>2</sub> di 200-300 kgCO<sub>2</sub>t<sup>-1</sup> [126]. La FORSU è un rifiuto di tipologia annuale ed è composto da rifiuto organico, prevalentemente cibo, residui di carta ed altro materiale organico.

Le caratteristiche del digestato uscente dal sistema DA alimentato a FORSU mostrano una ripartizione in frazione solida (10-20%) e frazione liquida (80-90%), dove la frazione solida può essere compostata o utilizzata come bio-fertilizzante ma la frazione liquida, che contiene la maggior parte dei composti organici, azoto e fosforo, necessita di pretrattamenti. Le elevate concentrazioni di N e P ne impediscono il rilascio ambientale e varie tipologie di pretrattamento sono state studiate per il trattamento della frazione liquida, quali lo strippaggio, trattamento chimico e biologico (i.e. ANAMMOX) ma hanno eccessivi costi operativi [128–131].

Data quindi la facile reperibilità del digestato da FORSU e le sue caratteristiche, il digestato da FORSU è stato utilizzato come substrato per la coltivazione microalgale per i test preliminari volti all'identificazione dei pretrattamenti necessari sul digestato per avere crescita microalgale, condizione metabolica microalgale da applicare (mixotrofia o eterotrofia) e ceppo microalgale con maggior resistenza e produzione di metaboliti secondari da testare sul digestato vinicolo.

Il test in batch ha confrontato la coltivazione di *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* in presenza di digestato da FORSU senza pretrattamenti (noPT), dopo centrifugazione (AC) e dopo filtrazione a 0.45 µm (AUF) in mixotrofia ed eterotrofia (Figura 11). La sperimentazione ha mostrato l'inapplicabilità del monitoraggio attraverso valutazione della densità ottica allo spettrofotometro per la quantificazione della biomassa microalgale nelle differenti condizioni sperimentali in presenza di digestato data la colorazione gialla del mezzo e la presenza di solidi sospesi (condizione noPT). L'analisi spettrofotometrica risulta inapplicabile in quanto non permette la discriminazione delle cellule microalgali dal particolato del digestato che influenza negativamente anche l'analisi di conta cellulare al microscopio ottico data la presenza di particolato fine.



**Figura 11:** Condizioni sperimentali con digestato da FORSU diluito 1:10 senza pretrattamenti (noPT), dopo centrifugazione (AC), dopo filtrazione a 0.45  $\mu\text{m}$  (AUF).

I dati ottenuti dalla sperimentazione in batch (Tabella 6) mostrano la scarsa capacità di utilizzo del glucosio da parte dei due ceppi microalgali se confrontati con il controllo autotrofo, in quanto l'applicazione della coltivazione mixotrofia indica valori di tasso di crescita identici alla condizione autotrofa, identificando la fotosintesi come via preferenziale per la produzione di biomassa. Le coltivazioni eterotrofe di controllo in presenza di glucosio mostrano una scarsa produzione di biomassa e valori di tasso di crescita confrontabili con lo studio di Di Caprio et al. [119] ( $0.29 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$ ). Questa scarsa produzione di biomassa in presenza di glucosio può essere associabile a differenti fattori, quali l'assenza di vari enzimi (tra cui l'enzima lattato deidrogenasi) che permettono l'assimilazione del glucosio [132] o l'applicazione di una bassa concentrazione di carbonio organico che è risultata velocemente assimilata dai ceppi microalgali risultando limitante. Le coltivazioni in presenza di digestato noPT mostrano la necessità di pretrattamenti del digestato volti a rimuovere la frazione solida per ottenere crescita microalgale (Tabella 7). Ponendo a confronto i due ceppi microalgali, *C. vulgaris* mostra capacità di crescita su digestato migliori rispetto a *S. obliquus* nelle condizioni mixotrofiche AC ed AUF e l'inibizione della crescita identificata nelle condizioni eterotrofiche e noPT indicano che vi è la necessità di pretrattamento del digestato per rimuovere la frazione solida ed irraggiamento luminoso. Ponendo a confronto i dati ottenuti dalla crescita mixotrofica dei due ceppi nelle condizioni AC e AUF, non si identificano variazioni di crescita microalgale tra l'applicazione dei due pretrattamenti ma *C. vulgaris* mostra valori di crescita migliori rispetto a *S. obliquus* come riportato da Zuliani et al. [133]. I dati di tasso di crescita ( $\mu$ ) ottenuti risultano confrontabili con i dati pubblicati da Uggetti et al. [41] e Khanh [134] dove la variazione del tasso di crescita tra  $0.2 \text{ d}^{-1}$  e  $1 \text{ d}^{-1}$  è associata a parametri quali irradiazione luminosa, torbidità del digestato, inoculo e composizione del digestato. Dato interessante è la variazione della capacità di crescita di *S. obliquus* tra le condizioni mixotrofiche AC e AUF, dove la diminuzione della crescita all'aumento dei trattamenti applicati potrebbe essere associata alla rimozione di molecole o microrganismi, che attuerebbero un meccanismo sintrofico per la degradazione di

composti limitanti la crescita, post filtrazione che limitano la crescita di *S. obliquus*. Confrontando i dati di crescita di *C. vulgaris* e *S. obliquus* nelle condizioni mixotrofiche AC e AUF, la rimozione tramite filtrazione di batteri o funghi dal digestato non sterilizzato potrebbe influenzare la crescita di *S. obliquus* rimuovendo microrganismi con effetto sintrofico sulla coltura [135].

**Tabella 7:** Conta cellulare e tasso di crescita di *C. vulgaris* e *S. obliquus* nelle differenti condizioni metaboliche di crescita (autotrofia, mixotrofia ed eterotrofia) nelle condizioni di controllo (1 g l<sup>-1</sup> di glucosio) ed in presenza di digestato senza pretrattamenti (noPT), dopo centrifugazione (AC) e filtrazione (AUF) con diluizione 1:10.

	Conta cellulare (milioni di cellule ml <sup>-1</sup> )		Tasso di crescita (μ, d <sup>-1</sup> )	
	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. obliquus</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>S. obliquus</i>
Autotrofia	138.10 ± 4.00	44.00 ± 1.00	0.41 ± 0.02	0.30 ± 0.00
Mixotrofia (1 g l <sup>-1</sup> Glucosio)	140.00 ± 12.00	27.00 ± 2.00	0.41 ± 0.02	0.30 ± 0.00
Eterotrofia (1 g l <sup>-1</sup> Glucosio)	44.20 ± 11.00	23.10 ± 0.80	0.27 ± 0.20	0.20 ± 0.10
Mixotrofia Digestato noPT	98.00 ± 10.00	92.10 ± 27.00	0.44 ± 0.01	0.40 ± 0.10
Mixotrofia Digestato AC	479.00 ± 31.00	131.00 ± 12.00	0.60 ± 0.00	0.50 ± 0.10
Mixotrofia Digestato AUF	539.00 ± 11.00	123.00 ± 20.00	0.60 ± 0.00	0.40 ± 0.00
Eterotrofia Digestato noPT	15.00 ± 1.00	11.60 ± 0.10	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.10
Eterotrofia Digestato AC	4.20 ± 0.00	7.10 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.10 ± 0.10
Eterotrofia Digestato AUF	3.20 ± 0.40	6.00 ± 0.90	0.01 ± 0.01	0.10 ± 0.10

Sulla base dei dati ottenuti è possibile dedurre che entrambi i ceppi microalgali possono crescere in presenza di digestato da FORSU diluito 1:10 in condizione di mixotrofia applicando pretrattamenti (AC e AUF). Nello specifico, la sola centrifugazione come pretrattamento mostra risultati confrontabili di produzione di biomassa per entrambi i ceppi, potendo così diminuire i potenziali costi del processo del 20-30% eliminando la sterilizzazione/filtrazione del digestato. In aggiunta, la centrifugazione viene largamente applicata come metodologia di recupero della biomassa microalgale data la flessibilità e capacità di trattamento di grandi volumi, anche se con richieste energetiche abbastanza elevate [136].

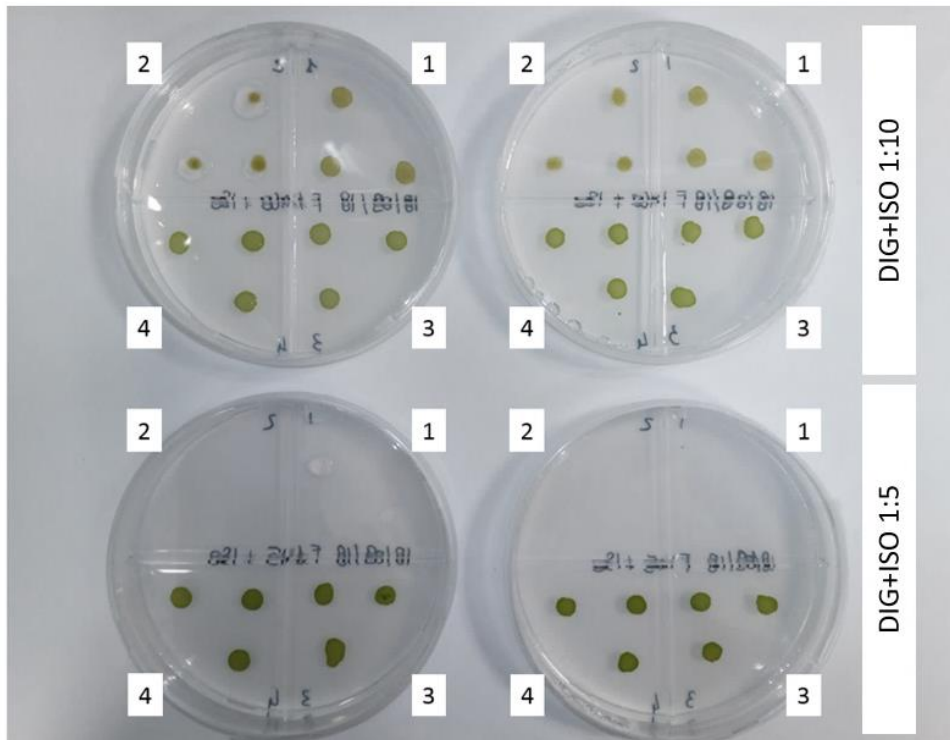
La rimozione totale dell'ammonio nelle condizioni sperimentali in cui è avvenuta crescita microalgale (noPT, AC e AUF) dopo otto giorni, risultando compresa tra il 96 % ed il 99 %, è in linea con i dati ottenuti da Franchino [137], Ledda [138], Kumar[139], Ji [140] e Cicci [141]. Le condizioni sperimentali hanno posto i ceppi a concentrazioni iniziali di N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> non tossiche (50 mg N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> l<sup>-1</sup>) e la rimozione del 50 % dell'ammoniaca in soluzione è stata identificata a 24 h dall'inizio del test, la rimozione quindi può essere associata probabilmente ad un effetto congiunto dello strippaggio ed utilizzo nel metabolismo microalgale, dove valori alti di pH determinati dall'attività fotosintetica aumentano la rimozione dell'ammonio tramite strippaggio ed allo stesso tempo la biomassa ne utilizza il 25-35 % [138,142–144].

Sulla base dei dati ottenuti si evince che per entrambi i ceppi la condizione di crescita applicabile è quella di mixotrofia per la coltivazione su digestato, con necessità di pretrattamento del digestato per rimuovere i solidi sospesi. Il confronto tra le crescite in mixotrofia di *C. vulgaris* e *S. obliquus* indica che la centrifugazione può essere applicata come singolo pretrattamento sul digestato, senza necessità di filtraggio a 0.45 µm. In aggiunta, l'analisi dei dati di crescita microalgale hanno mostrato che la filtrazione può avere un effetto negativo per la coltivazione di *S. obliquus* su digestato, probabilmente associato alla rimozione della microfauna del digestato che può avere un effetto sintrofico per la proliferazione del ceppo microalgale. Ovviamente per l'applicabilità del sistema di coltivazione microalgale su digestato su larga scala vi è la necessità di migliorare principalmente le condizioni operative di sistema che pesano maggiormente sull'*up-stream*: la diluizione del digestato ed i pretrattamenti meccanici necessari alla sua applicazione come substrato nelle colture microalgali. L'identificazione di coltivazioni a basse diluzioni del digestato permetterebbero un trattamento efficiente in tempi minori, mentre l'applicazione della sola centrifugazione potrebbe ad un abbattimento dei costi degli impianti di trattamento in quanto potrebbe essere utilizzata sia nell'*up-stream* del pretrattamento del digestato che nel *down-stream* per il recupero della biomassa microalgale.

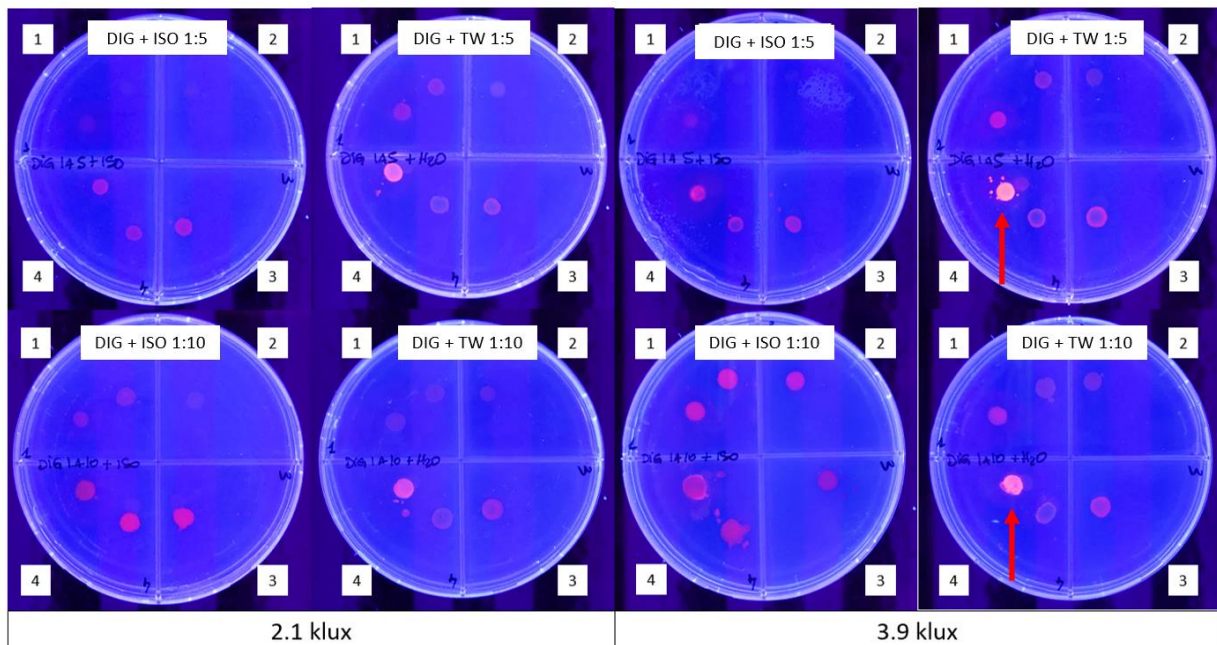
### 4.3 Screening su piastra Petri

Il seguente capitolo è estratto dalla pubblicazione Scarponi P., Bonetto A., Bolzonella D., Astals S., Cavinato C. Anaerobic Co-Digestion effluent as substrate for *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* cultivation. *Energies* 13 (18), 4880. 2020.

Lo *screening* su piastra Petri è stato effettuato applicando differenti concentrazioni di digestato da FORSU diluito 1:5 e 1:10 con mezzo sintetico o acqua di rete applicando differenti intensità di irradiazione luminosa (28.35 µmol di fotoni m<sup>-2</sup> e 52.65 µmol di fotoni m<sup>-2</sup>). Come si evidenzia in Figura 11, l'effetto di inibizione della crescita è evidente per il ceppo *S. obliquus* (1 e 2 in Figura 12), come riportato da Zuliani et al. [133], contrariamente *C. vulgaris* mostra un aumento della biomassa prodotta in presenza di digestato a diluzioni inferiori. Sulle colonie ottenute nelle varie condizioni sperimentali è stato applicato un ulteriore *screening* tramite il reagente Nile red che viene tipicamente utilizzato per la visualizzazione dello stoccaggio di composti idrofobici (i.e. PHA, lipidi) nelle biomasse microbiologiche (Figura 13). La colorazione è stata applicata su tutte le colonie, le colonie utilizzate come "bianco", non sottoposte a colorazione, sono state comunque esposte ad irradiazione UV in modo da eliminare l'emissione di fondo. Questa metodologia di screening è una tipologia qualitativa, un metodo veloce e pratico per valutare la produzione di prodotti secondari idrofobici nei microrganismi su varie tipologie di substrato rispetto alle tipiche estrazioni con solventi [145]. È una metodologia tipicamente applicata per cellule animali e batteri ma non risultano applicazione su ceppi microalgali ponendo questo studio come prima evidenza di applicabilità anche su cellule microalgali [121,146,147].



**Figura 12:** Screening in piastra Petri dei ceppi *S. obliquus* (1 e 2) e *C. vulgaris* (3 e 4) su digestato da FORSU diluito 1:5 e 1:10 con ISO 8692 (DIG+ISO) o acqua di rete (DIG+TW).



**Figura 13:** Screening con Nile red sulle colonie microalgali dei ceppi *S. obliquus* (1 e 2) e *C. vulgaris* (3 e 4) coltivate su digestato 1:5 e 1:10 diluito con mezzo sintetico (ISO) e acqua di rete (TW) a differenti intensità di irradiazione luminosa (2.1 klux e 3.9 klux). Immagine ottenuta dopo 20 minuti di colorazione al buio che mostra l'emissione del colorante legato ai composti idrofobici sotto eccitazione con radiazione UV.

#### 4.3.1 Valutazione della crescita microalgale a concentrazioni maggiori di digestato FORSU

Il seguente capito è estratto dalla pubblicazione Scarponi P., Bonetto A., Bolzonella D., Astals S., Cavinato C. Anaerobic Co-Digestion effluent as substrate for *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* cultivation. *Energies* 13 (18), 4880. 2020.

I dati ottenuti dallo screening in piastra Petri sono stati confermati testando i ceppi microalgali in batch su digestato da FORSU diluito 1:5 con mezzo sintetico o acqua di rete per i ceppi microalgali *C. vulgaris* e *S. obliquus*. Il monitoraggio della crescita cellulare mediante conta diretta, peso secco e densità ottica (OD,  $\lambda = 680$  nm e 750 nm) ha confermato i dati ottenuti dallo screening in piastra Petri: la capacità di crescita di *C. vulgaris* in ogni condizione sperimentale, contrariamente a *S. obliquus* (Tabella 8). Simili risultati sono stati ottenuti da Zuliani et al. [133], dove è stata identificata l'inibizione di *S. obliquus*, con differenze relative alla densità cellulare che risulta inferiore rispetto allo studio prima citato (2.0 e 1.8 volte inferiore per *C. vulgaris* e *S. obliquus* rispettivamente). Queste differenze in produzione possono essere associate ai differenti *set up* sperimentali, dove Zuliani et al. applicano sia la sterilizzazione del mezzo di crescita che areazione della coltura microalgale, contrariamente le condizioni sperimentali da noi applicate hanno visto l'applicazione della sola centrifugazione del digestato e l'assenza di areazione per effettuare una valutazione relativa della crescita microalgale associata al consumo del substrato e rimozione dell'ammonio. Le analisi in microscopia ottica durante la conta cellulare evidenziavano un cambiamento morfologico delle cellule di *C. vulgaris*, dove al proseguire della sperimentazione incrementavano di diametro, probabilmente in risposta all'accumulo di composti intracellulari, come identificato precedentemente in piastra Petri. La crescita maggiore riscontrata nelle condizioni di diluizione con acqua di rete può essere associata alla composizione ionica dell'acqua utilizzata, portando ad un aumento delle concentrazioni di ioni essenziali (quali il  $Mg^{2+}$  per le clorofille), permettendo così una proliferazione maggiore.

**Tabella 8:** Concentrazione cellulare, densità cellulare (OD) e peso secco dei ceppi *C. vulgaris* e *S. obliquus* nelle differenti condizioni sperimentali: mezzo sintetico (ISO), acqua di rete (TW), digestato da FORSU diluito 1:5 con acqua di rete (DIG+TW) o mezzo sintetico (DIG+ISO).

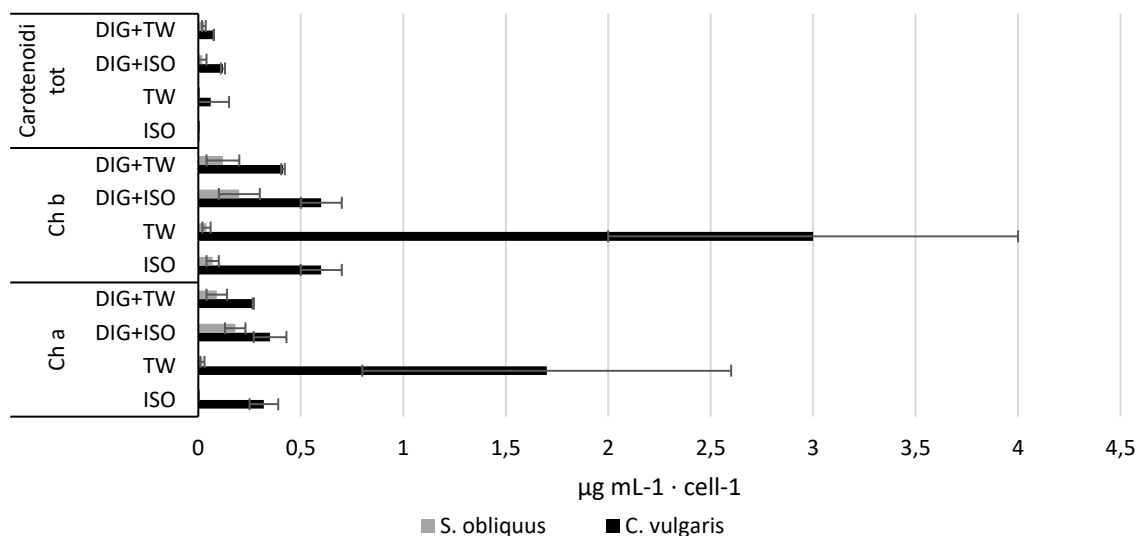
		<i>C. vulgaris</i>	<i>S. obliquus</i>
<b>OD<sub>680</sub></b>	ISO	0.40 ± 0.02	0.50 ± 0.10
	TW	0.05 ± 0.01	0.50 ± 0.03
	DIG+ISO	1.08 ± 0.01	0.04 ± 0.03
	DIG+TW	1.20 ± 0.10	0.37 ± 0.05
<b>OD<sub>750</sub></b>	ISO	0.39 ± 0.01	0.54 ± 0.04
	TW	0.07 ± 0.01	0.56 ± 0.03
	DIG+ISO	0.86 ± 0.01	0.11 ± 0.02
	DIG+TW	1.03 ± 0.08	0.42 ± 0.04
<b>Milioni di cellule ml<sup>-1</sup></b>	ISO	32 ± 8.00	29.0 ± 8.00
	TW	6 ± 2.00	15.0 ± 4.00
	DIG+ISO	40 ± 8.00	2.70 ± 0.20
	DIG+TW	49 ± 1.00	4.90 ± 0.90
<b>Peso secco (g l<sup>-1</sup>)</b>	ISO	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.02
	TW	0.01 ± 0.00	0.2 ± 0.07
	DIG+ISO	0.25 ± 0.00	0.16 ± 0.00
	DIG+TW	0.31 ± 0.00	0.23 ± 0.01
<b>Tasso di crescita (μ, d<sup>-1</sup>)</b>	ISO	0.2 ± 0.03	0.25 ± 0.30
	TW	0 ± 0.04	0.17 ± 0.30
	DIG+ISO	0.23 ± 0.02	0 ± 0.00
	DIG+TW	0.25 ± 0.00	0.03 ± 0.20

Al termine del test batch, sono stati misurati i pigmenti (Figura 14) e le rimozioni di anioni e cationi nelle varie condizioni sperimentali (Figura 15 a e b).

Per *S. obliquus*, i contenuti di clorofilla *a* e *b* (Ch *a* e Ch *b*) e carotenoidi totali nella biomassa al termine del test in batch mostrano valori simili tra le condizioni di controllo (ISO e TW) e le condizioni sperimentali (DIG+ISO e DIG+TW). Contrariamente *C. vulgaris* mostra un aumento delle concentrazioni di carotenoidi totali in presenza di digestato, mentre la coltivazione su acqua di rete ha favorito l'accumulo di clorofilla *a* e *b*. Il rapporto Ch *a*/Carotenoidi<sub>totali</sub> viene tipicamente utilizzato per identificare condizioni di stress durante la crescita cellulare, associate all'aumento di carotenoidi [147]. I valori ottenuti, se posti a confronto con lo studio di Zuliani et al. [133] dove entrambi i ceppi risultavano in condizione di inibizione, che riporta come valore del rapporto pari a 1.87, portano ad un rapporto Ch *a*/Carotenoidi<sub>totali</sub> di  $6.6 \pm 0.8$  e  $9.0 \pm 0.2$  nelle

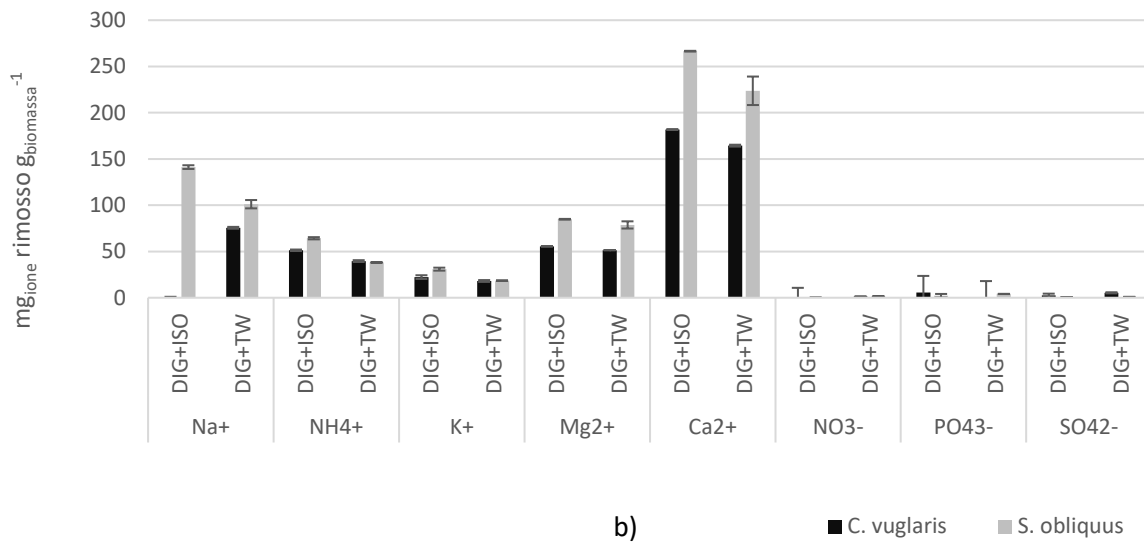
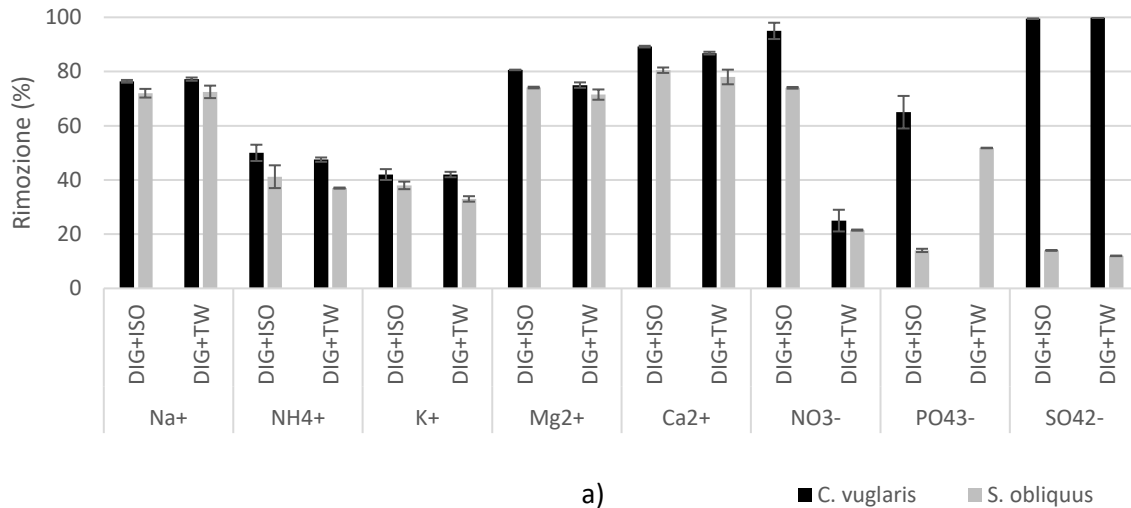


condizioni sperimentali DIG+ISO e DIG+TW rispettivamente, concludendo che *C. vulgaris* non risulta in condizioni di stress in presenza di digestato da FORSU a diluizione 1:5 in batch.



**Figura 14:** Concentrazione di clorofilla a, b (Ch a e b) e carotenoidi totali nella biomassa di *C. vulgaris* e *S. obliquus* al termine del test in batch nelle condizioni di controllo (mezzo sintetico, ISO, e acqua di rete, TW) e sperimentali: digestato da FORSU 1:5 diluito con mezzo sintetico o acqua di rete (DIG+ISO e DIG+TW).

La sperimentazione è stata svolta in assenza di insufflaggio, riportando una rimozione di ammonio in soluzione superiore al 40 % che può essere correlata al diretto metabolismo microalgale [142,148]. Come prevedibile, la rimozione di ammonio identificata è inferiore rispetto ad altri studi, quali Massa et al. [149], Xia e Murphy [150], Gentili et al. [151], Ledda et al. [148] che indicano la quasi totale rimozione dell'ammonio. Questa differenza è legata al *set up* sperimentale, dove l'insufflazione e pH elevati portano allo strappaggio dell'ammonio in tempi brevi. Per quanto riguarda la rimozione del nitrato, i dati ottenuti sono vicini a quelli riportati da Park et al. [152], che indica una proporzionalità tra rimozione di nitrato con incremento della biomassa microalgale. Il 91 % - 99 % di rimozione di fosfato risulta in linea con le pubblicazioni di Gentili et al. e Riuz-Martinez et al. [144,151] mentre la rimozione del solfato risulta maggiore per *C. vulgaris* rispetto a *S. obliquus* dato che potrebbe essere associato ai processi del metabolismo aerobico (fissazione della CO<sub>2</sub>, bio-produzione di O<sub>2</sub>, fissazione della N<sub>2</sub> e la riduzione dello ione nitrato). Per questo motivo l'assenza di rimozione del fosfato per il ceppo *S. obliquus* può essere direttamente associata alla sua assenza di crescita [153,154].



**Figura 15:** a) Rimozione degli ioni (%) di *C. vulgaris* e *S. obliquus* nelle condizioni sperimentali in presenza di digestato da FORSU diluito 1:5 con acqua di rete (DIG+TW) o mezzo sintetico (DIG+ISO); b) Rimozione giornaliera in mg<sub>ione rimosso</sub> g<sub>biomassa</sub><sup>-1</sup> nelle condizioni sperimentali in presenza di digestato da FORSU diluito 1:5 con acqua di rete (DIG+TW) o mezzo sintetico (DIG+ISO).

In conclusione, la sperimentazione in piastra Petri e la successiva sperimentazione in batch hanno mostrato la miglior capacità di crescita di *C. vulgaris* in presenza di digestato, anche a basse diluizioni, con valori di rimozione per gli ioni Na<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> maggiori rispetto a *S. obliquus*. Perciò le sperimentazioni successive vedranno l'acclimatazione del ceppo *C. vulgaris* alla presenza di digestato ed applicazione del ceppo per il trattamento del digestato vinicolo.

#### 4.4 Effetto sulla coltivazione di *C. vulgaris* del digestato da FORSU e digestato da feccia di vinificazione

Il seguente capitolo è estratto dalla pubblicazione Scarponi P., Izzo F.C., Bravi M., Cavinato C. *C. vulgaris* growth batch tests using winery digestate as promising raw material for biodiesel and stearin production. Waste Management. (Accepted after minor revision).

##### 4.4.1 Acclimatazione di *C. vulgaris*

*C. vulgaris*, identificata come miglior specie per la coltivazione su digestato, è stato acclimatato per la coltivazione su digestato da FORSU diluito 1:5 mediante inoculi seriali al fine di un ottenere un ceppo più robusto e applicabile in un sistema in semicontinuo. *C. vulgaris*, fornito dalla collezione ACUF, risultava come “wild type”. Perciò il ceppo è stato acclimatato alla coltivazione su digestato al fine di ottenere, ad esempio, un aumento della produzione di biomassa [78,155]. L’acclimatazione del ceppo è avvenuta tramite l’applicazione di inoculi seriali in fase esponenziale utilizzando inizialmente digestato da FORSU 1:10 e successivamente digestato da FORSU diluito 1:5, monitorando ed indentificando un aumento della produzione di biomassa e del tasso di crescita, da  $0.37 \pm 0.03 \text{ g l}^{-1}$  a  $0.61 \pm 0.03 \text{ g l}^{-1}$  e da  $0.18 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$  a  $0.23 \pm 0.00 \text{ d}^{-1}$  rispettivamente. Il ceppo acclimatato è stato testato applicando un test in batch su due diversi digestati: digestato da FORSU (DIG-FORSU) e digestato da feccia di vinificazione (DIG-WL) diluiti 1:5.

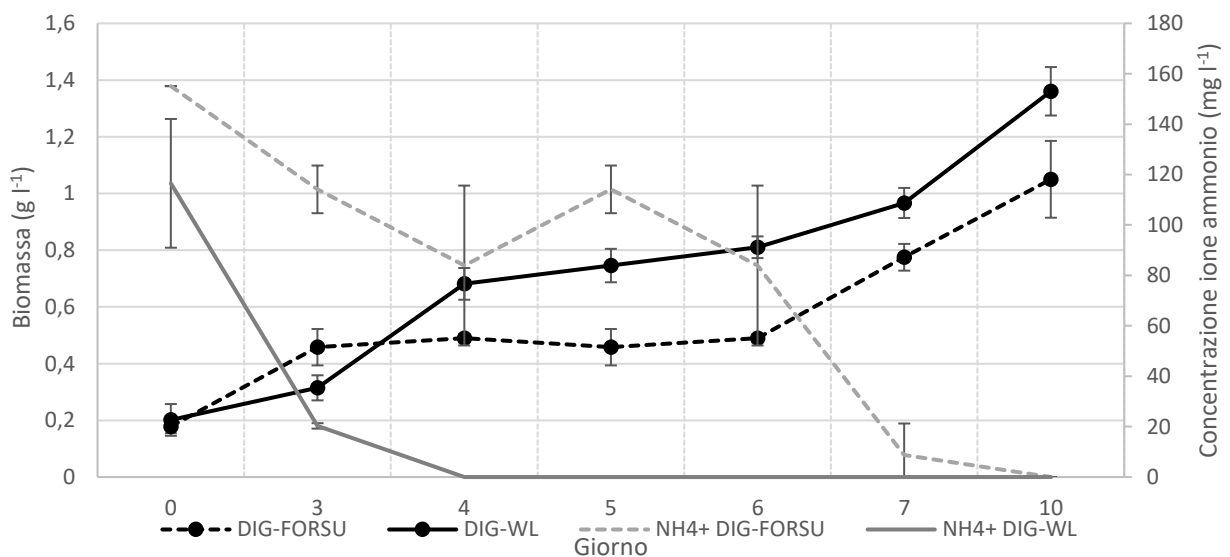
##### 4.4.2 Effetto dell’applicazione di differenti digestati a basse diluizioni sulla biomassa microalgale

Il ceppo acclimatato di *C. vulgaris* è stato coltivato applicando digestato da FORSU (DIG-FORSU) e digestato da feccia di vinificazione bianca (DIG-WL) diluiti 1:5 in fotobioreattori tubolari verticali (PBR) da 4 litri per valutare l’effetto del digestato sulla biomassa microalgale, robustezza del ceppo ed effetto depurativo sull’effluente. L’applicazione del DIG-FORSU a basse diluizioni, come per altre tipologie di digestato, comporta l’inibizione determinata dalle alte concentrazioni di ammonio, ma anche altri vari fattori che possono inibire la proliferazione microalgale. Il DIG-WL, oltre alle elevate concentrazioni di ammonio, presenta composti polifenolici e metalli pesanti (i.e. rame) che hanno un potenziale effetto inibitorio sulla crescita microalgale [156,157].

La sperimentazione ha confermato la robustezza del ceppo acclimatato che risulta capace di crescere su due differenti tipologie di digestato con una concentrazione finale di biomassa di  $1.36 \pm 0.08 \text{ g l}^{-1}$  e  $1.05 \pm 0.13 \text{ g l}^{-1}$  su DIG-WL e DIG-FORSU rispettivamente. I dati ottenuti risultano in linea con i valori ottenuti da Veronesiv [158] e Skorupskaite [159] ( $1.52 \text{ g l}^{-1}$  e  $1.4 \text{ g l}^{-1}$  rispettivamente) per *Chlorella* coltivata su digestato. Ponendo a confronto la crescita della biomassa con la rimozione di ammoniaca nel mezzo (Figura 16), il ceppo acclimatato mostra simili fasi esponenziali, contrariamente la rimozione nel tempo dell’ammonio risulta differente. La rimozione di ammonio in presenza di DIG-WL è stata celere, con rimozione totale dell’ammonio al quarto giorno di sperimentazione, mentre in presenza di DIG-FORSU la rimozione totale dell’ammonio è avvenuta al nono giorno di sperimentazione. Questa differenza di rimozione

e produzione di biomassa ottenuta nell'applicazione di differenti tipologie di digestato può essere associata alla concentrazione iniziale di ammonio inferiore nel DIG-WL rispetto al DIG-FORSU ( $116.00 \pm 25.00 \text{ mg l}^{-1}$  e  $196.00 \pm 38.00 \text{ mg l}^{-1}$  rispettivamente), risultando meno limitante per la proliferazione microalgale. Come riportato da Park et al. [152] la concentrazione inibente la crescita microalgale risulta  $200 \text{ mg l}^{-1}$ , perciò, dati i valori sperimentali di ammonio durante i test, il DIG-FORSU ha avuto un effetto parzialmente inibente la crescita, dove però viene comunque completamente rimosso dall'effetto sinergico dell'attività metabolica del ceppo acclimatato e strippaggio, dati i valori di pH della soluzione che sono risultati di  $9.20 \pm 0.50$  e  $8.63 \pm 0.03$  per il DIG-FORSU e DIG-WL rispettivamente.

La rimozione di altri composti ionici in soluzione ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Tabella 9) ha sottolineato che le rimozioni ioniche sono principalmente legate alla proliferazione della biomassa, come per il magnesio che è il costituente essenziale delle clorofille [160],  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  che sono fondamentali per l'attività fotosintetica, metabolismo del glicerolo e componente strutturale della membrana dei tilacoidi. La bassa o nulla rimozione del potassio invece può essere associata all'assenza di stress salino, che ne comporta invece un accumulo intracellulare [161].



**Figura 16:** Produzione di biomassa del ceppo *C. vulgaris* acclimatato e rimozione di ammonica in presenza di digestato da FORSU (DIG-FORSU) e digestato vinicolo (DIG-WL) con diluizione 1:5.

**Tabella 9:** Composizione ionica iniziale e finale e rimozione percentuale ionica del mezzo di crescita in presenza di digestato da FORSU (DIG-FORSU) e da feccia di vinificazione bianca (DIG-WL) diluiti 1:5.

		Concentrazione iniziale (mg l <sup>-1</sup> )	Concentrazione finale (mg l <sup>-1</sup> )	Rimozione (%)
DIG-FORSU	Na <sup>+</sup>	315.0 ± 35.0	276.9 ± 0.4	11.8 ± 2.5
	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	196.0 ± 38.0	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	K <sup>+</sup>	150.0 ± 7.0	197.0 ± 8.0	-43.2 ± 9.5
	Mg <sup>2+</sup>	136.0 ± 7.0	85.0 ± 3.0	37.1 ± 0.9
	Ca <sup>2+</sup>	417.0 ± 58.0	205.0 ± 4.0	50.7 ± 0.21
DIG-WL	Na <sup>+</sup>	286.0 ± 4.0	235.0 ± 45.0	17.9 ± 0.1
	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	117.0 ± 25.0	0.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
	K <sup>+</sup>	104.0 ± 14.0	97.0 ± 14.0	6.9 ± 0.2
	Mg <sup>2+</sup>	131.6 ± 0.7	68.0 ± 1.0	48.4 ± 0.1
	Ca <sup>2+</sup>	399.0 ± 9.0	197.0 ± 5.0	50.7 ± 0.1

#### 4.4.3 Caratterizzazione della biomassa coltivata su DIG-FORSU e DIG-WL

La composizione del mezzo di coltura influenza la composizione della biomassa uscente dal sistema. In particolare, fosforo e azoto rappresentano i nutrienti cardine per l'applicazione del digestato per la coltivazione microalgale, permettendo l'aumento della biomassa, e la loro limitazione comporta un aumento dello *storage* di prodotti secondari ad alto valore aggiunto (i.e. lipidi). Tipicamente la coltivazione microalgale segue parametri precisi, dove vengono settati gli *optimum* di coltivazione quali intensità luminosa, agitazione, velocità di insufflaggio d'aria ed i rapporti tra elementi chimici che permettono l'indirizzamento della produzione in maniera specifica [162]. Tra i parametri di importanza fondamentale per la coltivazione microalgale, il rapporto azoto-fosforo risulta specie-specifico con un *range* che varia da 8:1 a 45:1 [163,164]. Per *C. vulgaris* il rapporto N:P ottimale per ottenere buone concentrazioni di biomassa (3.56 ± 0.15 g l<sup>-1</sup>) risulta 15:1 [164]. In questo studio, *C. vulgaris* acclimatato non subisce un'influenza negativa dalle basse concentrazioni del fosforo, anche al suo esaurimento, infatti si ha produzione di biomassa, rimozione dell'ammonio [165] e l'accumulo di lipidi, che sembrerebbe maggiormente associato a deficit di azoto o presenza di metalli (i.e. ferro) [162]. Il quantitativo di fosforo nel DIG-FORSU e nel DIG-WL diluiti 1:5 risulta di 51.62 mg<sub>P</sub> l<sup>-1</sup> e 16.16 mg<sub>P</sub> l<sup>-1</sup> rispettivamente [6,32,124] e la sua quantificazione ha tenuto conto sia del fosforo fornito dalla frazione liquida del digestato (8% del totale [166]) e quello fornito dal BG11 modificato che rappresenta a diluizione 1:5 l'80% della soluzione. Lo stesso procedimento è stato svolto per la quantificazione di azoto in termini di mg<sub>N</sub> l<sup>-1</sup> volto a identificare il rapporto N:P nelle condizioni

sperimentali. Il calcolo teorico ha identificato un rapporto N:P nelle condizioni sperimentali di 4:1 e 8:1 per il DIG-WL e DIG-FORSU rispettivamente. Dati i differenti rapporti N:P per differenti digestati, si è andati ad investigare la variazione in composizione della biomassa microalgale al termine della sperimentazione in quanto l'azoto risulta il composto che influenza maggiormente l'accumulo di lipidi, mentre il valore del rapporto N:P è principalmente associato alla proliferazione della biomassa microalgale. L'azoto, come il fosforo, è principalmente implicato nei processi metabolici cellulari collegati al trasferimento di energia, attività fotosintetica, segnali di traduzione e respirazione cellulare. Perciò teoricamente, il rapporto N:P identificato per il DIG-WL porterebbe ad una minor produzione di biomassa rispetto al DIG-FORSU, contrariamente si identifica una produzione maggiore di biomassa in presenza di DIG-WL che potrebbe essere associato ad un minor stress da ammonio. All'esaurimento dell'azoto in soluzione si dovrebbe identificare un accumulo di lipidi nella biomassa microalgale. Dato che in presenza di DIG-WL l'ammonio in soluzione è risultato completamente rimosso al quarto giorno di sperimentazione, l'analisi della caratterizzazione della biomassa microalgale al termine del test dovrebbero mostrare valori di lipidi percentuali più alti rispetto alla biomassa ottenuta dalla coltivazione su DIG-FORSU. Le analisi di caratterizzazione della biomassa al termine della coltivazione in batch (Tabella 10) hanno mostrato che per quanto riguarda la percentuale di proteine ed amido totali non vi è differenza nella biomassa ottenuta dai differenti substrati, contrariamente e come supposto precedentemente, l'accumulo di lipidi risulta fortemente differente tra le due biomasse e maggiore in presenza di DIG-WL.

**Tabella 10:** Caratterizzazione della biomassa di *C. vulgaris* acclimatato in presenza di DIG-FORSU e DIG-WL in termini di percentuale totale di proteine, amido e lipidi e caratterizzazione della frazione lipidica (%w/w).

	DIG-FORSU	DIG-WL
Proteine (%)	67.65 ± 5.81	67.59 ± 2.58
Amido (%)	7.35 ± 0.06	9.28 ± 0.71
Lipidi totali (%)	6.15 ± 0.20	28.86 ± 0.05
Acido miristico (C14:0) (% w/w)	1.59 ± 0.33	0.20 ± 0.06
Acido palmitico (C16:0) (% w/w)	45.71 ± 12.40	20.88 ± 6.49
Acido stearico (C18:0) (% w/w)	3.11 ± 1.19	1.40 ± 0.41
Acido palmitoleico (C16:1) (% w/w)	3.89 ± 0.35	1.47 ± 0.38
Acido grasso-C16:2 (% w/w)	3.68 ± 1.78	1.34 ± 0.01
Acido linolenico (C18:3) (% w/w)	0.31 ± 0.15	0.15 ± 0.06
Acido linoleico (C18:2) (% w/w)	17.69 ± 10.02	9.58 ± 0.46
Acido oleico (C18:1) (% w/w)	27.14 ± 2.09	64.99 ± 6.91

L'accumulo elevato di proteine riscontrato in entrambe le biomasse risulta maggiore rispetto al valore tipico di *Chlorella* sp. coltivata in condizioni ottimali di crescita (51-58%) [167], tipicamente l'accumulo di proteine è associato alla fase esponenziale di crescita in quanto appartiene al metabolismo primario e si arresta alla totale rimozione dell'azoto. Per quanto la rimozione totale dell'ammonio è stata identificata per entrambe le condizioni sperimentali, l'accumulo di proteine elevato in entrambe le condizioni sperimentali può essere associato alla spinta attività fotosintetica/fissazione di C e gli alti valori di pH [84].

Per quanto riguarda l'accumulo di amido e lipidi vi è la necessità di effettuare una distinzione per i due *pattern* metabolici. Per entrambi, l'assenza di azoto risulta essenziale, in quanto inibisce la proliferazione cellulare e questa condizione tipicamente comporta un accumulo primario di amido e solo successivamente di lipidi. Lo stoccaggio di lipidi però può surclassare l'accumulo di amido se la disponibilità di fonti carboniose risulta in eccesso rispetto a quelle necessaria per il *pathway* di sintesi dell'amido. Amido e lipidi hanno ruoli ben definiti nella cellula, l'amido rappresenta una fonte di energia primaria a basso costo che a sua volta può essere utilizzato parzialmente per la sintesi dei lipidi. I lipidi invece rappresentano un composto di stoccaggio di energia secondario associato spesso ad una "barriera elettronica" in difesa della produzione eccessiva di specie reattive dell'ossigeno data dall'eccesso di elettroni durante l'attività fotosintetica [168], come identificato da Fernandes et al. [169] che segnalano l'utilizzo di amido e lipidi per

la produzione di biomassa al cambio delle condizioni di coltura. Su queste premesse, la percentuale di amido bassa ed invariata nelle due colture può potenzialmente identificare uno *shift* metabolico, dove l'amido accumulato è stato utilizzato parzialmente come fonte energetica per la crescita della biomassa su ambe le tipologie di digestato. La rimozione totale dell'azoto avvenuta in tempi minori in presenza di DIG-WL rispetto al DIG-FORSU comporta, come identificato dalla caratterizzazione della biomassa, l'accumulo di lipidi maggiore in presenza di DIG-WL, che potrebbe essere associato allo spostamento del *pathway* di sintesi per i lipidi data un'attività fotosintetica maggiore [168].

La percentuale di lipidi totali in *C. vulgaris* coltivata su DIG-WL risulta confrontabile con i dati sperimentali ottenuti da Zhu et al. [170] applicando una diluizione 1:4 su digestato caseario per la coltivazione di *C. vulgaris* ( $32.00 \pm 1.00$  %). Ma i dati bibliografici per lo stoccaggio di lipidi nella biomassa microalgale coltivata su digestato risultano estremamente variabili e non ancora motivati dal punto di vista di *pathway* metabolico [168]. Comunque, dato l'alto valore percentuale ottenuto è stata effettuata la caratterizzazione della frazione lipidica per valutarne il potenziale utilizzo come materia prima per la produzione di biodiesel di terza generazione (Tabella 9).

Per valutare l'applicabilità degli oli estratti da biomassa microalgale come materia prima per la produzione di biodiesel di terza generazione vi è la necessità di conformità alle direttive delle normative europee (EN14214). La normativa EN14214 specifica che la presenza di acido linolenico (C18:3) non può essere superiore del 12 %w/w all'interno dell'olio estratto dalla biomassa, in quanto comporta problemi di ossidazione del carburante finale [171]. Più in generale, per ottenere un biodiesel di alta qualità viene richiesta una bassa percentuale di acido linolenico ed un'abbondanza di acidi grassi alifatici C16 e C18 saturi e mono-saturi (i.e. palmitico ed oleico) per ottenere un'alta stabilità ossidativa durante lo stoccaggio del biodiesel [172,173]. La ricerca bibliografica svolta (Tabella 11) ha sottolineato la tipica abbondanza nell'olio microalgale di C18:3, che comporta una sua inapplicabilità per la produzione di biocarburanti di terza generazione a meno che non venga pretrattato in modo da ridurre la percentuale [172,174].



**Tabella 11:** Confronto produzione di biomassa, ceppi microalgali, mezzi di coltura, lipidi e composizione.

Substrato	Specie microalgale	Coltivazione	Volume del reattore	Biomassa	Lipidi	Acido oleico (%w/w)	Acido linolenico (%w/w)	Ref.
Mezzo Basal Bold in condizione di stress	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Batch	1 l	-	34.85 ± 0.78 %	0.67	12.01	[175]
					32.99 ± 2.77 %	traces	18.69	
Mezzo standard	<i>Chlorella vulgaris</i>	Batch	-	3.00 g l <sup>-1</sup>	5.10 %	12.64	19.05	[176]
	<i>Spirulina maxima</i>			3.10 g l <sup>-1</sup>	4.10 %	5.43	18.32	
	<i>Neochloris oleabundans</i>			2.00 g l <sup>-1</sup>	29.00 %	20.29	17.43	
	<i>Scenedesmus obliquus</i>			2.00 g l <sup>-1</sup>	17.70 %	17.93	3.76	
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>			3.6 g l <sup>-1</sup>	29.00 %	4.87	30.19	
Mezzo BBM	<i>Chlorella</i> sp.	Batch	2 l	0.12 g	27.96 ± 0.77 %	15.68	-	[173]
Mezzo Basal	<i>Chlorella</i> sp.	Batch	1 l	2.00 g l <sup>-1</sup>	45.44 %	11.29 - 24.85	-	[132]
Digestato da rifiuto alimentare	<i>Chlorella</i> PY-ZU1	Batch	0.3 l	4.00 g l <sup>-1</sup>	32.20 %	2.20	16.50	[54]
Digestato da acqua reflua contenente amido ed alcool	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Batch	1 l	1.45 g l <sup>-1</sup>	18.68 ± 1.93 %	2.24 ± 0.31	37.39 ± 1.63	[52]
Acqua reflua di scolo	<i>Chlorella</i> sp.	Batch	0.5 l	0.83 ± 0.00 g l <sup>-1</sup>	17.22 ± 0.00 %	5.98		[77]
	<i>Nannochloropsis</i> sp.							
	<i>Scenedesmus</i> sp.						6.09	
	<i>Chloamydomonas</i> sp.							
	<i>Kirchella</i>							
	<i>Microcoleus</i>						7.32	
	<i>Oscillatoria</i>					7.45		
Digestato da reflui agro- industriali	<i>Parachlorella kessleri</i>	Batch	0.3 l	1.10 g l <sup>-1</sup>	26.60 %	-	-	[177]
	<i>Acutodesmus obliquus</i>				31.10 %			
Digestato da acqua refluo del processamento dell'amido	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Batch	2 l	1.50 - 2.50 g l <sup>-1</sup>	10.50 ± 0.80 % 23.70 ± 1.20 %	14.00 - 17.90	-	[53]
Digestato da FORSU				1.05 ± 0.13 g l <sup>-1</sup>	6.15 ± 0.20 %	27.14 ± 2.09	0.31 ± 0.15	Questo studio
Digestato da feccia di vinificazione bianca	<i>Chlorella vulgaris</i> adatto	Batch	4 l	1.36 ± 0.08 g l <sup>-1</sup>	28.86 ± 0.05 %	64.99 ± 6.91	0.15 ± 0.06	

Osservando i dati ottenuti per la caratterizzazione della frazione lipidica per entrambe le biomasse al termine della sperimentazione (Tabella 10), la concentrazione di acido linolenico risulta conforme alla normativa europea EN14214, con concentrazioni di acido linolenico di  $0.15 \pm 0.06$  % w/w e  $0.31 \pm 0.15$  % w/w nell'olio estratto dalla biomassa coltivata su DIG-WL e DIG-FORSU rispettivamente. L'acido oleico influenza la temperatura di combustione, stabilità ossidativa e viscosità del biodiesel ottenuto e viene richiesta una alta percentuale nell'olio estratto ed i valori ottenuti di concentrazione di acido oleico pongono l'olio estratto dalla biomassa coltivata su DIG-WL come potenziale materia prima per la produzione di biodiesel. L'elevata presenza di acido palmitico garantisce una bassa emissione di NOx, stabilità ossidativa e un alto numero di cetano [140], che risulta inferiore nella biomassa coltivata su DIG-WL rispetto a quella ottenuta dal DIG-FORSU. Le analisi di caratterizzazione e quantificazione della frazione lipidica pongono la biomassa ottenuta dalla coltivazione su DIG-WL come promettente materia prima per la produzione di biodiesel di terza generazione.

L'analisi di caratterizzazione della frazione lipidica ha permesso inoltre di identificare un'ulteriore possibile applicazione nell'olio microalgale: l'abbondanza di acido palmitico e stearico permette il potenziale utilizzo come fonte alternativa e rinnovabile per la produzione di stearina. La stearina tipicamente viene prodotta dal trattamento dell'olio di palma (*Elaeis guineensis*) o dalla paraffina [178–181] e trova applicazione in vari settori, quali industria saponiera, cosmetica e di produzione di candele. Date le caratteristiche dell'olio estratto, questa coltivazione si può porre come un'innovativa applicazione ecosostenibile in alternativa alla produzione di olio di palma. Recenti studi, hanno mostrato l'effetto imponente della deforestazione determinato dalla conversione delle foreste a terreni coltivati per la produzione di olio di palma (circa 270,000 acri di foresta convertiti annualmente dal 2000 al 2011). L'effetto della deforestazione non ha impatto solo dal punto di vista di perdita di biodiversità, con danni irreversibili, ma svolge un ruolo critico nel cambiamento climatico, portando ad una produzione annuale di emissione di gas serra di 2.270 Gt di CO<sub>2</sub> dal 2001 al 2013, cioè il 10% delle emissioni di gas serra di origine antropica. I piani per l'abbassamento e eliminazione della forestazione per pratiche agricole prevedono la riduzione del 50% per il 2020 ed annullamento della pratica entro il 2030 (New York Declaration on Forest, NYDF) [182]. Questo scenario e i dati ottenuti pongono la biomassa microalgale come un'innovativa coltivazione per l'abbattimento di pratiche agricole non più sostenibili e per la produzione di prodotti con richiesta di mercato elevata.

Sulla base dei dati ottenuti, la coltivazione in batch su DIG-WL risulterebbe la più promettente data l'alta concentrazione lipidica e la sua composizione, la valutazione complessiva delle possibili applicazioni date le sue caratteristiche verrà fornita al termine dell'identificazione dei migliori parametri di processo per avere una coltivazione in semi-continuo.

Seppure la coltivazione in batch su DIG-WL abbia mostrato performance migliori rispetto al DIG-FORSU, dalla sperimentazione sono risultate conclusioni estremamente interessanti e di futuro approfondimento. Il ceppo *C. vulgaris* risulta in grado di crescere e trattare varie tipologie di digestato previa acclimatazione, per un trattamento a basse diluizioni, comportando implicitamente le sue potenziali applicabilità nel trattamento

di svariate tipologie di digestato. Il digestato da FORSU, nello specifico, è una tipologia di refluo abbondante negli impianti di trattamento e la valutazione di un trattamento terziario volto a ridurre l'ammonio ed il carico organico presente permetterebbe un potenziale rilascio in ambiente con produzioni di biomassa applicabili per altre produzioni o ricircolata nei sistemi DA.

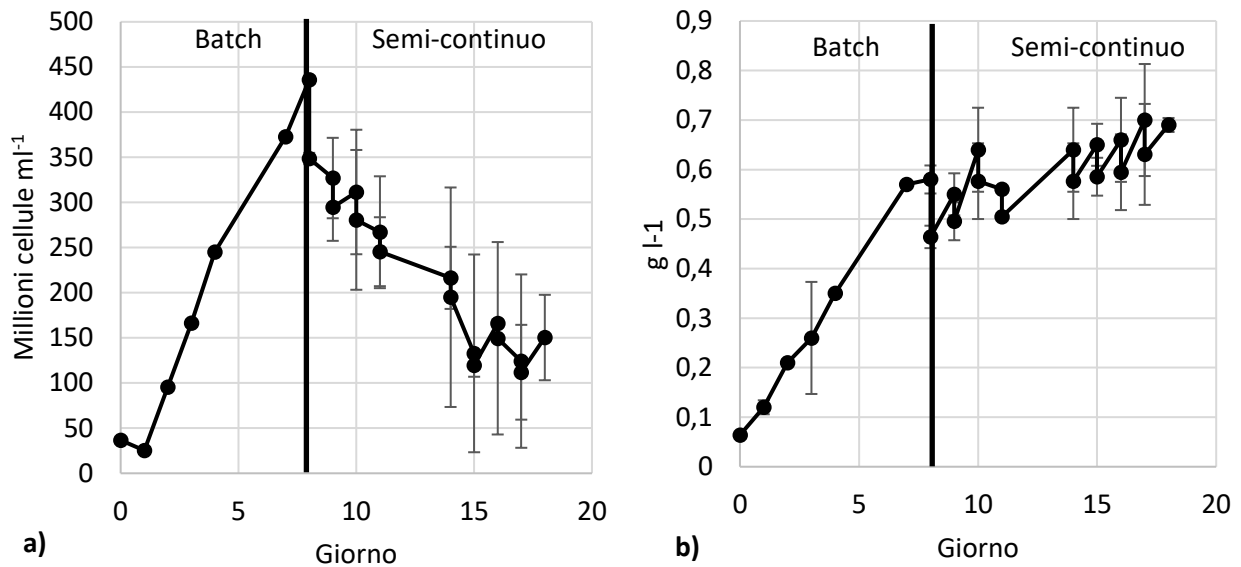
#### 4.5 Coltivazione in semi-continuo

L'applicazione di coltivazioni in semi-continuo per sistemi accoppiati DA-microalghe ha valutato preliminarmente una coltivazione su digestato a due step (batch-semi-continuo) in PBR tubolari da 4 litri. Il test ha svolto il ruolo di prima analisi di capacità di crescita del ceppo *C. vulgaris* acclimatato alla coltivazione su digestato, permettendo le successive sperimentazioni in semi-continuo applicando differenti tipologie di digestato ottenute dal trattamento delle diverse fecce di vinificazione e differenti HRT. L'applicazione di alimentazioni a giorni alterni per i sistemi in semicontinuo è stata valutata in quanto, come riportato da altri autori [55,183–186], si ottiene una biomassa in uscita dal sistema stabile nel tempo, senza dover attuare un ricircolo di biomassa microalgale per evitare il *wash-out* del sistema. L'alimentazione giornaliera ha mostrato spesso la necessità del ricircolo della biomassa, implicando però costi aggiuntivi all'impianto data l'installazione di un sedimentatore per il ricircolo. Le recenti pubblicazioni scientifiche relative alla coltivazione microalgale su reflui, riportano l'applicazione in semi-continuo con alimentazione a giorni alternati o tutti i giorni, con HRT variabili da 1 d a 20 d [55,186].

##### 4.5.1 Coltivazione preliminare a due step

Il primo test svolto per la valutazione dell'applicabilità di un sistema in semi-continuo è stato effettuato applicando una coltivazione a due step. Il primo step ha visto l'applicazione di una coltivazione in batch su DIG-WL ed identificata la stazionarietà della biomassa è stato effettuato uno *shift* ad alimentazione in semi-continuo applicando un tempo di ritenzione idraulica (HRT) di 8 d per un singolo ciclo (secondo step). Il test in batch è stato avviato ponendo il DIG-WL con diluizione 1:5 e dopo 8 giorni di coltivazione è stata applicata la coltivazione in semi-continuo. Questa metodologia di coltivazione a due step viene riportata anche da altri autori, quali Benvenuti [187] e Chaiklahan [188], applicandola per la coltivazione microalgale su digestato o refluo. Alla base dell'applicazione di una coltivazione a due step vi è la possibilità di ottenere la massima concentrazione di biomassa (coltivazione in batch) e successivamente l'applicazione di un sistema semi-continuo, ottenendo un trattamento del substrato (digestato) con il recupero della biomassa microalgale contenente prodotti secondari ad alto valore aggiunto.

I dati ottenuti mostrano una diminuzione della densità cellulare durante la coltivazione in semi-continuo (Figura 17a), contrariamente la biomassa uscente durante il secondo step di coltivazione è risultata stabile in termini di peso secco (Figura 17b).



**Figura 17:** a) densità cellulare e b) peso secco di *C. vulgaris* durante la coltivazione a due step.

Risultati simili, di stabilità in peso secco e decremento della densità cellulare, sono stati riscontrati anche da Ruiz-Marin [189] e Nwoba [190] sia per *C. vulgaris* che per *S. obliquus* applicando una coltivazione a due step. La biomassa uscente dal sistema risultata in linea con i dati ottenuti da Ashokkumar (1.16 g l<sup>-1</sup>) [183] e Ruiz-Martinez (0.46 ± 0.65 g l<sup>-1</sup>) [144]. Dai dati bibliografici e sperimentali, la stabilità in biomassa prodotta e la diminuzione in densità cellulare possono essere spiegati con l'aumento delle dimensioni cellulari come verificato al microscopio ottico (Figura 18), dove lo switch da batch a semi-continuo comporta un incremento della dimensione cellulare probabilmente associato all'accumulo di prodotti secondari ad alto valore aggiunto.

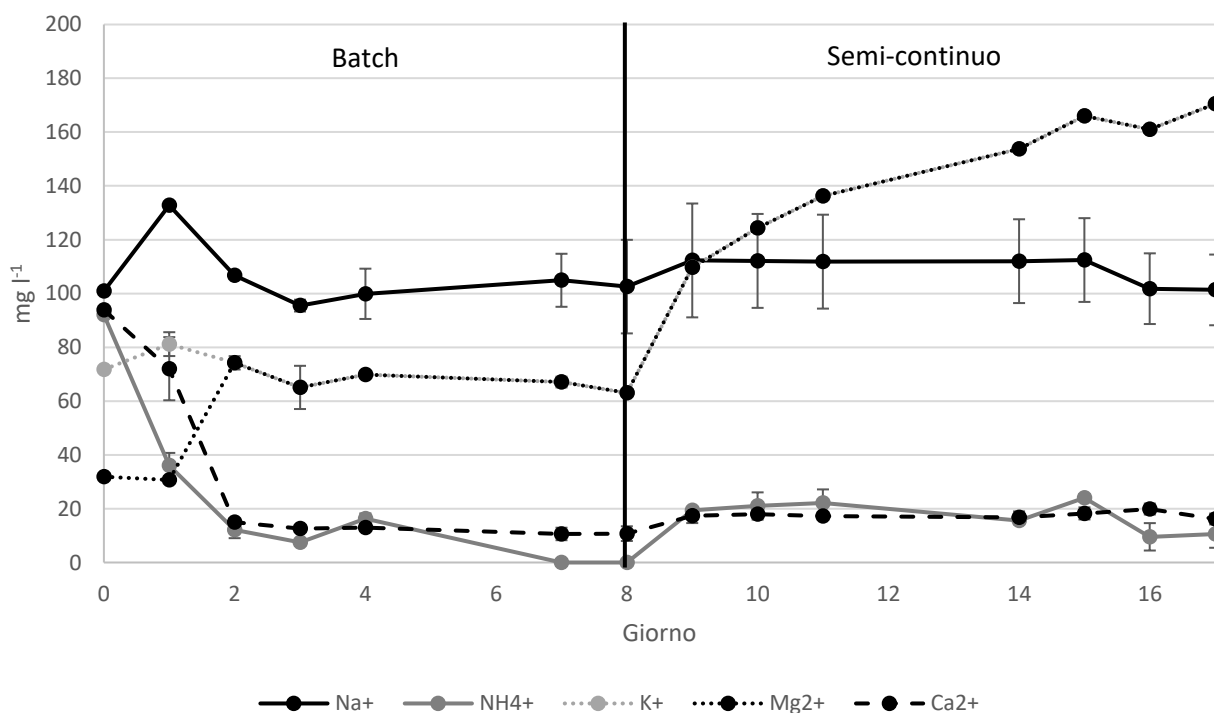


**Figura 18:** Foto al microscopio ottico da banco con micrometro, ingrandimento 40X, al termine del primo ciclo di alimentazione in semi-continuo, identificando un ingrandimento delle cellule di *C. vulgaris* (diametro di 0.15 mm al termine dell'HRT).

Il tasso di crescita durante l'alimentazione in semi-continuo risulta di  $0.09 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ , inferiore rispetto al tasso di crescita durante la coltivazione in batch ( $0.24 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ ) e la produzione di biomassa giornaliera,

sulla base del peso secco, durante l'alimentazione in semicontinuo risulta di  $0.11 \pm 0.07 \text{ g l}^{-1}$  di biomassa. Durante il secondo step di coltivazione, la diminuzione del tasso di crescita, il cambio morfologico cellulare, la diminuzione della densità cellulare a stabilità di peso ottenuto supportano l'ipotesi dell'accumulo di prodotti secondari ad alto valore aggiunto [191]. La quantificazione gravimetrica della frazione lipidica totale durante l'alimentazione in semi-continuo ha mostrato una percentuale stabile di lipidi del  $17.00 \pm 4.00 \%$  nella biomassa uscente dal sistema, valore confrontabile con i dati ottenuti da altri autori ( $20.00 \%$  [192],  $18.90 \pm 0.47 \%$  [193],  $16.00 \%$  [189] e  $16.40 \%$  [194]).

Parametro importante risulta anche la rimozione ionica sull'*output* del PBR durante la sperimentazione a due fasi (Figura 19), dove è stata identificata la non rimozione di sodio e potassio durante la coltivazione in batch, contrariamente durante l'alimentazione in semicontinuo questi ioni vengono giornalmente rimossi.  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  vengono rimossi rispettivamente del  $100.00 \pm 0.00 \%$  e  $88.57 \pm 2.91 \%$  durante la fase batch e il  $\text{Mg}^{2+}$  mostra un aumento nell'effluente, passando da  $31.8 \pm 0.00 \text{ mg l}^{-1}$  a  $63.00 \pm 0.24 \text{ mg l}^{-1}$ . L'alimentazione in semi-continuo mostra una continua rimozione di tutti i cationi in soluzione (rimozione di  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  del  $29.82 \pm 6.24 \%$ ,  $76.37 \pm 8.64 \%$ ,  $19.22 \pm 5.52 \%$ ,  $19.22 \pm 5.52 \%$  e  $78.25 \pm 5.05 \%$  rispettivamente). La rimozione ionica durante la coltivazione in semi-continuo può essere associata al bio-adsorbimento e produzione di composti cellulari quali polisaccaridi, lipidi e proteine, che hanno comportato il cambio morfologico del ceppo durante la coltivazione [195].



**Figura 19:** Output  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  durante la coltivazione a due step batch e semi-continuo con DIG-WL.

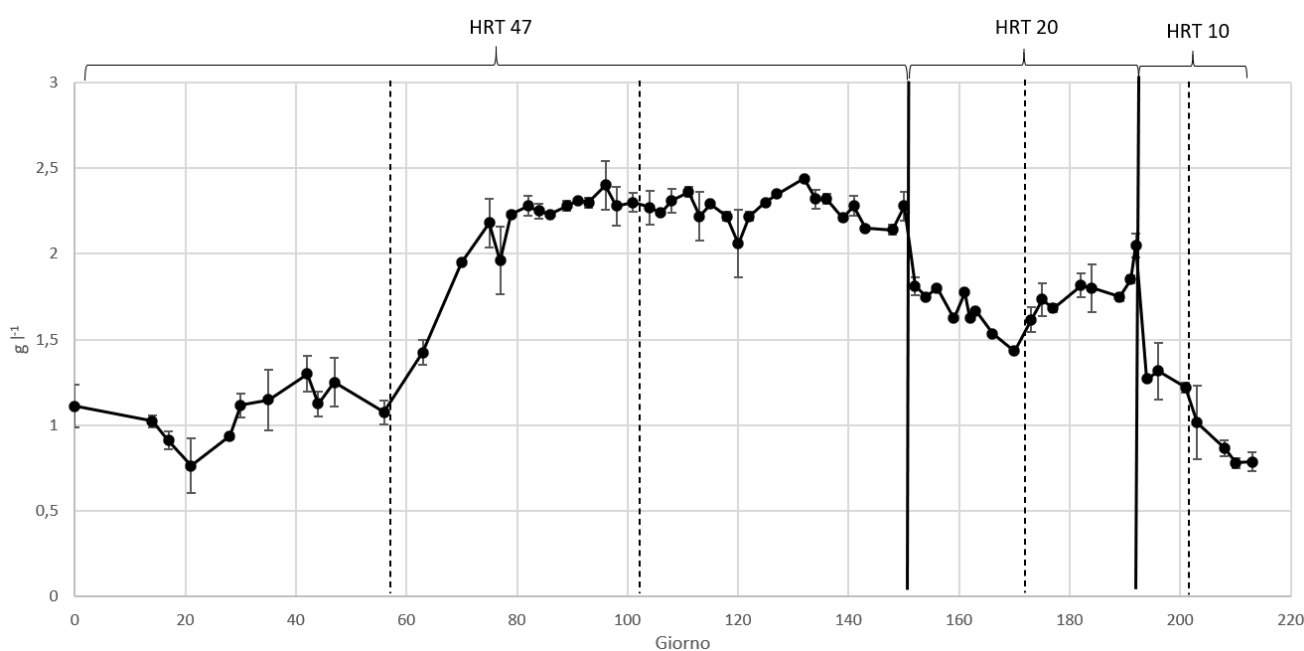
La rimozione costante di sodio può essere associata a stress salino della coltura microalgale, che comporta l'accumulo di lipidi [196]. Per *C. vulgaris*, l'accumulo di  $\text{Na}^+$  intracellulare porta ad una diminuzione dell'attività del sistema antiporta di membrana plasmatica  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  con un diretto effetto di bioaccumulo [161,195]. La costante rimozione di  $\text{Na}^+$  durante l'alimentazione in semi-continuo mostra lo stress salino a cui è sottoposta la coltura, portando ad una diminuzione della rimozione di  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  dal mezzo di crescita [195] (come mostrato in Figura 19). L'assimilazione del magnesio gioca un ruolo fondamentale per le specie microalgali, essendo il costituente essenziale delle clorofille, ed il suo deficit di assimilazione inibisce direttamente della crescita cellulare [160]. La rimozione del potassio è associata anch'essa allo stress salino intracellulare, dato dall'accumulo di  $\text{Na}^+$ , dove tipicamente il sodio (intracellulare) viene scambiato con il potassio (extracellulare) per evitare effetti tossici dati dall'eccesso di sodio [161,195,197]. La rimozione del  $\text{Ca}^{2+}$  segue la tendenza riportata da Talebi et al. [161], dove la rimozione del  $\text{Ca}^{2+}$  segue parallelamente l'assimilazione di  $\text{Na}^+$ , aumentando la risposta di bioaccumulo cellulare mediante la pompa protonica di membrana [195,197]. Il  $\text{Ca}^{2+}$  è essenziale per la proliferazione microalgale, avendo azione sul sistema fotosintetico, integrità della membrana dei tilacoidi, resistenza ai patogeni, tolleranza allo stress salino e azione di segnale di trasduzione [196]. I dati ottenuti per la rimozione del calcio, date le premesse della sua essenzialità ed uso in risposta allo stress salino, possono far supporre che la rimozione costante di calcio sia una risposta allo stress salino intracellulare determinato dall'accumulo di ioni sodio dove se la proliferazione della biomassa decresce, la sintesi lipidica non viene interrotta come identificato dal cambiamento morfologico. Come riportato da Gorain et al. [196], per *C. vulgaris*, il  $\text{Mg}^{2+}$  non deve essere in condizione di limitazione nel mezzo, permettendo così la crescita ed accumulo dei lipidi mentre la limitazione di  $\text{Ca}^{2+}$  porta l'accumulo di lipidi. La rimozione di ammonio identificata durante la coltivazione in batch risulta del 100 %, come riportato da altri autori [198–200], ed è associata ai valori elevati di pH di  $9.20 \pm 0.20$ , costante sia durante la contiazione in batch che in semi-continuo, e strippaggio. Durante la fase in semi-continuo, la rimozione giornaliera dell'ammonio risulta del  $76.37 \pm 8.64$  %, come riportato da Park et al. (76.38 %) [152], dove la scarsità dell'ammonio in soluzione comporta ad un cambio di *pathway* metabolico con l'accumulo di lipidi e carboidrati [192]. Altre sperimentazioni hanno dimostrato che, in assenza di microalghe, valori elevati di pH ed insufflaggio d'aria portano ad una rimozione del 40% dell'ammonio, i valori elevati di pH spostano l'equilibrio dell'ammonio da  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NH}_3$ , lasciando la restante frazione a diretto uso dei ceppi microalgali [152,189].

La sperimentazione ha permesso di identificare le potenzialità della coltivazione in semi-continuo applicando il digestato vinicolo come substrato di crescita, portando un bilanciamento ionico del mezzo di coltura, condizioni di stress associate all'accumulo di prodotti secondari ad alto valore aggiunto, coltivazioni microalgali potenzialmente a lungo termine ed un effetto depurativo del mezzo. Date queste premesse le successive sperimentazioni hanno valutato l'effetto di differenti HRT sulla coltivazione microalgale in semi-continuo nel lungo periodo.

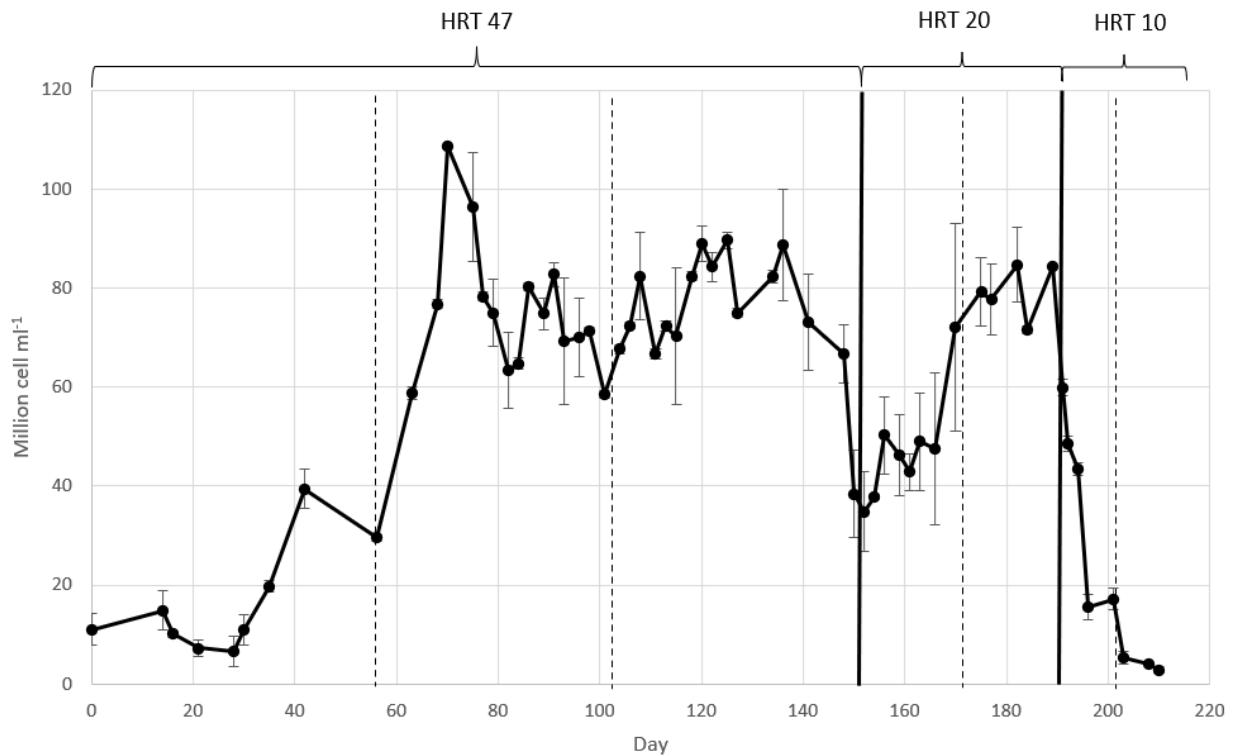
#### 4.5.2 Effetto sulla produzione di biomassa e densità cellulare dei differenti HRT

I test in semi-continuo sono stati svolti fornendo come alimentazione digestato da feccia di vinificazione bianca, rossa e rosa (mix rossa e bianca) negli HRT 47, 20 e 10 giorni rispettivamente per valutare anche la potenziale influenza dell'effluente (i.e. concentrazioni elevate di ammonio e polifenoli) sulla biomassa data la disponibilità variabile legata alle produzioni vinicole.

Il monitoraggio della biomassa microalgale (Figura 20 e Figura 21) per la coltura di *C. vulgaris* acclimatata alla coltivazione su digestato da vinificazione hanno mostrato che l'applicazione di HRT elevati (47 giorni) mostra valori di biomassa e densità cellulari stabili,  $2.20 \pm 0.13 \text{ g l}^{-1}$  e  $76.35 \pm 9.40$  milioni di cellule  $\text{ml}^{-1}$  rispettivamente. Coltivazioni microalgali con HRT così elevati non risultano in altre pubblicazioni data l'inapplicabilità su grandi impianti ed i lunghi tempi per il trattamento del refluo, ma sono risultati necessari data l'emergenza sanitaria SARS-COVID19. I valori di biomassa ottenuti risultano comunque elevati e stabili nel tempo. La coltivazione è stata successivamente modificata applicando HRT di 20 giorni, identificando una diminuzione della biomassa in uscita dal sistema, rispetto all'applicazione di HRT più elevati, ma stabile del tempo con valori di  $1.72 \pm 0.11 \text{ g l}^{-1}$  e  $77.08 \pm 5.42$  milioni di cellule  $\text{ml}^{-1}$  di peso secco e conta cellulare rispettivamente. Data la volontà di ridurre il tempo di ritenzione idraulica per il trattamento del digestato tramite microalghe, l'HRT è stato diminuito ulteriormente a 10 giorni mostrando però la repentina diminuzione della biomassa e densità cellulare uscente dal sistema (*wash out*),  $0.78 \pm 0.05 \text{ g l}^{-1}$  e  $2.88 \pm 0.06$  milioni di cellule  $\text{ml}^{-1}$  rispettivamente. La produttività volumetrica, sulla base di Bellucci et al. [201], per le condizioni sperimentali con HRT 47 giorni e 20 giorni è risultata  $2.10 \text{ g}_{\text{biomassa}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  e  $1.80 \text{ g}_{\text{biomassa}} \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$  rispettivamente.



**Figura 20:** Analisi del peso secco durante le alimentazioni con digestato da feccia di vinificazione in semi-continuo ad HRT di 47, 20 e 10 giorni. La linea tratteggiata indica i vari cicli di HRT.



**Figura 21:** Analisi della densità cellulare in termini di milioni di cellule  $ml^{-1}$  durante l'alimentazione in semi-continuo applicando HRT di 47, 20 e 10 giorni. La linea tratteggiata indica i vari cicli di HRT.

Il tasso di crescita identificato durante le sperimentazioni con HRT 47 giorni e 20 giorni è risultato di  $0.48 \pm 0.10 d^{-1}$  e  $0.07 \pm 0.01 d^{-1}$  rispettivamente per valori di N:P di 1:2 e 16:1 rispettivamente. Il range di N:P per le colture microalgali risulta estremamente variabile, con valori compresi tra 8:1 e 45:1 [202]. Per quanto l'applicazione del DIG-WL con HRT elevati non mostri un rapporto ottimale N:P, l'elevata produzione di biomassa può essere associata al consumo di composti organici forniti dal digestato e maggiore permeabilità della luce data la chiarezza del mezzo, come confermato dal tasso di crescita maggiore durante la stabilità della biomassa prodotta. L'applicazione del DIG-RL influenza parzialmente in maniera negativa la produzione di biomassa, come identificato dal tasso di crescita inferiore, ed è probabilmente associato alla maggior presenza di composti polifenolici e colore più scuro del mezzo. Per l'alimentazione con DIG-RL, il rapporto N:P risulta ottimale per la produzione di prodotti secondari ad alto valore aggiunto (16:1). La variazione del tasso di crescita identificato è però associato non solo alla variazione del rapporto N:P, ma è correlato anche all'illuminazione del PBR e alla tipologia di refluo che viene utilizzato nell'alimentazione. Il DIG-RL rispetto al DIG-WL risulta non trasparente ma con una colorazione tendente al rossastro che limita anch'esso la permeabilità della luce insieme all'alta densità cellulare, in aggiunta, per quanto fornisca i nutrienti per la crescita microalgale, il digestato risulta un mezzo non bilanciato che può inficiare la capacità di crescita del ceppo microalgale comportando tassi di crescita inferiori [203]. Il tasso di crescita ottenuto applicando l'alimentazione con DIG-WL risulta confrontabile con i dati ottenuti dalla sperimentazione in batch e probabilmente è associato alla quasi trasparenza del digestato. L'applicazione del DIG-RL invece ha



comportato un cambio di colorazione del mezzo, con conseguente diminuzione della permeabilità della luce unito all'alta densità cellulare. Seppure i tassi di crescita risultino differenti, la presenza di composti organici permette comunque la proliferazione del ceppo anche se con performance minori ma stabili nel tempo.

#### 4.5.3 Effetto fitodepurativo della coltivazione microalgale

Le coltivazioni in semi-continuo vedono tipicamente l'applicazione di HRT bassi (da 1 a 5 giorni) [204] applicando ricircolo della biomassa microalgale, altri studi dove si applicano sistemi in semi-continuo ad HRT bassi vedono invece l'applicazione di digestato diluito per evitare l'inibizione da elevate concentrazioni di ammonio [185]. Le sperimentazioni effettuate applicando differenti HRT per la coltura in semi-continuo di *C. vulgaris* hanno identificato il wash-out della coltivazione ad HRT 10 giorni senza ricircolo della biomassa. Il declino della biomassa microalgale può essere associato a diversi fattori oltre al dilavamento (*wash out*), per questo motivo è stato ipotizzato un effetto inibitorio associato all'eccesso di ammonio in soluzione. L'analisi cromatografica (Tabella 12) ha mostrato che non vi erano variazioni di ammonio considerevoli in entrata nel PBR per le differenti tipologie di digestato applicate. La rimozione dell'ammonio risulta elevata per gli HRT di 47 giorni e 20 giorni, contrariamente applicando un HRT di 10 giorni si evidenzia una rimozione di circa 40 % associata principalmente allo strippaggio dati gli alti valori di pH ed insufflaggio continuo di aria [205]. Dato il declino cellulare con HRT di 10 giorni, si è ipotizzato un effetto inibitorio associato alla presenza di polifenoli, in particolare per il digestato da feccia rossa e rosa. Anche in questo caso il declino della biomassa non può essere associato alla concentrazione di polifenoli, che risulta inferiore rispetto all'applicazione di digestato da feccia rossa con HRT 20 giorni. Rimane una rimozione di polifenoli percentuale quasi invariata determinata probabilmente da un effetto sinergico di degradazione microbiologica e fotodegradazione (responsabile del 20 - 40 % della rimozione polifenolica [206]) con adsorbimento su particelle solide. Per effettuare una valutazione sull'effetto depurativo del digestato vi è la necessità di porre a confronto anche i dati ottenuti dalla cromatografia anionica del digestato pre- e post-trattamento con microalghe con l'applicazione di differenti HRT (Tabella 12).

**Tabella 12:** Analisi di caratterizzazione dell'effluente uscente dal PBR in termini di concentrazione e rimozione di ammonio, polifenoli, sCOD e cromatografia anionica per DIG-WL, DIG-RL e DIG-PL pre- e post- trattamento microalgale (in e out) con l'applicazione di differenti HRT (47 e 20 giorni) con alimentazione a giorni alterni.

HRT	DIG-WL				DIG-RL			
	47 giorni		20 giorni		20 giorni			
	In	Out	% rimozione	r (g l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	In	out	% rimozione	r (g l <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (g)	0.69 ± 0.31	0.00 ± 0.00	98.96 ± 0.79	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.18	0.01 ± 0.00	95.72 ± 2.10	0.05 ± 0.02
Polifenoli (mg)	Non presi in considerazione date le concentrazioni troppo basse				65.76 ± 1.10	27.00 ± 0.14 ‡	58.94 ± 0.21	0.004
sCOD (gO <sub>2</sub> )	0.27 ± 0.11	0.22 ± 0.05 ‡	0.00	0.00	0.42 ± 0.07	0.42 ± 0.03 ‡	1.75 ± 17.04	0.00 ± 0.00
Cl <sup>-</sup> (mg)	28.52 ± 1.30	33.30 ± 1.98	-	-	1,538.55 ± 1.90	57.76 ± 0.50	96.24 ± 0.03	0.17
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg)	34.91 ± 1.97	52.15 ± 11.19 ‡	-	-	590.60 ± 4.66	221.05 ± 12.44 ‡	62.57 ± 1.81	0.04
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg)	10.58 ± 0.79	4.22 ± 0.52	59.77 ± 8.01	-	243.00 ± 4.66	3.48 ± 0.03	98.56 ± 0.04	0.02
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg)	0.00 ± 0.00	4.30 ± 1.80	-	-	8,312.25 ± 508.90	791.87 ± 26.35 ‡	90.44 ± 0.90	0.87
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg)	266.34 ± 19.31	178.77 ± 6.05 ‡	32.78 ± 2.60	-	161.65 ± 0.21	275.42 ± 6.85 ‡	-	-

Nota: “‡” indica i valori che risultano superiori rispetto ai valori limiti ammessi per lo scarico in acqua superficiale, rete fognaria e suolo sulla base della D. Lgs 152/06 riportata in Tabella 12.

I dati cromatografici associati alla produzione di biomassa hanno permesso la valutazione in resa della biomassa. Seguendo il lavoro di Silva et al. [207] è possibile calcolare la resa in biomassa sulla base del consumo dei nutrienti ( $Y$ ,  $\text{g}_{\text{biomassa}} \text{g}_{\text{nutriente}}^{-1}$ ) applicando l'equazione 6.

$$Y = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (6)$$

Dove  $Y$  è la resa della biomassa per il singolo composto presente in soluzione,  $X_f$  è la concentrazione di biomassa finale,  $X_0$  è la concentrazione di biomassa iniziale,  $S_0$  la concentrazione iniziale del composto e  $S_f$  la concentrazione finale del composto. In questo caso il calcolo è stato svolto solo per le condizioni sperimentali con HRT 47 giorni e 20 giorni in quanto l'applicazione di HRT più bassi porta in wash out il sistema. La valutazione della resa in biomassa è stata svolta per i composti essenziali per la crescita microalgale ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ ) durante il ciclo di alimentazione a giorni alterni.

I dati ottenuti dalla resa della biomassa dipendente dal consumo del singolo nutriente hanno evidenziato un effetto differente sulla resa della biomassa durante l'applicazione dell'HRT 47 giorni e 20 giorni. Durante l'alimentazione con DIG-WL ed HRT 47 giorni i composti che hanno influito sulla resa della biomassa risultano  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , con influenza sulla resa di  $0.12 \text{ g}_{\text{biomassa}} \text{g}_{\text{NH}_4^+}^{-1}$ ,  $15.40 \text{ g}_{\text{biomassa}} \text{g}_{\text{SO}_4^{2-}}^{-1}$  e  $1.11 \text{ g}_{\text{biomassa}} \text{g}_{\text{PO}_4^{3-}}^{-1}$ . L'applicazione dell'HRT 20 con DIG-RL vede invece l'influenza maggiore di  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{NO}_3^-$ ,  $3.87 \text{ g}_{\text{biomassa}} \text{g}_{\text{NH}_4^+}^{-1}$ ,  $4.94 \text{ g}_{\text{biomassa}} \text{g}_{\text{NO}_2^-}^{-1}$ ,  $7.62 \text{ g}_{\text{biomassa}} \text{g}_{\text{SO}_4^{2-}}^{-1}$  e  $0.24 \text{ g}_{\text{biomassa}} \text{g}_{\text{NO}_3^-}^{-1}$  rispettivamente. L'applicazione del DIG-RL con HRT 20 giorni ha evidenziato che, per quanto la biomassa uscente dal sistema fosse inferiore rispetto all'applicazione di DIG-WL con HRT più elevati, il consumo di nutrienti che influisce sulla resa della biomassa risulta molto maggiore, come identificato dalle rimozioni percentuali dei singoli composti. In particolare, il consumo di nitriti e ammonio influenza positivamente le rese di biomassa ottenuta durante l'alimentazione in semi-continuo.

I dati ottenuti delle analisi di caratterizzazione dell'effluente post trattamento microalgale, per tutti i differenti HRT applicati, non risulta in linea con i limiti di legge per il rilascio in acqua superficiali, rete fognaria o suolo. Come riportato dal D. Lgs. 152/06 [208], che riporta i valori limite di emissione in acque superficiali e in fognatura per una serie di composti (Tabella 13). Il D. Lgs. 152/06 tratta in particolare la presenza di azoto e fosforo se rilasciati in aree sensibili, dove il limite diventa rispettivamente di  $10 \text{ mg l}^{-1}$  e  $1 \text{ mg l}^{-1}$ . L'effetto fitodepurativo maggiore è stato ottenuto applicando un HRT di 20 giorni con alimentazione a giorni alterni, ma la caratterizzazione dell'effluente ha mostrato che la sua composizione non risulta ancora in linea con i limiti di legge e necessiterebbe di ulteriori trattamenti post coltura microalgale.

**Tabella 13:** Limiti di legge per lo scarico di reflui in acque superficiali ed in rete fognaria [209].

	Scarico in acque superficiali	Scarico in rete fognaria	Scarico su suolo
pH		5.5 – 9.5	6 – 8
sCOD (mgO <sub>2</sub> l <sup>-1</sup> )	≤ 80	≤ 200	100
P <sub>tot</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	≤ 6	≤ 12	2
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	≤ 15	≤ 30	In termini di azoto totale 15 mg l <sup>-1</sup>
Cl <sup>-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	1200	1200	200
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	1000	1000	500
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	0.6	0.6	In termini di azoto totale 15 mg l <sup>-1</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	20	30	In termini di azoto totale 15 mg l <sup>-1</sup>
Fenoli (mg l <sup>-1</sup> )	≤ 0.5	≤ 10	0.1
Saggio tossicità acuta	Campione non accettabile se dopo 24 h il numero degli organismi immobili è ≥ 50%	Campione non accettabile se dopo 24 h il numero degli organismi immobili è ≥ 80%	Campione non accettabile se dopo 24 h il numero degli organismi immobili è ≥ 50%

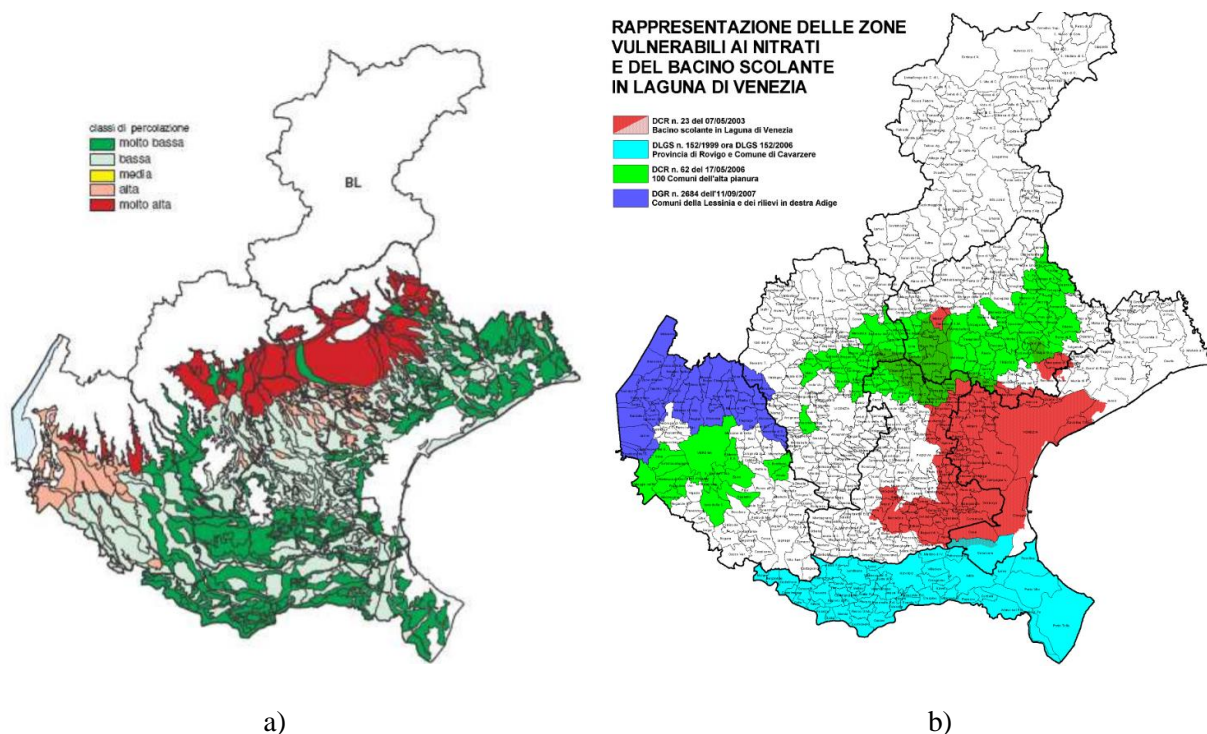
Sulla base dei dati ottenuti, riguardanti la concentrazione di ammonio e sCOD, l'effluente post trattamento microalgale risulta a norma di legge per lo scarico in rete fognaria solo se applicando HRT elevati (47 giorni) utilizzando DIG-WL. Per il trattamento a HRT 10, l'effluente non risulta a norma di legge date le alte concentrazioni di ammonio, come per il trattamento con HRT 20 giorni dove l'effluente presenta una concentrazione elevata di sCOD in uscita dal sistema. Confrontando i valori di rimozione rispetto a Wang et al.[55], che applicano un HRT di 20 giorni per la coltivazione di *Chlorella* su digestato, identificando una rimozione del 50%, l'assenza di rimozione di sCOD da parte di *C. vulgaris* non risulta in linea con i dati bibliografici. Hou et al. [202] identifica nel suo studio con N:P di 16:1 (come nella condizione di HRT 20 giorni) e 8:1 la non rimozione di sCOD da parte di *Chlorella*, dove viene identificata una rimozione dell'sCOD solo applicando almeno un rapporto N:P di 32:1. Un'ipotesi per cui non è stata identificata la rimozione dell'sCOD durante il trattamento con HRT 47 giorni e 20 giorni può essere alla produzione di esopolisaccaridi extracellulari (EPS) come acido uronico, proteine e polisaccaridi, in risposta allo stress colturale determinato dall'alimentazione con digestato non diluito. Le microalghe sono i maggiori produttori di EPS, dove la loro classificazione vede una distinzione in: solubili (*released*), adesi alla parete cellulare e esterni per la formazione di biofilm (*capsular*) [210]. La specie *Chlorella* sp., risulta il maggior produttore di

EPS solubili nel mezzo di crescita,  $478 \text{ mg l}^{-1}$ , rispetto a molteplici specie microalgali quali: *Dunaliella salina*, *Achnanthes brevipes*, *Euglena mutabilis*, *Microcoleus vaginatus*, *Desmococcus olivaceus*, *Nostoc* sp., *Thalassiosira pseudonana*, *Synechocystis* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Chroococcus* sp. Quest'elevata produzione esocellulare di EPS spiegherebbe l'assenza di rimozione dell'sCOD identificata nelle condizioni sperimentali [210,211]. Gli EPS sono sostanze con composizione complessa e variabile in risposta a differenti condizioni sia ambientali che di coltivazione, tipicamente vi è l'abbondanza di esopolisaccaridi ma anche il rilascio di forme proteiche risulta abbondante, per *Chlorella* sp., rappresentando fino al 17 % degli ESP totali prodotti. Nello specifico gli esoenzimi (proteine EPS microalgali con attività enzimatica) hanno azione come fosfatasi, proteasi, chitinasi e  $\beta$ -D-glucosidasi, permettendo la degradazione dei substrati forniti dal mezzo. *Chlorella* sp. risulta produttrice principale di esoenzimi con attività proteasica [210].

I dati sperimentali di trattamento del digestato in semi-continuo con *Chlorella* applicando HRT elevati (47 e 20 giorni) risultano in linea con altri studi, dove si identifica un'elevata rimozione di ammonio (76-98 %) [55,82,212] e fosforo (46-99 %) [82,213] e scarsa rimozione dell'sCOD (60-68 %) [82]. Differenti studi, come Jimenez et al. [213], mostrano che il trattamento con microalghe in semi-continuo del digestato da reflui agricoli porta a buoni valori di rimozioni per fosforo e azoto, come Ledda et al. [82], risultando in linea con le normative di legge per il rilascio in acqua superficiale, rete fognaria o suolo. Una causa di discrepanza con i dati ottenuti sono le diluizioni applicate per il digestato utilizzato per l'alimentazione del sistema in semi-continuo, dove Jimenez et al. [213] applicano un digestato con diluizione 1:50 ottenendo una produzione di biomassa microalgale di  $0.57 - 0.77 \text{ g l}^{-1}$  e Ledda et al. [82] diluiscono il digestato per ottenere concentrazioni di ammonio di  $80 \text{ mg l}^{-1}$  in entrata al sistema con una produzione di biomassa microalgale di  $0.32 - 0.44 \text{ g l}^{-1}$ . In altri studi, Mezzanotte et al. [185] e Wang et al. [55] applicando in semi-continuo acque reflue da porcile e digestato da reflui caseari, ottengono valori di biomassa microalgale elevati ( $2.4 - 2.7 \text{ g l}^{-1}$  e  $1.3 \text{ g l}^{-1}$  rispettivamente), in linea con i dati sperimentali ottenuti nelle sperimentazioni con digestato vinicolo con HRT elevati, e rimozione di ammonio e fosforo dell'82.5-85% e 74-74.5% rispettivamente. Kumar et al. [214] hanno ottenuto concentrazioni di biomassa e nitrati in uscita dal sistema in semi-continuo molto inferiori rispetto a quelli ottenuti nella sperimentazione con digestato vinicolo,  $0.73 \text{ g l}^{-1}$  e  $2.80 \text{ mgNO}_3^- \text{ l}^{-1}$  rispettivamente. Le discrepanze nelle rimozioni e le differenti produzioni di biomassa microalgale rispetto ai dati bibliografici possono essere associate a vari fattori, quali il diverso substrato utilizzato nelle coltivazioni in semi-continuo e l'applicazione di diluizioni del digestato per l'uso come *feed* del sistema, contrariamente alla sperimentazione effettuata dove il digestato non ha subito diluizioni. Queste variazioni dei dati sottolineano che vi è ancora la necessità di ottimizzazione del processo di coltivazione e standardizzazione per il trattamento del digestato.

L'applicazione delle diverse tipologie di digestato non ha mostrato variazioni importanti sulla produzione di biomassa microalgale per HRT di 20 e 47 giorni, ma dal punto di vista legislativo bisognerebbe effettuare ulteriori trattamenti per avere uno scarico a norma di legge. Lo studio svolto era volto all'identificazione di un'applicazione di un trattamento congiunto di sistemi DA e microalghe con possibilità di utilizzo in Veneto,

essendo la regione con maggior produzione vinicola della penisola italiana. Dal Piano di Tutela delle Acque (DCR n. 107/2009 e ss.mm.ii), le zone vulnerabili in Veneto coprono una superficie di circa 800,000 ettari suddivisi in: 643,00 ettari in pianura (62% della pianura veneta), 94,000 ettari in collina e 63,00 ettari in montagna. Nello specifico sono interessate la provincia di Rovigo e comune di Cavarzere, bacino scolante della laguna di Venezia (Piano Direttore 2000 per il risanamento della laguna di Venezia), zone di alta pianura-zona ricarica degli acquiferi (Verona, Padova, Vicenza e Treviso), l'intero territorio dei comuni di Lessinia, rilievi in destra Adige e comuni della provincia di Verona afferenti al bacino del Po. Come riportato in Figura 22, la problematica per il rilascio ambientale è associata a quelle zone del territorio veneto che hanno "bassa capacità portante" e quindi permettono il percolamento nelle acque di profondità causando rischio ambientale. I dati ottenuti per l'effluente DA post-trattamento microalgale portano a concludere che l'effluente non risulta a norma di legge per gli scarichi sia su rete fognaria, acque superficiali e suolo in Veneto e necessitano di ulteriori trattamenti o applicazioni alternative.



**Figura 22:** a) Carta del rischio di percolazione di azoto nei suoli della pianura veneta e b) zone vulnerabili ai nitrati nel bacino scolante in laguna di Venezia (ARPAV Veneto).

#### 4.5.3.1 Caratterizzazione biomassa uscente del sistema in semi-continuo

La caratterizzazione della biomassa è stata effettuata per tutti gli HRT applicati, anche se il sistema è andato in wash out applicando HRT di 10 giorni (Tabella 14). Sono stati identificati variazioni in composizione della biomassa di *C. vulgaris*, durante l'applicazione di HRT elevati, con elevate percentuali di lipidi e proteine. Questa variazione può essere associata al cambio del rapporto N:P. I rapporti N:P per le varie

tipologie di digestato risultano differenti, associati alla differente feccia alimentata nel sistema. I valori del rapporto N:P risultano di 1:2, 16:1 e 2:1 per le condizioni in presenza di DIG-WL, DIG-RL e DIG-PL, rispettivamente, durante la coltivazione in semi-continuo. La condizione sperimentale con DIG-RL e rapporto N:P 16:1 mostra i valori migliori in composizione della biomassa, come riportato da Hou et al. [202] questa condizione di rapporto N:P risulta la più favorevole dal punto di vista dello stoccaggio di prodotti secondari ad alto valore aggiunto in quanto l'abbondanza di azoto permette di ottenere un'alta percentuale proteica e la limitazione di P, associata alla limitazione successiva di N comporta l'accumulo maggiore di lipidi.

Perciò, anche se il sistema accoppiato DA-microalghe non risulta in grado di depurare completamente l'effluente per essere in linea con i limiti di legge imposti per gli scarichi, la biomassa ottenuta mostra valori promettenti per applicazioni prelate all'uso come materia prima per la produzione di prodotti secondari ad alto valore aggiunto.

**Tabella 14:** Caratterizzazione della biomassa microalgale di *C. vulgaris* coltivata su digestato vinicolo da feccia di vinificazione rossa, rosa e bianca con differenti HRT (47 e 20 giorni) con alimentazione a giorni alterni.

	DIG-WL	DIG-RL
HRT	47 giorni	20 giorni
pH	8.76 ± 0.34	7.83 ± 0.73
Peso secco (g l <sup>-1</sup> )	2.28 ± 0.08	1.85 ± 0.02
Densità cellulare (milioni di cellule ml <sup>-1</sup> )	66.75 ± 8.69	84.30 ± 1.69
Lipidi (%)	20.00 ± 1.58 *	33.48 ± 7.54
Amido (%)	6.40 ± 0.60	5.22 ± 1.08
Proteine (%)	44.39 ± 5.80	57.85 ± 10.14
Ch a (mg g <sub>biomassa</sub> <sup>-1</sup> )	3.80 ± 0.56	4.99 ± 0.52
Ch b (mg g <sub>biomassa</sub> <sup>-1</sup> )	1.19 ± 0.16	1.45 ± 0.10
Carotenoidi tot (mg g <sub>biomassa</sub> <sup>-1</sup> )	1.69 ± 0.42	1.71 ± 0.24

Nota: “\*” differenza significativa applicando il T-test per  $p < 0.05$  nel confronto della frazione lipidica rispetto alla sperimentazione in batch con DIG-WL con diluizione 1:5.

Ponendo a confronto l'accumulo di lipidi totali ed applicando il T-test, l'applicazione di HRT 47 giorni porta ad un accumulo di lipidi differente in modo significativo ( $p < 0.05$ ) rispetto al test in batch, contrariamente all'applicazione di HRT 20 giorni dove la differenza non risulta significativa. La condizione in batch permette di ottenere il valore massimo di lipidi stoccabili nella biomassa microalgale; perciò, i valori medi di lipidi ottenuti dalle coltivazioni in semi-continuo sono stati confrontati mediante T-test, ponendo come ipotesi zero che le medie siano uguali e quindi che si è raggiunto il massimo di lipidi ottenibile dalla

coltivazione su refluo vinicolo. L'applicazione di HRT di 20 giorni comporta un accumulo massimo di lipidi ottenibile se la coltivazione fosse in modalità batch. Se si confrontano i dati ottenuti con i valori bibliografici si nota una variabilità delle percentuali in composizione, legata a vari fattori quali ceppo microalgale utilizzato, parametri di processo applicati per il sistema in semi-continuo (HRT) e tipologia di refluo/digestato utilizzato per l'alimentazione. Per riportare degli esempi di questa variabilità, Chaiklahan et al. [188] identificano in *Spirulina platensis* BP, applicando un'alimentazione a giorni alterni con digestato da porcile, una composizione di 57 % proteine e 4.18 % di lipidi; Boonma et al. [215] identifica una produzione del  $9.88 \pm 1.78$  % di lipidi utilizzando un consorzio microalghe-batteri con alimentazione alternata attendendo la stazionarietà della biomassa e sostituendo il 90% della coltura con nuovo mezzo sintetico; Yang et al [216] applica una coltivazione in semicontinuo di *C. vulgaris* con reflui municipali con alimentazione ogni 2/3 giorni sostituendo il 50 % del mezzo di crescita con il refluo, ottenendo una produzione di lipidi del 19.7 %; Kong et al. [217] applicando una coltivazione in semicontinuo di *Scenedesmus* sp. R-16 con rinnovo del mezzo di crescita ogni 2 giorni con digestato, ottenendo il 42 % di lipidi nella biomassa microalgale; Álvarez et al. [218] applicando una coltivazione in semicontinuo su digestato ottiene una composizione della biomassa di *Spirulina* sp. del 2.5 % di proteine con alimentazione a giorni alterni; Ashokkumar et al. [183] applicando un'alimentazione in semi-continuo con rinnovo del mezzo ogni tre giorni del 40 % sul totale nella coltivazione di *Microcystis aeruginosa* usando BG11, identifica uno stoccaggio del 24 % di lipidi nella biomassa; Cai et al. [219] applicano un'alimentazione in semicontinuo alimentando con un intervallo di due giorni con digestato (HRT 4 giorni) per la coltivazione di *Nannochloropsis salina* ottengono una percentuale di lipidi del 24.9 %; Feng et al. [192] alimentando con refluo artificiale *C. vulgaris*, ottengono una composizione della biomassa del 42 % di lipidi sostituendo  $\frac{3}{4}$  del mezzo ogni 4 giorni e Lee et al. [220] applicando una coltivazione in semi-continuo con *Botryococcus braunii* su digestato da letame con un HRT di 4 giorni mostra percentuali di carboidrati e proteine del 12 % e dell'80 % rispettivamente.

La difficoltà riscontrata nel confronto bibliografico rispetto ai dati ottenuti risulta legata fortemente alla variabilità delle ricerche, ceppi microalgali utilizzati e digestato/refluo applicato nell'alimentazione del sistema ed i diversi parametri di processo. Lo studio svolto risulta il primo completo sia dal punto di vista di caratterizzazione della biomassa uscente dal sistema che di trattamento dell'effluente, identificando che l'applicazione di un HRT di 20 giorni porta al miglior effetto fitodepurativo del digestato vinicolo ed una biomassa stabile con un'elevata percentuale di lipidi.

#### 4.5.3.2 Frazione lipidica: caratterizzazione e valutazione per la produzione di biocarburanti

Data l'abbondanza di lipidi nella biomassa al termine dell'alimentazione in semi-continuo, la caratterizzazione dell'olio estratto (Tabella 15) ha evidenziato la bassa concentrazione di acido linolenico, indetificata anche durante la sperimentazione in batch, contrariamente alla sua tipica abbondanza nell'olio microalgale che ne limita le applicazioni per la produzione di biodiesel [174,221]. La bassa concentrazione



di acido linolenico identificata risulta tra le prime per la coltivazione in batch e semi-continuo in *C. vulgaris* coltivata su digestato, dove tipicamente risulta superiore al 12 %w/w, come riportato da Fernández-Linares et al. (19.19 %w/w) [222], Cheng et al. (16.50 %w/w) [54] e Tan e t al. (24.31 %w/w) [53].

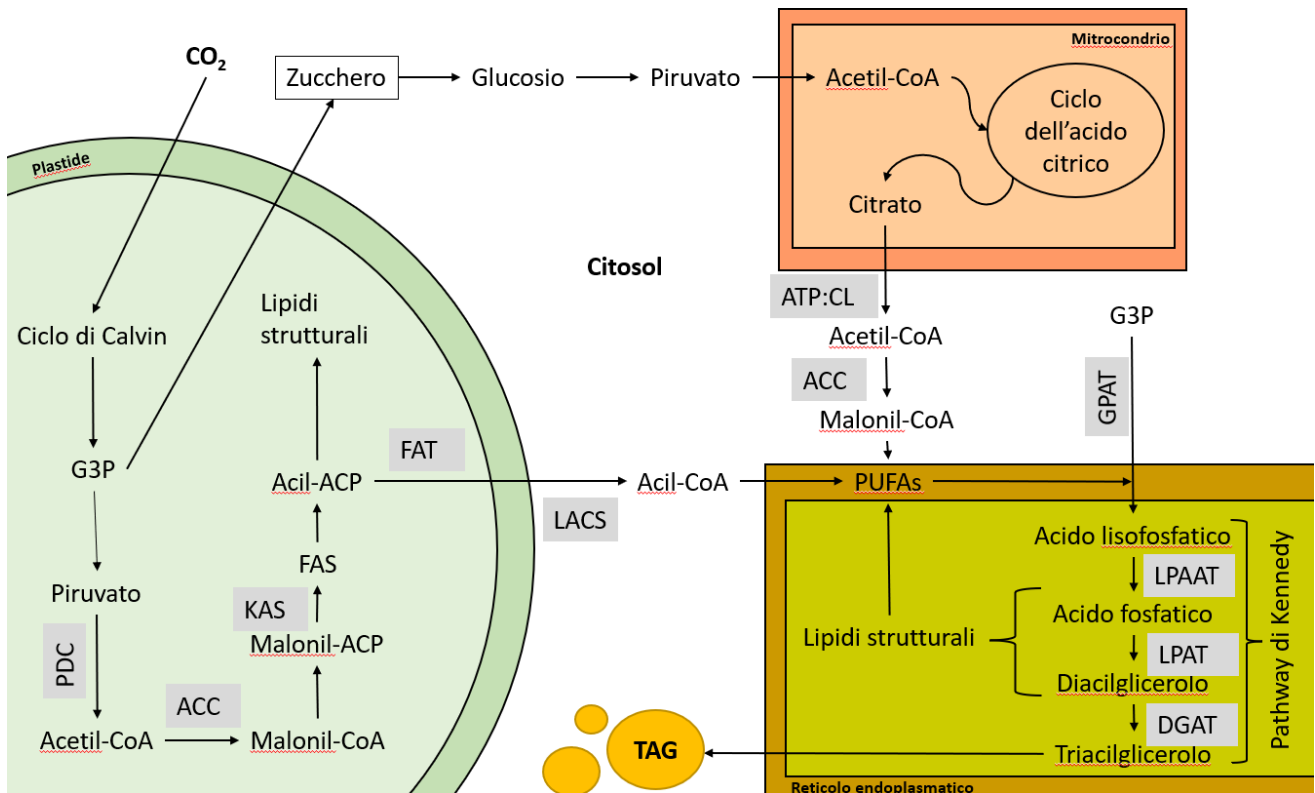
**Tabella 15:** Caratterizzazione della frazione lipidica durante l'alimentazione in semi-continuo e confronto bibliografico.

HRT	DIG-WL 47 giorni	DIG-RL 20 giorni	Fernández-Linares et al. [222]	Cheng et al. [54]	Tan et al. [53]
A. miristico C14:0 (% w/w)	0.87 ± 0.24 *	2.29 ± 0.77 *	2.11	n.d.	3.34
A. palmitico C16:0 (% w/w)	27.89 ± 3.41	39.20 ± 1.97 *	26.03	27.96	10.71
A. stearico C18:0 (% w/w)	2.75 ± 0.73	23.61 ± 8.30 *	8.71	14.53	4.33
A. palmitoleico C16:1 (% w/w)	4.48 ± 0.83 *	0.93 ± 0.22	15.56	0.83	12.39
A. oleico C18:1 (% w/w)	7.83 ± 1.19 *	11.58 ± 5.93 *	8.05	2.20	6.98
C16:2 (% w/w)	3.28 ± 0.86 *	3.32 ± 3.35	n.d.	n.d.	4.02
A. linoleico C18:2 (% w/w)	52.35 ± 4.43 *	15.96 ± 13.19	4.33	19.16	19.71
A. linolenico α-18:3 (% w/w)	0.53 ± 0.29	0.5 ± 0.70	19.19	16.50	24.31

Nota: “\*” differenza significativa applicando il T test per  $p < 0.05$  nel confronto della composizione della frazione lipidica rispetto alla sperimentazione in batch con DIG-WL con diluizione 1:5 ponendo come ipotesi zero che le medie siano uguali. “n.d.” non determinato.

Il cambio di digestato applicato durante le alimentazioni ed i differenti HRT applicati non sembrano influenzare la concentrazione di acido linolenico che risulta in linea con le direttive EN14214 ed EN14213, che impongono come concentrazione massima di acido linolenico il 12 %w/w [221]. Le basse concentrazioni di acido linolenico e l'abbondanza di acido palmitico e stearico pongono l'olio estratto da *C. vulgaris* coltivata su digestato vinicolo come substrato idoneo per la produzione di biodiesel senza necessità di pretrattamenti, inoltre data l'alta percentuale di acido stearico può trovare applicazione anche nella produzione di stearina alternativa. Vi sono delle differenze in composizione della frazione lipidica rispetto alla coltivazione in batch su DIG-WL (Tabella 10), soprattutto per quanto riguarda la percentuale di acido oleico che risulta molto inferiore. La differenza può essere associata alla metodologia di coltivazione applicata, dove la coltivazione in batch comporta un deficit di azoto che influenza lo stoccaggio e composizione della frazione lipidica, contrariamente all'alimentazione in semi-continuo che apporta nuovo substrato di crescita. Le diverse percentuali di acidi grassi possono essere correlate a molteplici fattori che intervengono sul *pathway* di sintesi dei lipidi. Nelle cellule eucariote la sintesi degli acidi grassi parte dalla conversione della CO<sub>2</sub>, tramite la fotosintesi, in gliceraldeide-3-fosfato (G3P). Il G3P viene convertito in piruvato e successivamente in acetil-CoA tramite il complesso della piruvato deidrogenasi (PDC) [223]. Da questo punto la sintesi dei lipidi può seguire diversi *pathway* metabolici: il *pathway* di Kennedy acil-CoA-dipendente ed il *pathway* dell'acil-CoA-indipendente mediato da fosfolipid-DAG aciltransferasi (PDATs). Il *pathway* di Kennedy (Figura 23) per la produzione dei lipidi vede l'azione di tre consequenziali acilazioni del G3P tramite enzimi, di cui l'ultimo è il diacilglicerolo aciltransferasi (DGAT) che catalizza l'acilazione del diacilglicerolo (DAG) con l'acil-CoA. Il *pathway* acil-CoA-indipendente vede l'azione del PDATs per il trasferimento della frazione acil- da un fosfolipide al DAG per la formazione dei lipidi nel cloroplasto e contribuisce maggiormente all'accumulo dei lipidi in condizioni di stress [224]. Come riportato da Fan et al. [225] e Bellou et al. [223], l'attivazione genica per la sintesi dei lipidi nelle microalghe è un processo complesso ed ancora poco approfondito che subisce modificazioni in risposta a stress nutrizionale e limitazione luminosa. Dal punto di vista genetico, la deprivazione di azoto comporta un aumento dell'accumulo di lipidi associato alla diminuzione della trascrizione del gene *pec2* e aumento dell'attività di catalisi dell'Acetil-CoA carbossilasi (ACCasi), enzima chiave del *pathway* di biosintesi dei lipidi che permette la formazione del molonil-CoA dall'acetil-CoA, associato ad un aumento della trascrizione dei geni *accA*, *accD* e *bccP*. Un ulteriore effetto della carenza di azoto è l'induzione dell'espressione del gene *dgat* associato alla sintesi del DGAT che risulta attivo durante la fase stazionaria ed è correlato all'iperaccumulo di lipidi. L'enzima malico (ME) fornisce il NADPH per la biosintesi dei lipidi, dove la sua sovraespressione aumenta l'accumulo di lipidi. Per quanto complesso e di difficile studio, la comprensione dell'attivazione genica per la sintesi lipidica risulta essenziale per risolvere l'applicazione su scala industriale delle microalghe per la produzione di biocarburanti e comprendere le variazioni percentuali della frazione lipidica. L'applicazione di metodologie specifiche di coltivazione e l'applicazione dell'ingegneria genetica-metabolica al fine di ottimizzare il processo produttivo, volto all'ottenimento di alte percentuali lipidiche e

crescita rapida del ceppo microalgale, abbasserebbe i costi di processo in quanto si potrebbe lavorare nell'indirizzamento del flusso metabolico specifico per gli acidi grassi di interesse [223,225].



**Figura 23:** Schema della sintesi dei lipidi nelle microalghe, modificato da Bellou et al. [223]. ACC: acetil-CoA carbossilasi; GPAT: glicerolo-3-fosfato aciltransferasi; G3P: glicerato-3-fosfato; ACP: proteina carrier acil-; LACS: sintetasi acil-CoA a lunga catena; KAS: 3-chetoacil-ACP sintetasi; ATP:CL: citrato liasi ATP-dipendente; CoA: coenzima A; LPAAT: aciltransferasi dell'acido liso-fosfatidico; DGAT: diacilglicerol aciltransferasi; LPAT: aciltransferasi lido-fosfatidicolina; FAS: sintetasi acidi grassi; PDB: complesso della piruvato deidrogenasi; FAT: tioesterasi acidi acil-ACP; TAG: triacilglicerolo; G3P: glicerato-3-fosfato.

Data la necessità di valutare l'olio estratto per l'applicazione come materia prima per la produzione di biodiesel, sono stati calcolati i valori di numero di cetano (CN), viscosità, potere calorifero e densità in base alla composizione chimica, permettendo così di comprendere in maniera preliminare se il biodiesel ottenibile da questa coltivazione possa rientrare nei parametri legislativi EN14214.

CN misura la qualità di accensione di un carburante diesel in un motore ad accensione spontanea e dipende solo dalla composizione chimica del composto [226]. La sua misurazione vede l'applicazione del test ASTM D613, che non è stato possibile effettuare, per questo motivo CN è stato calcolato in via teorica applicando l'equazione 7 sulla base dello studio di Giakoumis et al. [227].

$$CN = 55.87 + 0.098 * M + 0.164 * P + 0.176 * S - 0.050 * Pl + 0.001 * O - 0.140 * L - 0.273 * Li \quad (7)$$

Dove  $M$  rappresenta la percentuale di acido miristico,  $P$  la percentuale di acido palmitico,  $S$  la percentuale di acido stearico,  $Pl$  la percentuale di acido palmitoleico,  $O$  la percentuale di acido oleico,  $L$  la percentuale di acido linoleico e  $Li$  la percentuale di acido linolenico.

La densità ( $\rho$ ) influenza l'applicabilità nei motori, in quanto l'olio di origine vegetale ha una densità maggiore rispetto al diesel da fonti fossili e la sua iniezione nel motore porta un maggior quantitativo di carburante iniettato ed influenza i rapporti aria-carburante nel motore variando così le prestazioni e le emissioni. Il limite europeo (EN 14214) impone il valore di densità compreso tra  $860 \text{ kg m}^{-3}$  –  $900 \text{ kg m}^{-3}$ . La densità è stata calcolata sulla base chimica degli acidi grassi seguendo l'equazione 8 [227].

$$\rho = 923 - 0.99 * M - 0.54 * P - 0.62 * S - 0.70 * Pl - 0.44 * O - 0.37 * L - 0.24 * Li \quad (8)$$

Dove  $M$  rappresenta la percentuale di acido miristico,  $P$  la percentuale di acido palmitico,  $S$  la percentuale di acido stearico,  $Pl$  la percentuale di acido palmitoleico,  $O$  la percentuale di acido oleico,  $L$  la percentuale di acido linoleico e  $Li$  la percentuale di acido linolenico.

La viscosità ( $\delta$ ) in un carburante influenza la velocità di iniezione nel motore, dove più è bassa più veloci e rapide sono la combustione ed iniezione, riducendo i tempi di accensione. Se vi è la presenza di pompe meccaniche, una maggiore viscosità porta ad una minor perdita di carburante, con necessità di maggiori pressioni per l'iniezione e maggior quantitativo di carburante iniettato [228]. Il calcolo teorico della viscosità ha seguito il calcolo riportato nell'equazione 9. Come sottolineato da Giakoumis et al. [227] questa metodologia di calcolo per la viscosità risulta però poco affidabile in quanto comporta un errore di circa il 10 % rispetto al valore reale sperimentale.

$$\delta = 5.3380 - 0.04417 * M - 0.000731 * P + 0.009571 * S - 0.00102 * Pl - 0.00578 * O - 0.01179 * L - 0.01726 * Li \quad (9)$$

Dove  $M$  rappresenta la percentuale di acido miristico,  $P$  la percentuale di acido palmitico,  $S$  la percentuale di acido stearico,  $Pl$  la percentuale di acido palmitoleico,  $O$  la percentuale di acido oleico,  $L$  la percentuale di acido linoleico e  $Li$  la percentuale di acido linolenico.

L'ultima valutazione ha riguardato il potere calorifero massimo (HHV) e minimo (LHV) (Equazione 10 e 11) che differenziano sul calore di vaporizzazione dell'acqua. Rispetto al carburante di origine fossile, il biodiesel mostra bassi valori di potere calorifero associato alla presenza nei metilesteri con il 10 -12 % in peso di ossigeno. Ciò comporta che avendo valori bassi di potere calorifero vi è la necessità di un maggior quantitativo di carburante da iniettare. Per questo parametro non vi sono direttive specifiche per la normativa europea.

$$HHV = 39,839.54 + 24.96 * M + 14.03 * P + 1.71 * S - 52.32 * Pl + 1.51 * O + 2.78 * L + 8.27 * Li \quad (10)$$

$$LHV = 37,667.45 + 96.79 * M - 3.07 * P - 37.64 * S + 25.82 * Pl - 2.76 * O + 9.46 * L + 3.86 * Li \quad (11)$$

Dove  $M$  rappresenta la percentuale di acido miristico,  $P$  la percentuale di acido palmitico,  $S$  la percentuale di acido stearico,  $Pl$  la percentuale di acido palmitoleico,  $O$  la percentuale di acido oleico,  $L$  la percentuale di acido linoleico e  $Li$  la percentuale di acido linolenico.

Come riportato in Tabella 16, i valori teorici di CN,  $\rho$ ,  $\delta$ , HHV e LHV risultano confrontabili con quelli ottenuti di Giakoumis et al. [227] ed in linea con la direttiva europea EN14214. Per quanto riguarda CN, il valore ottenuto risulta coerente con la direttiva che impone il valore minimo di 51. Il valore di CN ottenuto dall'olio estratto dalla biomassa coltivata in semi-continuo risulta nella media per il biodiesel (45 - 67), tipicamente maggiore rispetto al diesel di origine fossile (40 - 49) [227]. La densità rientra nei limiti europei imposti ma la viscosità ottenuta risulta maggiore rispetto al limite europeo ( $3.5 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1} - 5.0 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) per l'olio ottenuto con la coltivazione in semi-continuo applicando HRT di 20 giorni e 10 giorni.

**Tabella 16:** Valori teorici per l'applicazione dell'olio microalgale per la produzione di biodiesel in termini di CN,  $\rho$ ,  $\delta$ , HHV e LHV.

HRT	DIG-WL 48 giorni	DIG-RL 20 giorni	Valori medi sulla base di Giakoumis et al. [227]
CN	53.32	64.27	54.90
Densità ( $\rho$ , $\text{kg m}^{-3}$ )	879.29	873.15	880.24
Viscosità ( $\delta$ , $\text{mm}^2 \text{ s}^{-1}$ )	4.67	5.22	4.18
HHV ( $\text{kJ kg}^{-1}$ )	40,184.60	40,504.38	40,136.74
LHV ( $\text{kJ kg}^{-1}$ )	38,153.86	37,025.04	37,649.09

In conclusione, la coltivazione in semi-continuo con HRT applicato di 20 giorni porta ad una produzione di olio confrontabile con quella ottenuta nel test in batch con DIG-WL. L'applicazione di una coltivazione in semi-continuo porta una coltivazione stabile nel tempo, con produzione stabile di olio applicabile per la produzione di biodiesel e le migliori performance di trattamento dell'effluente. Il calcolo teorico dei parametri per valutare la qualità del biodiesel ottenibile dall'olio estratto indica che l'unico parametro non in linea con il EN14214 è la viscosità, anche se la metodologia di calcolo risulta con un'incertezza troppo elevata, ma composizione, CN, densità, HHV e LHV pongono l'olio estratto come potenziale fonte di biodiesel di qualità.

#### 4.5.4 Considerazioni generali dell'applicazione del sistema accoppiato DA-microalghe in un impianto di trattamento delle acque reflue di cantina

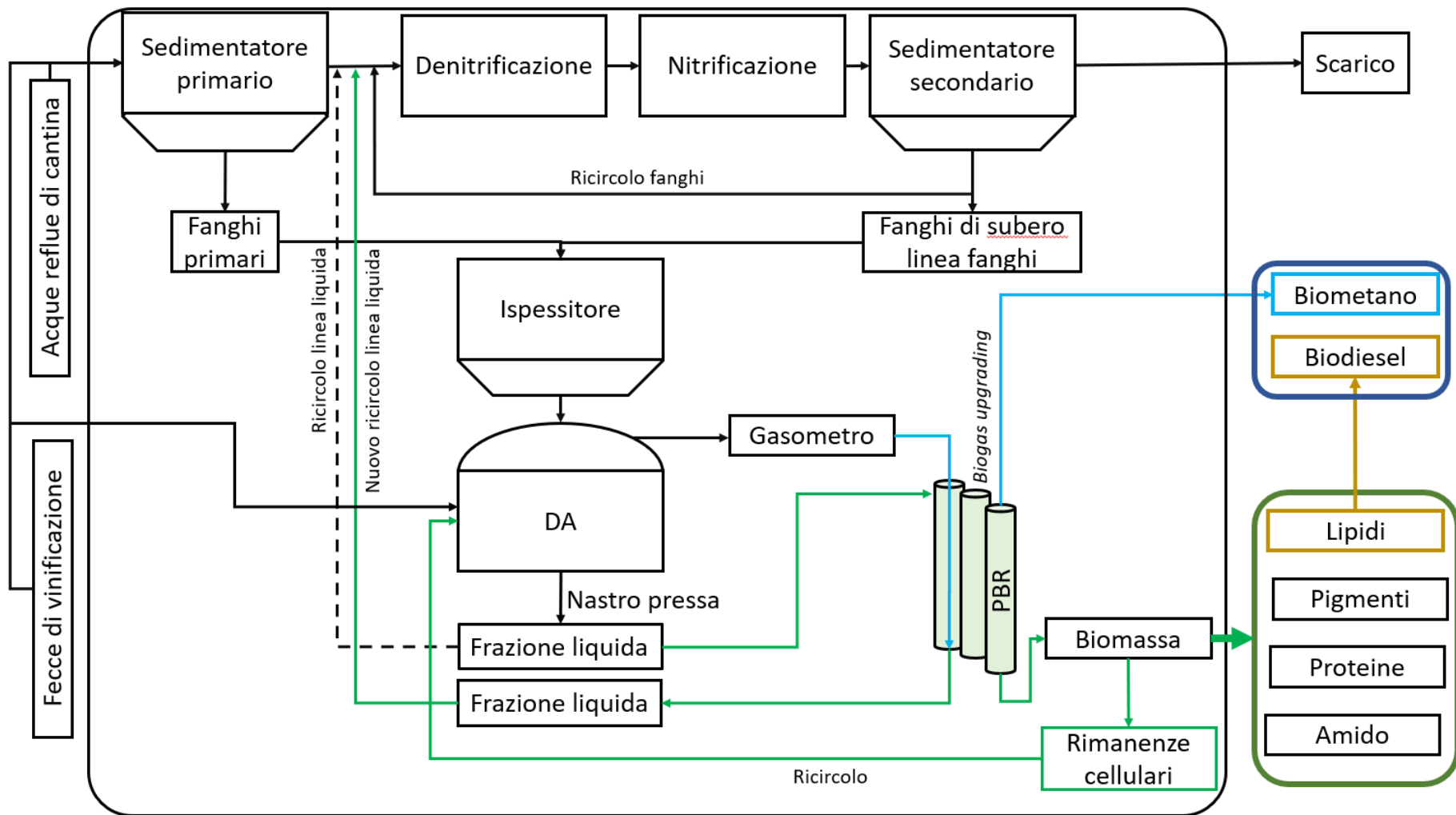
Il trattamento di co-digestione della feccia di vinificazione *in loco* nelle industrie vitivinicole può rappresentare una strategia innovativa per lo smaltimento di questo rifiuto, il trattamento dell'effluente DA con microalghe però non è risultato sufficiente per lo scarico secondo il D. Lgs 156/06. L'applicazione di HRT elevati ha sottolineato però le potenzialità di applicazione della coltivazione microalgale su digestato, portando all'ottenimento di una biomassa stabile con caratteristiche promettenti per la produzione di prodotti secondari ad alto valore aggiunto. Per quanto l'effluente post trattamento microalgale mostri valori di sCOD ancora elevati, la rimozione totale dell'azoto comporta una potenziale applicazione di questo trattamento terziario come applicazione alternativa in un impianto di trattamento delle acque da cantina. Come riportato in Figura 24, l'applicazione della coltivazione microalgale accoppiata ai sistemi DA cambierebbe la linea di ricircolo della frazione liquida. Date le caratteristiche chimiche dell'effluente post-trattamento microalgale, gli effetti positivi nell'applicazione negli impianti di trattamento acque sarebbe associati a:

- Risparmio energetico nel trattamento dell'azoto negli impianti di depurazione in quanto l'ossidazione dell'azoto ammoniacale nella denitrificazione e nitrificazione impatta del 20 % sul costo di areazione del sistema (circa 3 – 4 kWh AE<sup>-1</sup> anno<sup>-1</sup>);
- Risparmio dell'aggiunta di sCOD prima della denitrificazione tipicamente richiesto negli impianti in cui il rapporto COD/N risulta sfavorevole per le reazioni di denitrificazione. Il ricircolo dell'effluente da PBR, che non ha identificato rimozione di sCOD, permetterebbe di evitare l'aggiunta di materiale organico chiudendo così il sistema di trattamento [229].

Dal punto di vista economico, la biomassa microalgale ottenuta mediante il sistema produttivo in semi-continuo ha un valore variabile in dipendenza sia dalle condizioni di mercato e purezza dei prodotti ottenibili. In generale, la produzione su larga scala comporta un costo di produzione compreso tra 0.50 € kg<sup>-1</sup> e 6 € kg<sup>-1</sup> [230,231], dove la tipologia reattoristica influisce ulteriormente, come l'applicazione di PBR tubolari verticali influisce per 4.15 € kg<sup>-1</sup> e l'ottimizzazione dei parametri di processo, quali illuminazione, agitazione e costo della CO<sub>2</sub>, impatterebbe sui costi di produzione di 0.68 € kg<sup>-1</sup> [232]. Il costo dei prodotti di bioraffineria invece vede l'influenza della tipologia di prodotto ottenibile, ad esempio la sola frazione di lipidi saturi per la produzione di biocarburanti o tutti i composti estraibili ed immettabili sul mercato. L'analisi di mercato per la biomassa ed i composti microalgali effettuata di Dibenedetto et al. [233] identifica come valore di mercato per i lipidi estratti dalla biomassa microalgale 2 € kg<sup>-1</sup>, mentre il prodotto di biodiesel prodotto risulta di 0.5 € kg<sup>-1</sup>. La frazione proteica applicata per la produzione di mangimi o integratori alimentari risulta di 5 € kg<sup>-1</sup> e 0.75 € kg<sup>-1</sup> rispettivamente. Per quanto riguarda il valore di mercato della biomassa coltivata in vasca aperta su reflui, come riportato da Dibenedetto et al. [233], il valore risulta estremamente variabile, da 44.5 € kg<sup>-1</sup> a 556 € kg<sup>-1</sup>, in dipendenza dal prodotto estratto, metodologia di estrazione, purezza e ceppo microalgale utilizzato.

Il lavoro sperimentale svolto ha identificato l'applicazione di HRT 20 giorni per la coltivazione in semi-continuo per il trattamento del digestato vinicolo, applicabile per i consorzi vinicoli con presenza di un impianto di trattamento acque. La biomassa ottenuta tramite questa coltivazione ha essa stessa un valore di mercato che può influire positivamente sull'applicazione del processo nei sistemi di trattamento. La biomassa microalgale in sé ha un valore variabile tra 5.92 € t<sup>-1</sup> a 1368.9 € t<sup>-1</sup> in dipendenza dal suo utilizzo successivo [233], cioè se la sua applicazione trova riscontro nell'estrazione di uno o più prodotti secondari ad alto valore aggiunto, rendendola quindi un ulteriore prodotto che può essere immesso nel mercato da parte dei produttori vinicoli.



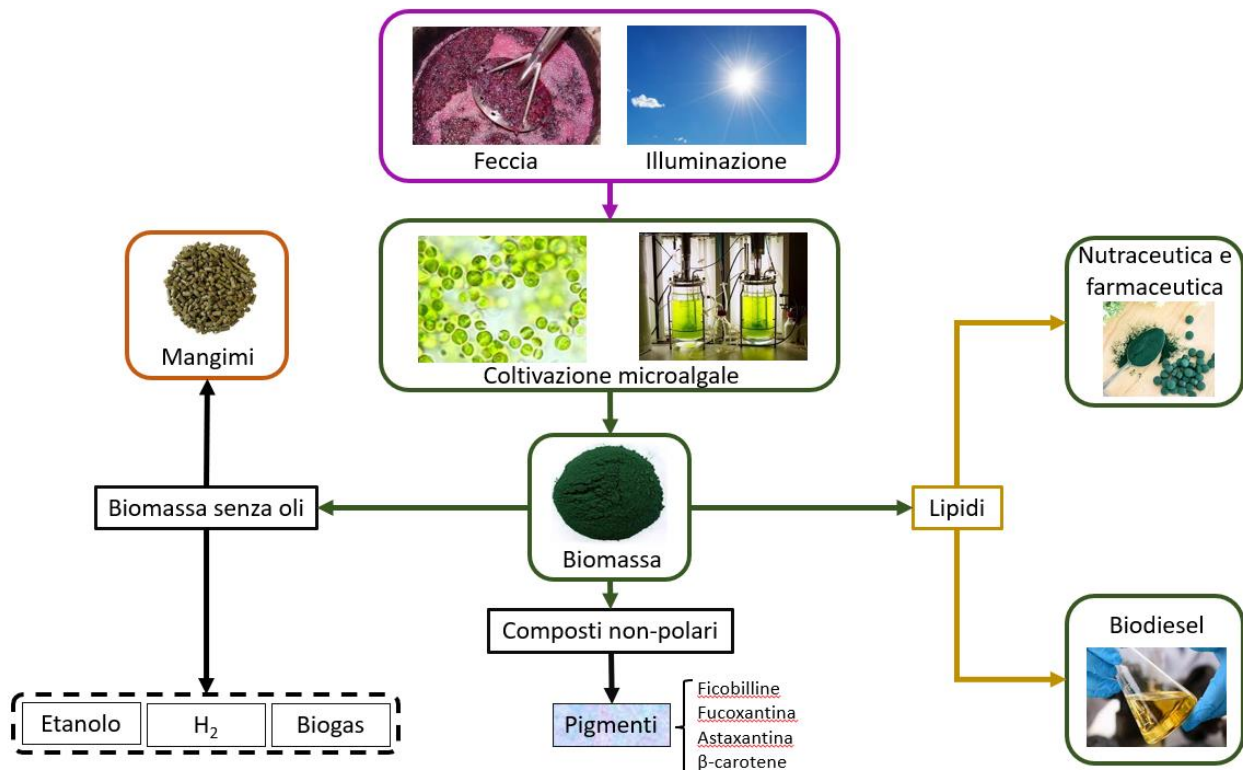


**Figura 24:** Applicazione del trattamento in semi-continuo del sistema accoppiato DA-microalghe in un sistema di trattamento. La linea tratteggiata indica il tipico ricircolo della frazione liquida del digestato in un impianto, la linea verde indica il nuovo indirizzamento della frazione liquida per il ricircolo, la linea blu indica il processo di biogas upgrading per la produzione di biometano.

#### 4.6 Coltivazione di *C. vulgaris* su feccia di vinificazione

L'applicabilità delle alghe nel trattamento diretto di reflui agro-industriali di varia natura apre nuove potenziali innovazioni di applicazione del trattamento biologico, per questo motivo la valutazione della coltivazione microalgale direttamente su feccia di vinificazione necessita di studi e valutazioni del processo. L'applicazione di una coltivazione microalgale diretta su feccia di vinificazione pone questa tipologia di trattamento come un sistema applicabile per le piccole industrie vitivinicole italiane che non hanno un impianto di trattamento delle acque reflue e quindi possono trattare direttamente in loco le fecce prodotte ed ottenere un effluente depurato e biomassa microalgale contenente prodotti secondari ad alto valore aggiunto vendibili sul mercato.

I problemi che si possono riscontrare nell'applicazione della feccia di vinificazione come substrato per le colture microalgali riguardano principalmente la elevata concentrazione di composti polifenolici, soprattutto nella feccia rossa di vinificazione, bassi pH (circa 3) e la presenza di microrganismi, tipicamente lieviti, necessari alla fermentazione alcolica del vino. La feccia ha un aspetto denso, con presenza di sostanza organica (polpa, raspi, bucce, lieviti di fermentazione) ed inorganica (bentonite). Fortunatamente, la frazione solida e liquida sono facilmente separabili tramite centrifugazione, ma mediante questo pretrattamento si può rimuovere solo la frazione più pesante; infatti, nella frazione liquida permangono lieviti che proseguono il loro sviluppo nel substrato di crescita. Trovare un'applicazione diretta della feccia di vinificazione può rappresentare un'innovazione vincente nell'ambito del trattamento di questo refluo diminuendo i costi di impianto in loco. Per quanto il sistema DA risulti stabile nel lungo periodo applicando differenti fecce di vinificazione, i suoi costi di costruzione, mantenimento, personale specializzato e trattamenti del digestato uscente, possono potenzialmente limitarne l'applicazione per le piccole aziende vinicole. Per questo motivo, lo studio della coltivazione microalgale direttamente su feccia di vinificazione può rappresentare una metodologia alternativa di trattamento, portando all'identificazione di un nuovo substrato di crescita applicabile direttamente nelle piccole produzioni familiari, che rappresentano la fazione maggiore dei produttori vitivinicoli italiani (Figura 25).



**Figura 25:** Schema di applicazione della feccia di vinificazione come substrato di crescita per la biomassa microalgale.

I dati bibliografici disponibili per le coltivazioni microalgali sono estremamente esigui e vedono l'applicazione di pretrattamenti quali sterilizzazione mediante autoclave o conversione della feccia di vinificazione in aceto tramite incubazione ossidativa con *Acetobacter acetii* [234] o l'estrazione dei composti di interesse per la coltivazione microalgale [100]. Data l'assenza di dati bibliografici, i primi test di valutazione della feccia di vinificazione come substrato di crescita per *C. vulgaris* sono stati incentrati nell'identificazione dei pretrattamenti da effettuare sulla feccia e valutazione della capacità di crescita del ceppo microalgale.

#### 4.6.1 Coltivazione *C. vulgaris* di differenti fecce di vinificazione a differenti diluizioni

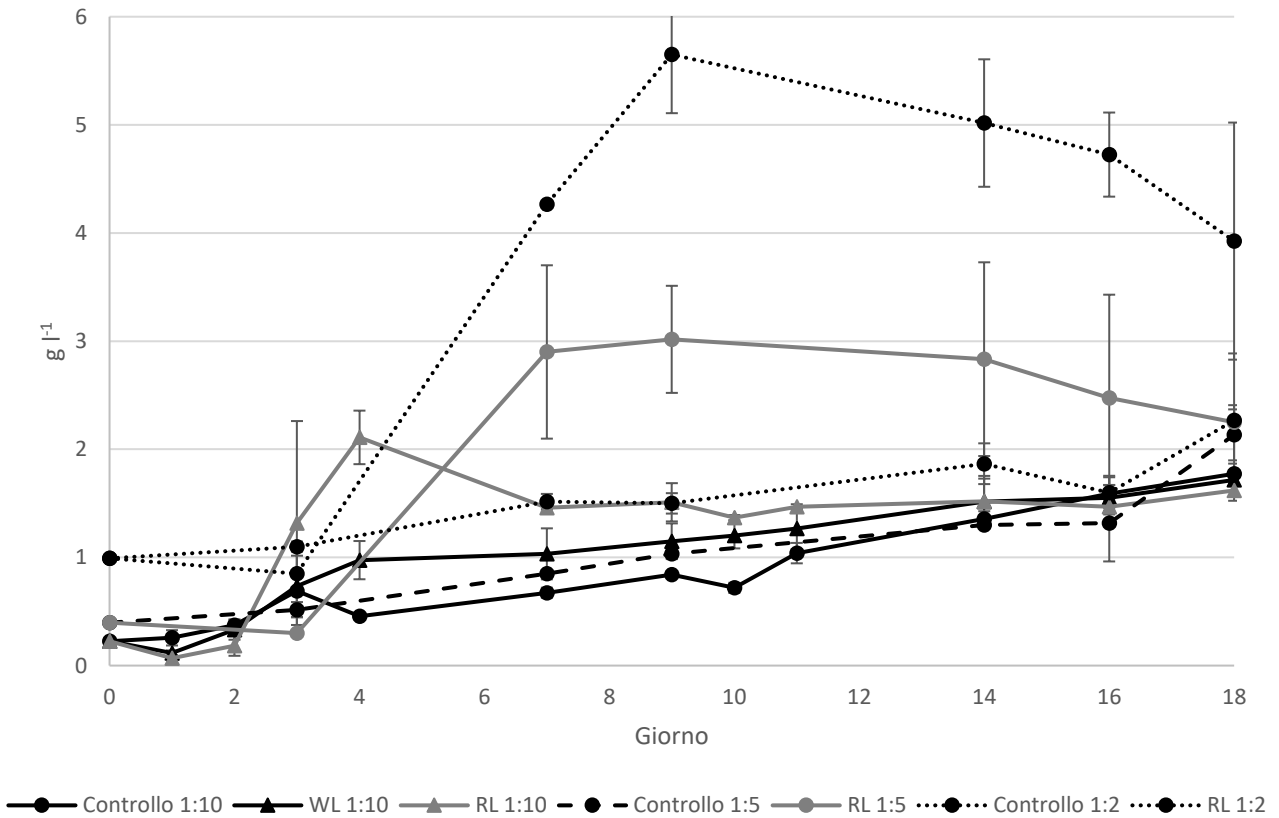
La sperimentazione batch ha applicato la coltivazione di *C. vulgaris* sulla frazione liquida della feccia bianca e rossa di vinificazione diluita 1:10, 1:5 e 1:2 solamente centrifugata per rimuovere i solidi sospesi (Figura 26 a, inizio test, e Figura 26 b, fine test). Le analisi svolte durante la sperimentazione hanno evidenziato che la sola centrifugazione non rimuove la presenza di lieviti, come *Saccharomyces bayanus*, lievito usato per la fermentazione del mosto d'uva dalla ditta Serena Wines SRL che ha fornito le differenti fecce di vinificazione, e non-*Saccharomyces*, come *Candida albicans*, *Hanseniaspora* e *Metschnikowia*, che sono tipicamente presenti nel vino e che possono proliferare a discapito della coltura microalgale.



a)

b)

**Figura 26:** Sperimentazione di coltivazione di *C. vulgaris* in mixotrofia con feccia di vinificazione bianca e rossa diluita 1:10 a) all'inizio del test batch, b) al termine del test.



**Figura 27:** Analisi del peso durante la sperimentazione in batch con feccia di vinificazione bianca (WL) e rossa (RL) a diluizione 1:10, 1:5 e 1:2.

L'applicazione della diluizione 1:10 ha mostrato valori di biomassa microalgale prodotta su feccia bianca e rossa confrontabili con la condizione di controllo (Figura 27). Le osservazioni in microscopia ottica mostravano la presenza di ife probabilmente di *Candida* sp., ma la sua presenza non ha inficiato la

proliferazione di *C. vulgaris* che è risultata la specie predominante nel mezzo di coltura. Data l'impossibilità di effettuare un'analisi genetica della coltura, le analisi al microscopio ottico ha permesso di identificare ifee che possono essere associate al genere *Candida*. La caratterizzazione della biomassa ottenuta al termine del test ha sottolineato che la coltivazione su feccia rossa diluita 1:10 porta ad ottenere una biomassa con composizione promettente per applicazioni alternative dato con un alto contenuto di clorofille, carotenoidi, proteine e lipidi totali in confronto alla condizione di controllo e WL. Contrariamente, l'applicazione di diluizioni inferiori di feccia di vinificazione (1:5 e 1:2) hanno mostrato problemi nella proliferazione del ceppo microalgale, in quanto la proliferazione del lievito *Candida* sp. è risultata predominante nella condizione RL 1:2. Come indentificato nella condizione sperimentale RL 1:2, anche nella condizione RL 1:5 vi è una forte proliferazione di *Candida* sp., ma non inficia completamente la proliferazione di *C. vulgaris* ed una composizione potenzialmente interessante data l'alta concentrazione di lipidi e proteine (Tabella 17). L'alta percentuale di lipidi identificata nella biomassa di lieviti è stata identificata anche in altri studi (34 %) [235], risultante anche in altre specie di lievito adoperate per la fermentazione alcolica del vino (*S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *Candida* sp.). Le percentuali lipidiche per i lieviti risultano estremamente variabili, tra il 5 % ed il 60 %, e risultano estremamente associate alle condizioni di coltura, dove la temperatura di fermentazione gioca un ruolo cruciale con un effetto specie specifico nell'accumulo e composizione della frazione lipidica [236].

**Tabella 17:** Valori di crescita e composizione della biomassa di *C. vulgaris* coltivata in batch su feccia di vinificazione bianca (WL) e rossa (RL) a diluizione 1:10, 1:5 e 1:2 con i rispettivi controlli (BG11) in mixotrofia.

Diluizione feccia di vinificazione	1 a 10			1 a 5		1 a 2	
	Controllo	WL	RL	Controllo	RL	Controllo	RL
Tasso di crescita ( $\mu$ , d <sup>-1</sup> )	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.02
Peso secco (g l <sup>-1</sup> )	1,77 ± 0.09	1.71 ± 0.02	1.61 ± 0.09	2.61 ± 0.40	1.82 ± 0.03	3.00 ± 0.00	3.25 ± 1.48
Densità cellulare (milioni di cellule ml <sup>-1</sup> )	59.40 ± 28.95	30.22 ± 7.61	32.02 ± 6.07	76.57 ± 10.33	-	104.25 ± 5.14	-
Ch a (mg g <sub>biomassa</sub> <sup>-1</sup> )	2.13 ± 0.46	2.86 ± 0.41	3.90 ± 1.13	3.54 ± 0.50	0.07 ± 0.00	4.39 ± 0.34	0.44 ± 0.08
Ch b (mg g <sub>biomassa</sub> <sup>-1</sup> )	0.27 ± 0.20	0.73 ± 0.13	1.00 ± 0.13	0.67 ± 0.05	0.08 ± 0.03	0.97 ± 0.05	0.37 ± 0.08
Carotenoidi tot (mg g <sub>biomassa</sub> <sup>-1</sup> )	0.40 ± 0.00	0.27 ± 0.03	1.01 ± 0.42	0.65 ± 0.04	0.00 ± 0.01	0.66 ± 0.03	0.00 ± 0.03
Lipidi (%)	9.11 ± 0.38	41.63 ± 10.11	61.27 ± 3.46	28.36 ± 0.08	34.56 ± 13.70	29.36 ± 3.81	42.44 ± 1.09
Proteine (%)	38.09 ± 3.83	44.58 ± 6.30	60.60 ± 2.11	24.93 ± 2.12	39.73 ± 4.49	42.08 ± 7.20	53.05 ± 3.41
Amido (%)	3.30 ± 0.29	3.20 ± 1.07	3.16 ± 1.03	3.79 ± 1.24	0.27 ± 0.61	2.61 ± 0.53	0.72 ± 0.01

Per quanto concerne l'effetto di depurazione del mezzo di crescita al termine della sperimentazione, si hanno valori simili di rimozione di sCOD e polifenoli dalla feccia di vinificazione nelle varie condizioni sperimentali. Sia il ceppo microalgale (solo nella condizione 1:10) ed il lievito *Candida* sp. (condizioni 1:5 e 1:2) hanno portato ad una rimozione dell'sCOD del  $99.05 \pm 0.06$  %,  $97.92 \pm 0.41$  %,  $97.28 \pm 0.09$  % e  $99.16 \pm 0.03$  % in presenza di WL e RL a diluizione 1:10, RL a diluizione 1:5 e 1:2 rispettivamente. La rimozione dei polifenoli in soluzione risulta elevata in tutte le condizioni sperimentali:  $71.83 \pm 0.47$  %,  $86.41 \pm 0.65$  %,  $92.31 \pm 0.00$  e  $89.93 \pm 0.69$  % in presenza di WL e RL a diluizione 1:10, RL a diluizione 1:5 e 1:2 rispettivamente. Il monitoraggio del pH della soluzione durante il test ha mostrato un cambiamento sostanziale del pH dall'inizio al termine del test. L'applicazione della feccia diretta di vinificazione come substrato di crescita porta il pH della soluzione iniziale a valori molto acidi,  $3.91 \pm 0.09$ ,  $3.85 \pm 0.02$ ,  $3.87 \pm 0.01$  e  $3.84 \pm 0.00$  per WL e RL diluite a 1:10, RL a diluizione 1:5 e 1:2 rispettivamente. Al termine della sperimentazione i valori di pH sono risultati basici:  $9.41 \pm 0.22$ ,  $9.46 \pm 0.17$ ,  $8.56 \pm 0.01$  e  $8.75 \pm 0.05$  nelle condizioni WL e RL a diluizione 1:10, RL a diluizione 1:5 e 1:2 rispettivamente. La rimozione di ammonio in tutte le sperimentazioni è risultata del 100 %, valore determinato dall'attività metabolica microalgale e stripping data l'insufflazione d'aria e valori di pH elevati. Per quanto riguarda la rimozione di  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , la loro rimozione è stata identificata solo per le sperimentazioni in presenza di RL diluita 1:5 e 1:2. La rimozione ionica è risultata di  $43.41 \pm 2.43$  %,  $27.14 \pm 2.13$  %,  $46.54 \pm 0.90$  % e  $43.91 \pm 1.55$  % per  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  rispettivamente in presenza di RL diluita a 1:5. Valori di rimozione ionica di  $77.32 \pm 0.43$  %,  $49.53 \pm 4.80$  %,  $76.95 \pm 0.48$  % e  $77.54 \pm 0.22$  % per  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  rispettivamente sono stati identificati in presenza di RL a diluizione 1:2. In questo caso le rimozioni ioniche ottenute non possono essere correlate alla crescita microalgale, ma alla crescita di lieviti e funghi, dove questi ioni hanno funzioni cellulari dal punto di vista enzimatico: funzionamento enzimatico nelle attività di catalisi (metalloenzimi per  $\text{Mg}^{2+}$ ) e strutturale dell'enzima (per  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ).

In conclusione, la sperimentazione ha mostrato la capacità del ceppo *C. vulgaris* di proliferare sulla feccia di vinificazione pretrattata con la sola centrifugazione solo a diluizioni elevate (1:10), ottenendo un'elevata produzione di biomassa sia su WL che RL. La feccia a diluizione 1:10 non mostra effetto inibitorio determinato dalle alte concentrazioni di polifenoli e sCOD. Al termine del test è stata identificata una buona rimozione dell'sCOD e polifenoli in soluzione ed il cambio di pH ha evidenziato la capacità del ceppo microalgale di modificare il mezzo per creare le condizioni ottimali di crescita.

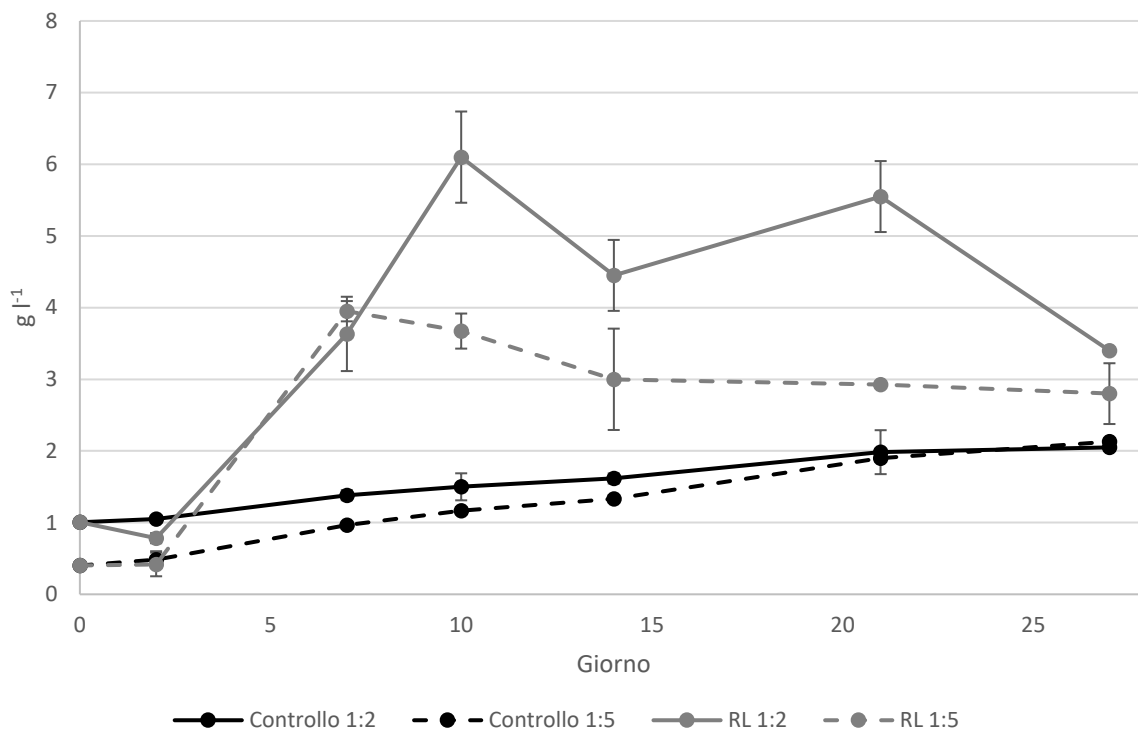
Se da una parte l'applicazione di elevate diluizioni per la coltivazione di *C. vulgaris* su feccia di vinificazione ha mostrato promettenti produzioni di biomassa ed effetto depurativo, l'assenza di crescita di *C. vulgaris* a diluizioni inferiori (1:5 e 1:2), data la contaminazione da lievito, mostra la necessità di ulteriori pretrattamenti della feccia di vinificazione per la sua applicazione come mezzo di crescita per la coltura microalgale.

#### 4.6.2 Applicazione di due pretrattamenti meccanici per la coltivazione *C. vulgaris*

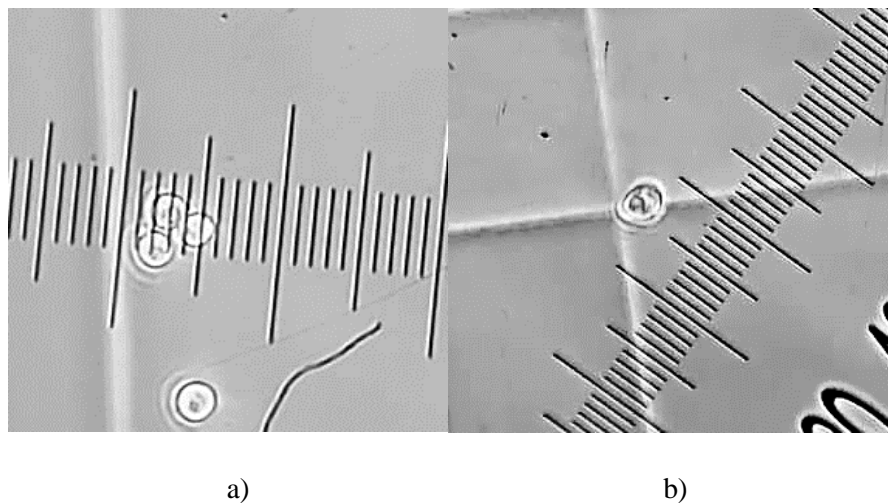
Data la proliferazione di *Candida* sp. previa la sola centrifugazione come pretrattamento della feccia, la successiva sperimentazione è stata svolta applicando due pretrattamenti meccanici sulla feccia di vinificazione: centrifugazione e filtrazione a 0.2  $\mu\text{m}$ . Applicando una coltivazione mixotrofica di *C. vulgaris* su RL diluita a 1:5 e 1:2, la visione diretta al microscopio delle colture ha identificato comunque la presenza del lievito tutte le condizioni sperimentali, dove però la presenza del lievito è risultata predominante a discapito della crescita di *C. vulgaris* solo nella condizione sperimentale di diluizione 1:2.

Data la presenza del lievito in tutte le condizioni sperimentali, si può definire un consorzio lievito-microalghe per la condizione sperimentale RL 1:5. Il monitoraggio della biomassa durante la sperimentazione mostra elevate produzioni di biomassa in presenza di RL 1:5 e RL 1:2 (Figura 28). Nel consorzio lievito-microalghe, le analisi al microscopio ottico (Figura 29) ha evidenziato un cambio morfologico con ingrandimento delle cellule al termine della sperimentazione (controllo con dimetro di 0.05 mm e la condizione sperimentale con diametro di 0.1 mm). RL diluita 1:2 ha mostrato un'elevata contaminazione da lievito (*Candida* sp.), con quasi assenza di cellule microalgali al termine della sperimentazione. La caratterizzazione della composizione della biomassa al termine della sperimentazione (Tabella 18) mostra valori confrontabili con la condizione di controllo per la biomassa coltivata su RL diluita 1:5, con valori percentuali maggiori per la frazione lipidica associati alla presenza di lievito. La caratterizzazione per la biomassa ottenuta in RL 1:2, dove solo il lievito è risultata la specie dominante ha mostrato valori in percentuale di biomassa inferiori rispetto ai valori percentuali ottenuti applicando la sola centrifugazione come pretrattamento della feccia di vinificazione. La percentuale lipidica nella biomassa fungina del 13.98 % risulta comunque confrontabile con altri lavori, come Torija et al. [237] che applicano una coltivazione di *S. bayanus* a 25 °C ed ottengono una percentuale lipidica del 18 %. Dato che la temperatura risulta un fattore fondamentale per l'accumulo di lipidi e per la loro composizione nel lievito, il processo di trattamento della feccia di vinificazione mediante coltivazione prolungata di lieviti aerobici che proliferano spontaneamente dovrà essere approfondita sia dal punto di vista di coltivazione che di identificazione genetica in ottica di potenziali applicazioni di trattamento ed estrazione di prodotti di interesse biotecnologico.





**Figura 28:** Monitoraggio del peso secco durante la coltivazione in batch su feccia di vinificazione rossa (RL), previa centrifugazione e filtrazione, a diluizione 1:5 e 1:2.

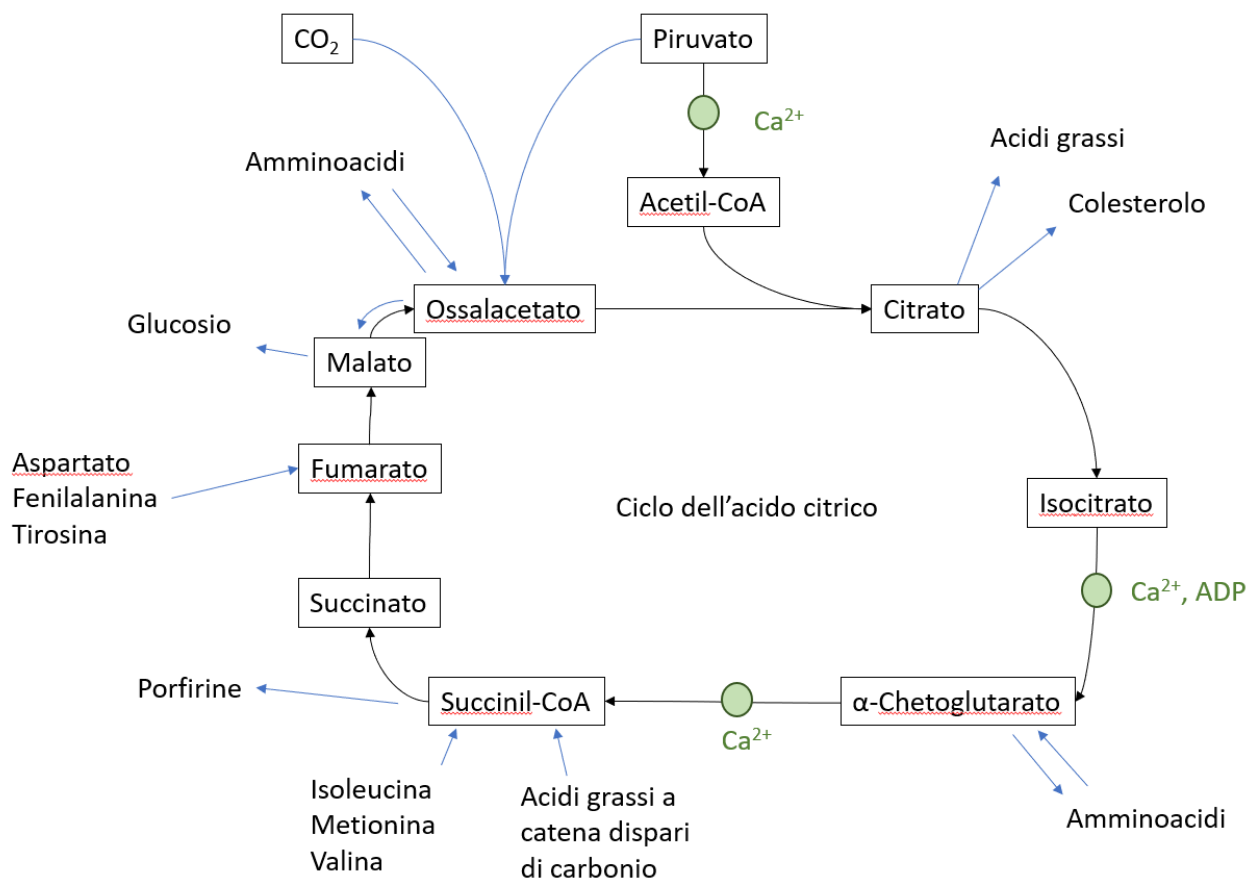


**Figura 29:** a) Ingrandimento 40X a microscopio ottico da banco della condizione di controllo al termine del test in batch in condizione 1:5; b) Ingrandimento 40X a microscopio ottico da banco della condizione sperimentale feccia rossa filtrata diluita 1:5 al termine della sperimentazione.

**Tabella 18:** Analisi di monitoraggio e composizione della biomassa al termine del test in batch su feccia di vinificazione rossa filtrata con diluizione 1:2 e 1:5 con i rispettivi controlli in BG11.

	Controllo 1:2	Controllo 1:5	RL 1:2	RL 1:5
Peso secco (g l <sup>-1</sup> )	2.05 ± 0.04	2.13 ± 0.01	3.40 ± 1.69	2.80 ± 0.42
Densità cellulare (milioni di cellule ml <sup>-1</sup> )	59.02 ± 5.89	60.97 ± 11.12	23.55 ± 3.57	48.07 ± 11.15
Tasso di crescita (μ, d <sup>-1</sup> )	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.00
Ch a (mg g <sub>biomassa</sub> <sup>-1</sup> )	7.57 ± 0.02	7.61 ± 0.13	0.56 ± 0.11	6.05 ± 0.30
Ch b (mg g <sub>biomassa</sub> <sup>-1</sup> )	2.09 ± 0.06	2.00 ± 0.12	0.35 ± 0.03	1.50 ± 0.01
Carotenoidi tot (mg g <sub>biomassa</sub> <sup>-1</sup> )	0.77 ± 0.04	0.85 ± 0.14	0.00 ± 0.01	0.61 ± 0.00
Lipidi (%)	29.92 ± 0.10	32.95 ± 2.64	13.98 ± 0.13	45.26 ± 11.14
Proteine (%)	89.72 ± 2.23	76.89 ± 0.83	28.85 ± 1.49	79.67 ± 2.06
Amido (%)	4.97 ± 0.94	0.53 ± 0.01	0.13 ± 0.02	2.79 ± 0.07

La coltivazione sia del consorzio lievito-microalghie (RL1:5) che del solo lievito (RL 1:2) ha mostrato capacità di modifica del pH della soluzione, tamponandolo e basificandolo, passando da un valore iniziale di pH di 3.7 ad un valore di pH finale di  $8.69 \pm 0.43$  per RL diluita 1:2 e  $9.67 \pm 0.03$  per la RL diluita 1:5. L'analisi cromatografica (Tabella 19) ha sottolineato l'effetto depurativo in presenza di RL diluita 1:2, con rimozione dell'83 % del calcio e del 1.86 % del magnesio. Rimozioni inferiori sono stati riscontrati per la diluizione 1:5, rimozione del 37.94 % e 15.40 % di magnesio e calcio rimosso rispettivamente. I dati di rimozione devono essere correlati alla biomassa proliferata nelle differenti condizioni sperimentali, dove a diluizione 1:5 *C. vulgaris* è risultato predominante, quindi la rimozione ionica può essere associata alla loro sua funzione biologica come segnale di trasduzione, tolleranza allo stress e resistenza ai patogeni, integrità della membrana dei tilacoidi, metabolismo del glicerolo e come catalizzante (insieme al manganese) per l'ossidazione dell'acqua nel fotosistema II (PS II) [161,196]. Le rimozioni identificate in presenza di RL diluita 1:2 sono correlate invece alla proliferazione dei contaminanti microbiologici (lievito), dove l'utilizzo di questi ioni risulta essenziale per la struttura e l'attività enzimatica, dove, ad esempio, il calcio ha azione di regolazione del ciclo dell'acido citrico, avendo azione di attivatore delle reazioni a catena della piruvato deidrogenasi fosfatasi per attivazione della piruvato deidrogenasi e produzione di Acetil-CoA (Figura 30).



**Figura 30:** Schema del ciclo dell'acido citrico con identificazione dei punti della via metabolica dove interviene lo ione calcio.

**Tabella 19:** Quantificazione degli anioni e cationi in soluzione per le condizioni sperimentali con feccia di vinificazione rossa (RL) filtrata 0.2  $\mu\text{m}$  a diluizione 1:2 e 1:5

	RL 1:2	RL 1:5	RL 1:2	RL 1:5	RL 1:2	RL 1:5
	in ( $\text{mg l}^{-1}$ )	in ( $\text{mg l}^{-1}$ )	out ( $\text{mg l}^{-1}$ )	out ( $\text{mg l}^{-1}$ )	Rimozione (%)	Rimozione (%)
$\text{Na}^+$	$29.87 \pm 4.84$	$11.95 \pm 1.93$	$342.48 \pm 15.96$	$380.22 \pm 1.10$	-	-
$\text{NH}_4^+$	$129.42 \pm 7.74$	$51.77 \pm 3.09$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$100.00 \pm 0.00$	$100.00 \pm 0.00$
$\text{K}^+$	$458.17 \pm 16.79$	$183.27 \pm 6.71$	$532.86 \pm 6.47$	$190.53 \pm 11.31$	-	-
$\text{Mg}^{2+}$	$206.17 \pm 10.42$	$82.47 \pm 4.17$	$202.26 \pm 23.62$	$51.18 \pm 7.90$	$1.89 \pm 11.45$	$37.94 \pm 9.58$
$\text{Ca}^{2+}$	$110.32 \pm 10.42$	$44.13 \pm 4.17$	$18.605 \pm 5.80$	$37.33 \pm 1.35$	$83.13 \pm 5.26$	$15.40 \pm 3.07$
$\text{Cl}^-$	$36.55 \pm 16.45$	$14.62 \pm 6.58$	$24.31 \pm 0.23$	$22.09 \pm 0.82$	$26.16 \pm 32.58$	-
$\text{NO}_2^-$	$5.78 \pm 8.17$	$2.31 \pm 3.26$	$17.28 \pm 0.08$	$16.32 \pm 0.07$	-	-
$\text{SO}_4^{2-}$	$597.00 \pm 1.57$	$238.80 \pm 0.62$	$197.67 \pm 0.77$	$74.12 \pm 1.03$	$66.88 \pm 0.21$	$68.95 \pm 0.51$
$\text{NO}_3^-$	$28.42 \pm 14.02$	$11.36 \pm 5.60$	$1.04 \pm 1.48$	$2.52 \pm 2.01$	$94.34 \pm 8.00$	$79.66 \pm 7.72$
$\text{PO}_4^{3-}$	$992.7 \pm 6.34$	$397.08 \pm 2.53$	$227.44 \pm 45.65$	$50.88 \pm 3.86$	$77.10 \pm 4.45$	$87.18 \pm 0.89$

I valori di rimozione identificati tramite l'analisi cromatografica hanno mostrato rimozioni simili di nitrato, solfato e fosfato in presenza di RL con diluizione 1:5 e 1:2, come la rimozione di sCOD del  $99.93 \pm 0.00$  % e  $98.68 \pm 0.22$  % per RL 1:2 e 1:5 rispettivamente. I valori di sCOD al termine della sperimentazione risultano di  $0.81 \pm 0.01$  mgO<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> e  $0.81 \pm 0.14$  mgO<sub>2</sub> l<sup>-1</sup> per RL diluita 1:2 e 1:5 rispettivamente. La rimozione della frazione polifenolica della feccia al termine del test è risultata elevata,  $91.87 \pm 0.11$  % e  $93.29 \pm 0.32$  % per RL diluita 1:2 e 1:5 rispettivamente. La concentrazione finale di polifenoli al termine della sperimentazione è risultata di  $61.03 \pm 0.84$  mg l<sup>-1</sup> e  $20.13 \pm 0.98$  mg l<sup>-1</sup> per RL diluita 1:2 e 1:5 rispettivamente. I dati di rimozione ottenuti risultano incoraggianti per l'applicazione delle colture microalgali, come di lievito autoctono o mix delle due colture, per il trattamento diretto della feccia di vinificazione, ottenendo al termine del test in batch valori di concentrazioni nell'effluente in linea con il D. Lgs 152/06 (Tabella 12), che permetterebbero il rilascio in acque superficiali, rete fognaria e suolo dell'effluente trattato.

La sperimentazione in batch ha portato alla conclusione che è possibile coltivare *C. vulgaris* su feccia diretta di vinificazione, previ pretrattamenti, a basse diluizioni portando ad ottenere una biomassa ricca di lipidi e proteine potenzialmente utilizzabili per la produzione di prodotti di terza generazione (biodiesel) ed un effluente in linea con la direttiva italiana per lo scarico delle acque reflue anche nelle aree sensibili. Per quanto riguarda la potenziale applicabilità su larga scala, vi è la necessità di valutazioni maggiormente approfondite volte all'identificazione di pretrattamenti idonei alla coltura di soli ceppi microalgali o l'applicazione di colture miste lieviti/microalghe e la valutazione dell'applicabilità del trattamento in sistemi in continuo/semi-continuo alimentando il sistema con feccia di vinificazione. Le future sperimentazioni saranno volte a identificare i parametri di processo volti allo studio ed applicabilità di questo sistema di trattamento alternativo.

#### 4.6.2.1 Lieviti nella produzione vitivinicola

Un approfondimento importante, data l'applicazione delle colture microalgali sulla feccia di vinificazione, riguarda i microrganismi che permettono la vinificazione e che ritroviamo nella feccia di vinificazione.

Nella produzione vitivinicola vi è un'interazione tra funghi filamentosi e lieviti, questa interazione impatta vari punti del processo vitivinicolo, dalla fermentazione alla coltivazione dell'uva, fino al deterioramento del prodotto finale. Per quanto riguarda i funghi e lieviti sulle bucce d'uva, è ben noto che specie quali *Botrytis cinerea* ed *Aspergillus* spp. devono essere rimosse altrimenti mandano in deterioramento l'uva ed eliminano i lieviti richiesti nella fermentazione [238]. L'applicazione di fungicidi è stata ampiamente studiata e valutata e se da una parte influenza positivamente l'assenza di funghi patogeni dell'uva, dall'altra inficia l'abilità di fermentazione dei lieviti. Le nuove applicazioni vedono l'utilizzo di specie di lievito specifiche sul grappolo d'uva, che rilasciano molecole con attività antimicotica. I lieviti utilizzati a questo scopo sono: *Metshnikowia pulcherrima*, varie specie di *Candida* – *Saccharomyces* - *Zygosaccharomyces*, *Cryptococcus* e *Pichia*. La loro attività antimicotica avviene grazie alla produzione di 1,3-β-glucanasi che permette la distruzione della parete cellulare dei funghi [239].

Per quanto sia *Saccharomyces cerevisiae* il lievito che permette la fermentazione del vino, la prima fermentazione avviene tramite le specie di lievito che si ritrovano nella flora del chicco d'uva e sulla sua superficie e sono tipicamente *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* e *Candida*. A metà del processo fermentativo *S. cerevisiae* diventa predominante portando a termine la fermentazione alcolica del vino. L'etanolo prodotto da *S. cerevisiae* tipicamente inibisce la crescita dei microrganismi non-*Saccharomyces* in quanto queste specie tollerano l'etanolo fino al 5 % -7 % in soluzione. Ma se applicata una bassa temperatura alla fermentazione (15 -20 °C), vi è un aumento della tollerabilità all'etanolo per le specie *Hanseniaspora* e *Candida* che possono essere presenti in equal misura a *S. cerevisiae* al termine della fermentazione. Queste variazioni durante le fermentazioni sono facilmente associabili alla tollerabilità all'etanolo delle singole specie, dove alla variazione della fermentazione con aumento dell'etanolo risulteranno più abbondanti rispetto all'inizio del processo fermentativo. Anche l'ossigenazione gioca un ruolo cruciale nella differenziazione delle specie presenti nel fermentato, infatti i non-*Saccharomyces* risultano poco tolleranti basse concentrazioni di ossigeno e questa condizione viene a presentarsi quando si ha la crescita esponenziale di *S. cerevisiae* [240–242].

La presenza di non-*Saccharomyces* risulta importante ed il collo di bottiglia della produzione vitivinicola durante lo stoccaggio del vino e nell'imbottigliamento. Infatti, in queste fasi produttive la proliferazione di non-*Saccharomyces* (*Candida* e *Pichia*) sulla superficie comporta la degradazione del vino agendo con azione fermentante o ossidante [243].

Il processo di produzione vitivinicola è un processo complesso e soggetto a molteplici interazioni microbiologiche ancora in fase di studio e approfondimento. La feccia di vinificazione che si ottiene come rifiuto del processo vitivinicolo contiene i microrganismi che hanno permesso la fermentazione alcolica. La loro presenza ed effetto sulla feccia a lungo termine, valutando anche interazioni con batteri e microalghe, necessita di ulteriori studi ed approfondimenti volti all'individuare le condizioni e le applicazioni possibili in ottica di economia circolare.

#### 4.7 Valorizzazione della biomassa microalgale mediante digestione anaerobica (test BMP)

La biomassa microalgale prodotta mediante coltivazione su reflui, oltre ad avere un effetto fitodepurativo e ad accumulare prodotti secondari ad alto valore aggiunto, può essere utilizzata come substrato per la produzione di energia rinnovabile, come biodiesel, biogas e bioidrogeno [244]. Anche se l'applicazione principale di *C. vulgaris* si è principalmente focalizzata nella produzione di oli per la produzione di biodiesel, dato l'elevato accumulo di lipidi riscontrato nella biomassa microalgale, la stessa biomassa può essere utilizzata per la produzione di biometano nei sistemi DA come co-substrato [245]. La problematica maggiore associata al trattamento in DA della biomassa microalgale è la parete cellulare, composta da cellulosa ed emicellulosa, che resiste all'idrolisi e, quindi, non permette la degradazione delle componenti cellulari (proteine, amido e lipidi) [245]. Attualmente, i test di BMP sulla biomassa microalgale sono ancora in fase esplorativa e sono focalizzati principalmente sulla valutazione dei pretrattamenti necessari alla

degradazione della biomassa o sulla valutazione del suo trattamento come co-substrato. Infatti, la biomassa microalgale è costituita da una percentuale considerevole di proteine che sbilancia il rapporto C/N, allontanandolo dai valori ottimali per i metanigeni dei sistemi DA, che risultano così inibiti. Per questo, una possibile soluzione per un trattamento di DA della biomassa microalgale efficiente consiste nell'applicazione della biomassa come co-substrato insieme ad altri reflui agro-industriali, ricchi di carbonio, che riportano il rapporto C/N a valori ideali per l'attività dei metanigeni (da 20:1 a 30:1) [246]. Un'altra soluzione per aumentare il potenziale di biometanazione della biomassa microalgale consiste nell'applicazione di pretrattamenti volti alla rottura della parete cellulare per liberare i composti cellulari e renderli disponibili alla degradazione nel sistema di DA [247,248]. Non è possibile invece utilizzare le rimanenze cellulari provenienti dall'estrazione chimica con i solventi (metanolo cloroformio 1:2 v/v), come dimostrato da Zhao et al. [247]. Infatti, i test di BMP svolti su questa matrice hanno evidenziato che la presenza di cloroformio nelle rimanenze cellulari anche a basse concentrazioni inibisce sia i metanogeni acetoclastici che gli idrogenotrofi e quindi entrambi i *pathway* metanogenetici (da H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> e da acetato). Sulla base dei dati bibliografici, le rimanenze cellulari ottenute durante le estrazioni con chimica classica dei lipidi (metanolo e cloroformio 1:2 v/v) non sono state utilizzate nei test di biometanazione della biomassa microalgale, che sono invece stati condotti per le seguenti condizioni: a) biomassa microalgale liofilizzata (BL) e b) biomassa microalgale post congelamento (BU), applicando lo stesso rapporto S/I di 0.35 segnalato da Alzate et al. [249] per i test BMP sulla biomassa microalgale (Figura 31 e 32).



a)

b)

**Figura 31:** a) PL, BU e WAS utilizzati per il test BMP; b) BU e BL utilizzate come substrato per i test BMP.



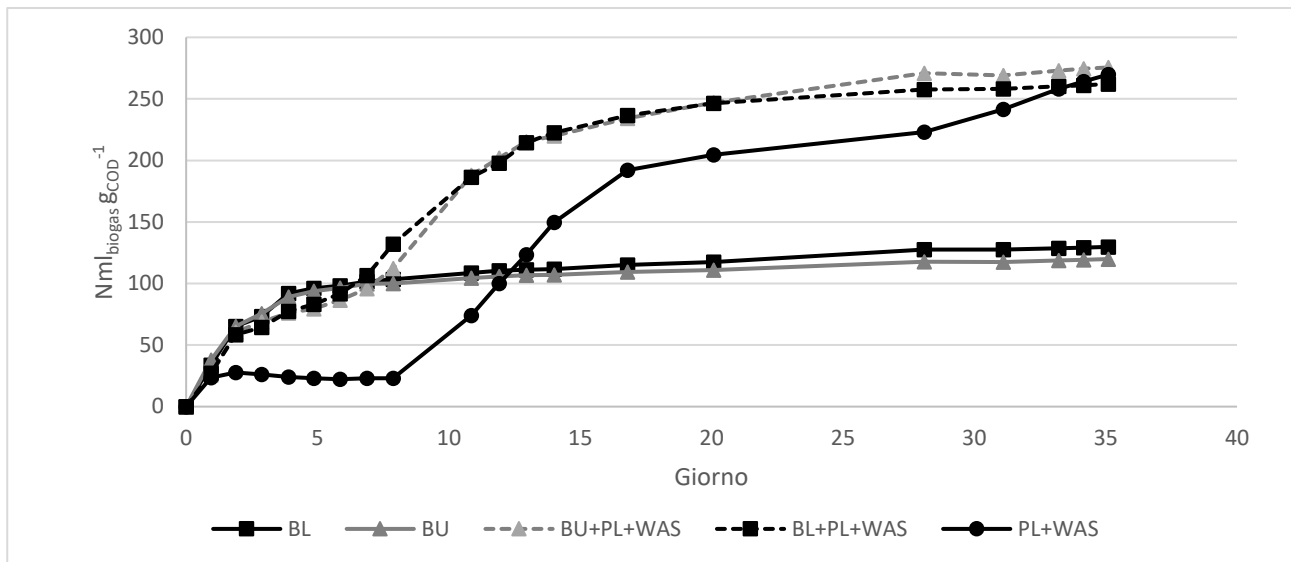
**Figura 32:** Test BMP per la biomassa di *C. vulgaris*: biomassa liofilizzata (BL), biomassa post congelamento (BU), biomassa liofilizzata + feccia rosa + fango attivo (BL+PL+WAS), biomassa post congelamento + feccia rosa + fango attivo (BU+PL+WAS), feccia rosa + fango attivo (PL+WAS) e condizioni di controllo (bianco).

Nella valutazione della produzione potenziale di biogas da biomassa microalgale, il parametro più importante risulta la determinazione del suo COD totale, analisi però soggetta ad errori e tipicamente con ampi valori di deviazione standard determinati dall'incompleta ossidazione della frazione solida o residui della biomassa [244]. Per questo motivo, la valutazione del COD totale della biomassa microalgale è stato stimato mediante il suo calcolo teorico (Equazione 12). L'uso di formule empiriche per stimare la conversione totale (stechiometrica) del carbonio in biogas risulta un metodo semplice ed efficiente partendo dall'ipotesi che tutte le componenti del substrato siano degradabili in toto e vengano convertite in biogas [244]. Il calcolo teorico del COD ( $COD_{th}$ ) si basa sulla formula empirica della biomassa di *C. vulgaris*,  $C_9H_{15}NO_2$  [244], portando ad ottenere che il suo  $COD_{th}$  risulta di  $2.42 \text{ mgO}_2 \text{ g}_{vs}^{-1}$  applicando l'equazione di Symons e Buswell [250] (Equazione 12).

$$COD_{th} = \frac{1000}{4} \left( \frac{4a+b-2c}{12a+b+16c} \right) * PM_{O_2} \quad (12)$$

Dove  $a$ ,  $b$  e  $c$  rappresentano il quantitativo di atomi di carbonio, idrogeno e ossigeno, rispettivamente, determinati dalla formula empirica della composizione di *C. vulgaris*. Questa formula è stata utilizzata per calcolare l'SGP teorico ( $SGP_{th}$ ) in base alla conversione per cui da  $1 \text{ g}_{COD}$  può essere prodotto al massimo  $0.35 \text{ l}$  di metano [29].

L'andamento dell'SGP nelle diverse condizioni testate è riportato in Figura 33.



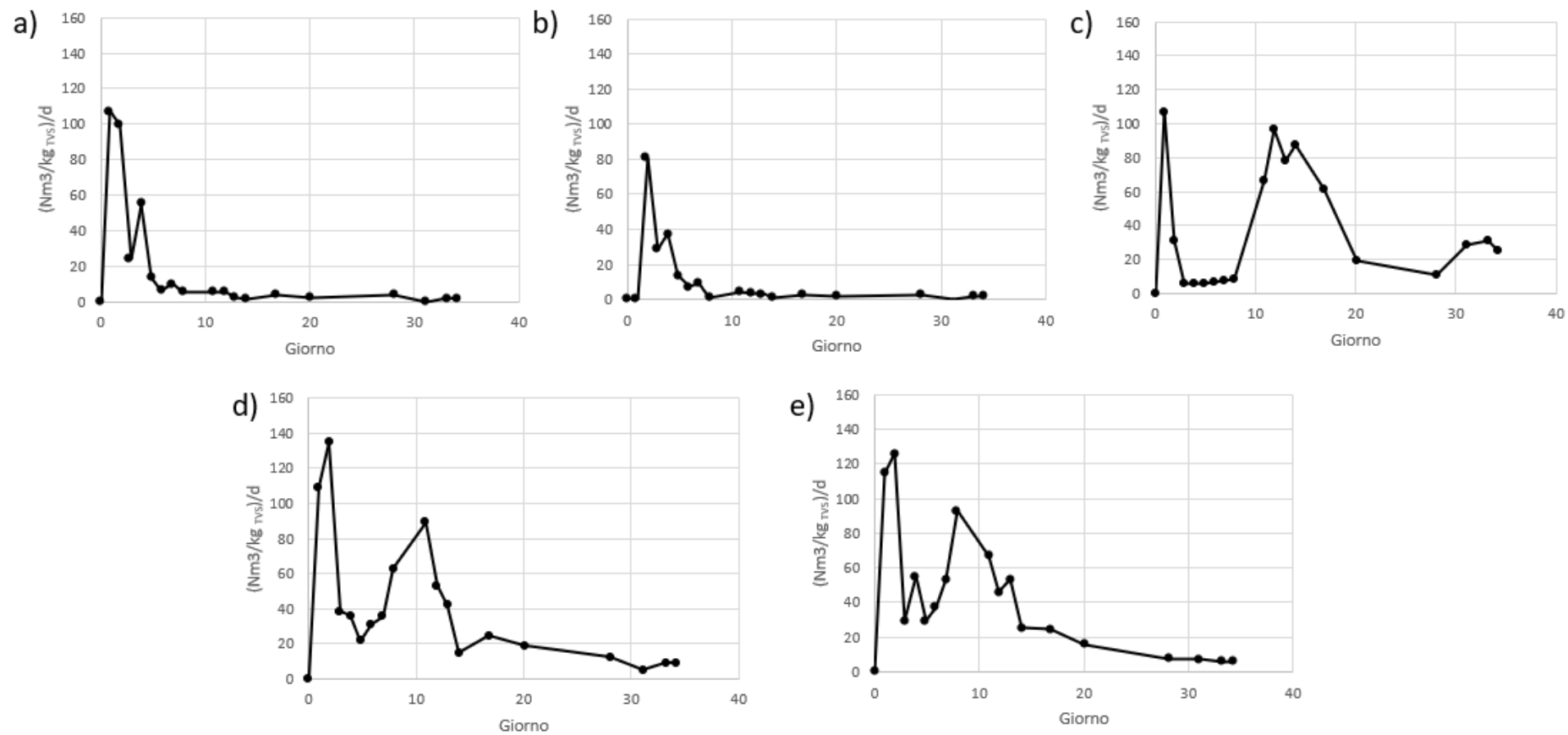
**Figura 33:** Produzione specifica di biogas (SGP) ( $Nl_{biogas} g_{COD}^{-1}$ ) per la degradazione della biomassa liofilizzata (BL), biomassa umida (BU), BL + feccia rosa + fango attivo (BL+PL+WAS), BU + feccia rosa + fango attivo (BU+PL+WAS) e feccia rosa + fango attivo (PL+WAS).

I dati di SGP ottenuti durante il test di biometanazione identificano una riduzione della fase lag nella produzione di biogas evidente nel test PL-WAS e associata alla presenza di feccia di vinificazione. La fase lag prolungata in presenza di PL e WAS come co-substrati può essere associata alla presenza di composti a lenta degradazione nella feccia di vinificazione, quali lignina e polifenoli e dei fanghi (poco biodegradabili). Un andamento similare è stato riportato anche da Montalvo et al. [28] e Da Ros et al. [29] che sottolineano la necessità di co-digestione per il trattamento di questo rifiuto agricolo. La produzione di biogas associata alla degradazione microalgale BL e BU risulta legata alla parziale degradazione cellulare della biomassa, ma non completa, che ha liberato i composti intracellulari rendendoli liberi e disponibili per la degradazione biologica [251]. L'applicazione di biomassa microalgale pretrattata permette la liberazione di lipidi e proteine, con conseguenti degli effetti sul sistema di digestione anaerobica che necessitano di approfondimenti. Se da una parte l'abbondanza di lipidi influenzerebbe positivamente l'SGP, l'alta percentuale di proteine comporterebbe, durante la loro degradazione, un aumento della concentrazione di ammonio in soluzione, con potenziale effetto inibitorio sui metanigeni ( questo a concentrazioni comprese tra  $1500 mg l^{-1}$  e  $3000 mg l^{-1}$  [252]).

L'attività di degradazione nel test BMP riportata in Figura 34, identifica una variazione nell'attività degradativa nei confronti della biomassa liofilizzata ed umida (Figura 34 a, b), dove il pretrattamento di liofilizzazione della biomassa incrementa l'attività di degradazione del sistema sintrofico DA. I picchi di attività a tempi diversi sono associati a composti con tempi di degradazione differente, dove la liofilizzazione mostra una liberazione di composti facilmente idrolizzabili maggiore rispetto al trattamento di solo congelamento. Mentre per la degradazione di PL e WAS (Figura 34 c) si possono identificare due picchi degradativi che sono associati alla degradazione a tempi differenti di composti organici presenti nel



substrato. L'applicazione di BU e BL uniti a PL e WAS come substrato per il sistema DA (Figura 34 d, e) mostra un'attività intermedia tra le condizioni in presenza di BL, BU e PL + WAS (Figura 34 a, b, e c).



**Figura 34:** Confronto attività ( $Nm^3 kg_{VS}^{-1} d^{-1}$ ) del sistema DA nel test di BMP per la degradazione di a) biomassa microalgale liofilizzata (BL), b) biomassa microalgale umida (BU), c) feccia rosa e WAS (PL+WAS), d) BU + PL + WAS, e) BL + PL + WAS.

In Tabella 20 sono riportate le costanti di idrolisi ( $K_{idrolisi}$ ), SMP, SGP, rimozione di VS (%) e biodegradabilità dei differenti substrati nel test BMP. La biodegradabilità dei substrati è stata quantificata seguendo l'equazione 13, come riportata da Da Ros et al. [29].

$$Biodegradabilità = \frac{BMP_{misurato}}{(0.35 * COD_{fed})} \quad (13)$$

**Tabella 20:** Costanti di idrolisi ( $K_{idrolisi}$ ), SGP teorico e sperimentale ( $SGP_{th}$  e  $SGP_{exp}$ ), rimozione VS (%), e biodegradabilità per i vari substrati testati nel test BMP: biomassa liofilizzata (BL), biomassa umida (BU), BU + feccia rosa + fango attivo (BU+PL+WAS), BL + feccia rosa + fango attivo (BL+PL+WAS) e feccia rosa + fango attivo (PL+WAS).

	SMP	SGP			
	( $ICH_4 \text{ gCOD}_{fed}^{-1}$ )	( $NI \text{ biogas gCOD}_{fed}^{-1}$ )	Biodegradabilità	% Rimozione VS	$K_{idrolisi} (d^{-1})$
BL	0.03	0.13	0.08	32.71	0.29
BU	0.01	0.12	0.04	34.79	0.17
BL+F+F	0.15	0.32	0.42	37.04	0.51
BU+F+F	0.12	0.34	0.36	35.24	0.32
F+F	0.16	0.32	0.45	44.49	0.38

I dati di SMP e SGP indicano che la produzione di biogas e metano risulta strettamente associata alla feccia di vinificazione più che alla biomassa microalgale BL e BU, indentificando però che il trattamento di liofilizzazione aumenta la degradabilità della biomassa nei sistemi DA. Per quanto riguarda la  $K_{idrolisi}$ , il valore maggiore ottenuto risulta dall'applicazione di BL in co-digestione con PL e WAS. Le  $K_{idrolisi}$  ottenute per il trattamento della biomassa tramite liofilizzazione risultano in linea con il valore identificato da Liu et al. [252] che riporta la  $K_{idrolisi}$  di  $0.258 \text{ d}^{-1}$  per la biomassa microalgale. Rispetto a Da Ros et al. [29] per i test BMP su feccia in co-digestione identifica una costante di idrolisi di  $0.326 \text{ d}^{-1}$ , confrontabile con il dato ottenuto in questa sperimentazione. Dalla rimozione percentuale di VS e dall'indice di biodegradabilità si identifica che la liofilizzazione ha un effetto di pretrattamento leggermente maggiore rispetto al solo congelamento. Le condizioni BU+PL+WAS e BL+PL+WAS mostrano lo stesso trend di produzione e valori finali, simili alla condizione PL+WAS per l'SGP e rimozione VS, indicando come il contributo delle microalghe si equivalente a quello del fango e feccia. Nella valutazione del trattamento di DA per la biomassa microalgale vi è la difficoltà di confronto dei dati sperimentali ottenuti poiché, oltre a differenze di parametri operativi della sperimentazione, vi è una differenza significativa nella composizione microalgale che influenza la produzione di biogas. In generale, la produzione di biogas da biomassa microalgale risulta compresa tra  $287\text{-}587 \text{ ml g}_{vs}^{-1}$  [253], range nel quale i dati ottenuti risultano compresi ( $388.32 \text{ ml g}_{vs}^{-1}$  e

333.51 ml  $g_{VS}^{-1}$  per BL e BU rispettivamente) anche se la biomassa microalgale non ha subito danni consistenti alla membrana cellulare.

La composizione del biogas ottenuto dal trattamento dei vari substrati ha mostrato una composizione in metano del 28.71 %, 14.29 %, 52.61 %, 63.96 % e 50.16 % nelle condizioni sperimentali BL, BU, BU + PL + WAS, BL + PL + WAS e PL + WAS rispettivamente. La presenza di BL porta ad una composizione in metano maggiore nel biogas ottenuto rispetto alla condizione con BU e la co-digestione di BL+PL+WAS mostra valori tipici di produzione di biometano come identificato dal trattamento di biomasse microalgali in co-digestione con reflui agricoli che incrementano la digeribilità e produzione di  $CH_4$  [246].

L'applicazione della biomassa microalgale nei sistemi DA deve considerare il destino finale della biomassa stessa; come sottolineato da Zhao et al. [247] l'applicazione di cellule intere come *feed* per i sistemi DA potrebbe aprire nuove opportunità per l'applicazione di microalghe in ottica di economia circolare, in quanto tipicamente le biomasse microalgali coltivate in sistemi a vasca aperta per il trattamento dei reflui non hanno mostrato composizioni interessanti per applicazioni come il biodiesel. D'altro canto, anche gli scarti cellulari possono essere utilizzati come substrato per i sistemi DA, dove è stato stimato che il 35-73% dei rifiuti prodotti dalla bioraffineria microalgale sarà composto proprio da rimanenze cellulari e scarti organici di composti non recuperabili. Ciò porta a concludere che l'applicazione come co-substrato vada presa in considerazione caso per caso in dipendenza dalla possibilità di recuperare prodotti secondari ad alto valore aggiunto o meno.

Al termine del test di biometanazione è stata effettuata la caratterizzazione del digestato uscente (Tabella 21). Le analisi hanno sottolineato che l'ammonio presente al termine del test è principalmente fornito dall'inoculo mentre la presenza di PL e WAS influenza la presenza di  $VFA_{tot}$ , che risultano composti principalmente da acido eptanoico e acido valerico. L'acido eptanoico e l'acido valerico sono a catena lunga e ramificata, rispettivamente, comportando una lenta/difficile degradazione nel sistema DA, portando a concludere che la digestione per questi substrati non è risultata completa. Contrariamente, la concentrazione di VFA in uscita dal sistema DA a lungo termine della feccia di vinificazione e WAS risultata esigua ( $< 100 \text{ mg}_{COD} \text{ l}^{-1}$ ), come riportato da Da Ros et al. [29]. Questa differenza in concentrazione può essere associata alla tipologia di inoculo applicato per il test BMP, che non è stato acclimatato al trattamento della feccia di vinificazione. La concentrazione di ammonio misurata al termine del test BMP per il trattamento della biomassa microalgale sembrerebbe maggiormente correlata all'inoculo, invece che alla degradazione della frazione proteica microalgale, identificando che la liofilizzazione ed il congelamento non hanno permesso la rottura della parete cellulare mantenendo isolata la frazione proteica dalla degradazione [139]. Questo effetto potrebbe essere favorevole al sistema DA, in quanto se tutta la biomassa fosse disponibile alla degradazione, ipotizzando una percentuale proteica totale del 60%, la produzione di ammonio sarebbe superiore a  $7 \text{ g l}^{-1}$  e vi sarebbe accumulo di VFA, portando all'inibizione dei metanigeni acetoclasti la cui tolleranza all'ammonio è compresa tra  $1.7 \text{ g l}^{-1}$  e  $14 \text{ g l}^{-1}$  [248].

**Tabella 21:** Caratterizzazione effluente al termine del test BMP per i differenti substrati: biomassa liofilizzata (BL), biomassa umida (BM), BL + feccia rosa + fango attivo (BL+PL+WAS), BU + feccia rosa + fango attivo (BU+PL+WAS) e feccia rosa + fango attivo (PL+WAS).

	TS (g <sub>TS</sub> kg <sup>-1</sup> )	TVS (g <sub>TVS</sub> kg <sup>-1</sup> )	VFA <sub>tot</sub> (g l <sup>-1</sup> )	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (g l <sup>-1</sup> )	PO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (g l <sup>-1</sup> )
Bianco	29.00 ± 0.01	15.15 ± 0.92	0.00 ± 0.00	1.28 ± 0.04	0.31 ± 0.06
BL	34.49 ± 0.06	19.61 ± 0.42	0.00 ± 0.00	1.28 ± 0.04	0.31 ± 0.06
BU	32.69 ± 0.35	19.00 ± 0.35	0.00 ± 0.00	1.18 ± 0.40	0.08 ± 0.00
BU+PL+WAS	35.86 ± 0.02	18.82 ± 0.04	0.64 ± 0.51	1.50 ± 0.16	0.09 ± 0.06
BL+PL+WAS	36.59 ± 0.35	18.30 ± 0.29	0.64 ± 0.19	1.42 ± 0.06	0.12 ± 0.01
PL+WAS	37.94 ± 0.30	18.27 ± 0.09	1.83 ± 0.36	1.38 ± 0.01	0.04 ± 0.00

Generalmente, l'ottimizzazione dell'applicazione della biomassa microalgale prevede l'estrazione di molecole ad alto valore aggiunto nei processi di bioraffineria e la successiva valorizzazione delle rimanenze cellulari ottenute dal processo; per cui i sistemi DA possono costituire una soluzione per la valorizzazione di questi residui chiudendo così il ciclo di trattamento dei reflui vinicoli.

## 5 Conclusioni

Lo studio e l'applicazione delle fecce di vinificazione in ottica di economia circolare risulta ad oggi un'applicazione innovativa del rifiuto vitivinicolo; la scarsità di pubblicazioni e studi completi riguardanti l'applicazione della feccia vinicola come substrato per i trattamenti biologici, ha posto questo studio come primo e completo nella valutazione dell'applicabilità delle fecce in sistemi di trattamento DA e successivamente per la produzione di biomassa microalgale in fotobioreattori. I risultati ottenuti portano a concludere che:

- L'applicazione di diverse fecce di vinificazione in digestione anaerobica ha evidenziato una stabilità prolungata con uso di feccia bianca, raggiungendo valori di SGP di  $0,23 \text{ m}^3 \text{ kg}_{\text{VS}}^{-1}$  e applicando elevati carichi organici (circa  $5 \text{ OLR kg}_{\text{COD}} \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ ). Il passaggio a feccia rossa (e poi a feccia rosa) ha determinato un evidente calo nella produzione iniziale di gas legato al cambio di composizione della matrice;
- L'accoppiamento dei sistemi DA-microalghe in semicontinuo per il trattamento del digestato ha dimostrato produzioni stabili di biomassa e di contenuto di lipidi con HRT superiori a 20 giorni (senza ricircolo). La caratterizzazione dei lipidi ha permesso di confermarne la valorizzazione per la produzione di biodiesel data la bassissima percentuale di acido linolenico ( $<12 \text{ \%w/w}$ ). L'effluente dal PBR necessita di ulteriori trattamenti per il rilascio ambientale (D- Lgs 156/06) ma la rimozione di azoto ammoniacale osservata permette di ridurre il carico azotato nel flusso di digestato liquido in testa agli impianti di depurazione, abbattendo i costi di trattamento;
- L'applicazione della feccia di vinificazione come substrato diretto per le coltivazioni microalgali risulta applicabile previ pretrattamenti meccanici. La presenza di lieviti nativi della feccia ha permesso l'identificazione di un consorzio microalghe-lieviti (*Candida* sp.) a diluizioni minori (test batch 1:2), che ha però dimostrato un promettente effetto depurativo sulla feccia di vinificazione;
- I test BMP della biomassa di *C. vulgaris* post-liofilizzazione e post-congelamento hanno identificato una maggiore degradabilità della biomassa liofilizzata; i test svolti in co-digestione con la feccia di vinificazione e fango secondario hanno evidenziato che l'applicazione della biomassa microalgale influenza positivamente la riduzione della fase lag di produzione di biogas.

Data la particolarità del panorama italiano della produzione vitivinicola, composta principalmente da piccole aziende familiari e consorzi, l'applicazione di un sistema DA-microalghe potrebbe trovare applicazione all'interno dei consorzi per il trattamento di uve terze, in quanto presentano nella loro struttura dei piccoli impianti *in loco* per il trattamento delle acque reflue. L'implementazione dell'impianto con colture microalgali potrebbe chiudere il *loop* di trattamento applicando così il concetto di economia circolare. I risultati ottenuti, seppur promettenti, sottolineano la necessità di ottimizzazione dei sistemi di trattamento della feccia di vinificazione con sistemi accoppiati DA-microalgale o direttamente per la coltura microalgale/microalghe-lieviti. Le future sperimentazioni dovranno volgersi nell'attuazione di sistemi di trattamento in continuo.

## 5.1 Pubblicazioni e partecipazioni a congresso

Lo studio svolto è stato presentato a congressi internazionali e nazionali:

- Cavinato C., Scarponi P., Battista F., Frison N., Bolzonella D. Preliminary evaluation of *S. obliquus* and *C. vulgaris* growth on winery waste digestate in an integrated anaerobic digestion-microalgae approach. WA World conference on Anaerobic Digestion, Delft (Netherland), 23-27 June 2019.
- Scarponi P., Amadio E., Perosa A., Cavinato C. *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* growth on OFMSW digestate. IWA Conference on Algal Technologies and Stabilization Pond for Wastewater treatment and Resource Recovery, Valladolid (Spain), 1-2 July 2019.
- Scarponi P., Scattolini F., Selva M., Perosa A., Cavinato C. *Chlorella vulgaris* batch growth on anaerobic digestion effluent. Congresso AISAM (Associazione Italiana per lo studio e le applicazioni delle microalghe), Padova (Italia), 19-21 April 2020.
- Scarponi P., Izzo F.C., Cavinato C. Testing *Chlorella vulgaris* strain adapted to winery waste digestate in lab scale semi-continuous system. 8<sup>th</sup> International Conference on Sustainable Solid Waste Management, Thessaloniki (Greece), 23-26 June 2021.
- Scarponi P., Bravi M., Izzo F., Cavinato C. Wine lee as new substrate for microalgae cultivation. II Workshop Giovani AISAM, Rome (Italy), 24 September 2021.

Il lavoro svolto ha inoltre portato alla pubblicazione su riviste internazionali *peer reviewed*:

- Scarponi P., Bonetto A., Bolzonella D., Astals S., Cavinato C. Anaerobic Co-Digestion effluent as substrate for *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* cultivation. *Energies*, 13 (18), 4880. 2020. doi:10.3390/en13184880.
- Scarponi P., Volpi Ghirardini A.M., Bravi M., Cavinato C. Evaluation of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* growth on pretreated organic solid waste digestate. *Waste Management*, 119, 235-241. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.047>
- Scarponi P., Izzo F.C., Bravi M., Cavinato C. *C. vulgaris* growth batch tests using winery digestate as promising raw material for biodiesel and stearin production. *Waste Management*, 136, 266-272. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.10.014>

## 6 Bibliografia

- [1] Chuka-ogwude D, Ogbonna J, Moheimani NR. A review on microalgal culture to treat anaerobic digestate food waste effluent. *Algal Res* 2020;47:101841. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101841>.
- [2] Lucas MS, Peres JA, Li Puma G. Treatment of winery wastewater by ozone- based advanced oxidation processes (O<sub>3</sub>,O<sub>3</sub>/UV and O<sub>3</sub>/UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in a pilot- scale bubble column reactor and process economics. *Sep Purif Technol* 2010;72:235–41.
- [3] Pérez-Bibbins B, Torrado-Agrasar A, Salgado JM, Oliveira RP de S, Domínguez JM. Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview. *Waste Manag* 2015;40:72–81. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.03.009>.
- [4] Novello V. Filiera vitivinicola : valorizzare residui e sottoprodotti. Aumentare la sostenibilità economica ed ambientale. *Viticoltura* 2015:61–4.
- [5] Pérez-Serradilla JA, de Castro MDL. Role of lees in wine production: A review. *Food Chem* 2008;111:447–56. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.019>.
- [6] Da Ros C, Cavinato C, Pavan P, Bolzonella D. Mesophilic and thermophilic anaerobic co-digestion of winery wastewater sludge and wine lees: An integrated approach for sustainable wine production. *J Environ Manage* 2017;203:745–52. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.03.029>.
- [7] Mateo JJ, Maicas S. Valorization of winery and oil mill wastes by microbial technologies. *Food Res Int* 2015;73:13–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.007>.
- [8] Cortés A, Moreira MT, Feijoo G. Integrated evaluation of wine lees valorization to produce value-added products. *Waste Manag* 2019;95:70–7. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.05.056>.
- [9] Ioannidou SM, Pateraki C, Ladakis D, Papapostolou H, Tsakona M, Vlysidis A, et al. Sustainable production of bio-based chemicals and polymers via integrated biomass refining and bioprocessing in a circular bioeconomy context. *Bioresour Technol* 2020;307:123093. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123093>.
- [10] Ioannou LA, Puma GL, Fatta-Kassinos D. Treatment of winery wastewater by physicochemical, biological and advanced processes: A review. *J Hazard Mater* 2015;286:343–68. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.043>.
- [11] Christ KL, Burritt RL. Critical environmental concerns in wine production: An integrative review. *J Clean Prod* 2013;53:232–42. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.04.007>.
- [12] Gouveia C, Liberato MLR, DaCamara CC, Trigo RM, A.Ramos M. Modelling past and future wine production in the Portuguese Douro Valley. *Clim Res* 2011;48:349–62.



<https://doi.org/10.3354/cr01006>.

- [13] Calicchio Berardi P, Dias JM. How Has the Wine Sector Incorporated the Premises of Circular Economy? *J Environ Sci Eng B* 2019;8:108–17. <https://doi.org/10.17265/2162-5263/2019.03.004>.
- [14] Corbo C, Lamastra L, Capri E. From environmental to sustainability programs: A review of sustainability initiatives in the Italian wine sector. *Sustain* 2014;6:2133–59. <https://doi.org/10.3390/su6042133>.
- [15] Bonari E, Ercoli L, Silvestri N, Carcea G, Barresi F. Linee guida per l'utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e delle acque reflue da aziende agroalimentari. 2007.
- [16] ISTAT. Statistiche on line: settore agricoltura. Vari anni. <Http://WwwIstatIt/> n.d.
- [17] Oliveira M, Duarte E. Integrated approach to winery waste: waste generation and data consolidation. *Front Environ Sci Eng* 2016;10:168–76. <https://doi.org/10.1007/s11783-014-0693-6>.
- [18] D. Lsg 479/2008. Disposizioni di attuazione dei regolamenti CE) n. 479/2008 del Consiglio e (CE) n.555/2008 della Commissione per quanto riguarda l'applicazione della misura della distillazione dei sottoprodotti della vinificazione. n.d.
- [19] Ministero delle polite agricole alimentari e Forestali. Testo unico della vite e del vino. Legge 238 del 12/12/2016. 2016.
- [20] Federici F, Fava F, Kalogerakis N, Mantzavinos D. Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste: Concept, opportunities and the case of olive mill waste waters. *J Chem Technol Biotechnol* 2009;84:895–900. <https://doi.org/10.1002/jctb.2165>.
- [21] Bustamante MA, Paredes C, Moral R, Moreno-Caselles J, Pérez-Murcia MD, Pérez-Espinosa A, et al. Co-composting of distillery and winery wastes with sewage sludge. *Water Sci Technol* 2007;56:187–92. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.488>.
- [22] Zhang Q, Hu J, Lee DJ. Biogas from anaerobic digestion processes: Research updates. *Renew Energy* 2016;98:108–19. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.029>.
- [23] Wang P, Wang H, Qiu Y, Ren L, Jiang B. Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production—A review. *Bioresour Technol* 2018;248:29–36. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.152>.
- [24] Alliance GI. How to Profit from Biogas Market Developments GIA Industries White Paper. United States 2010.
- [25] Beck C, Prades G, Sadowski AG. Activated sludge wastewater treatment plants optimisation to face pollution overloads during grape harvest periods. *Water Sci Technol* 2005;51:81–8.

- [26] Andreottola G, Foladori P, Ziglio G. Biological treatment of winery wastewater: An overview. *Water Sci Technol* 2009;60:1117–25. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.551>.
- [27] Petruccioli M, Duarte JC, Federici F. High-rate aerobic treatment of winery wastewater using bioreactors with free and immobilized activated sludge. *J Biosci Bioeng* 2000;90:381–6. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80005-0](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80005-0).
- [28] Montalvo S, Martinez J, Castillo A, Huiliñir C, Borja R, García V, et al. Sustainable energy for a winery through biogas production and its utilization: A Chilean case study. *Sustain Energy Technol Assessments* 2020;37:100640. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2020.100640>.
- [29] Da Ros C, Cavinato C, Bolzonella D, Pavan P. Renewable energy from thermophilic anaerobic digestion of winery residue: Preliminary evidence from batch and continuous lab-scale trials. *Biomass and Bioenergy* 2016;91:150–9. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.017>.
- [30] Daffonchio D, Colombo M, Origgi G, Sorlini C, Andreoni V. Anaerobic digestion of winery wastewaters derived from different wine making processes. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng* 1998;33:1753–70. <https://doi.org/10.1080/10934529809376816>.
- [31] Hungría J, Siles JA, Chica AF, Gil A, Martín MA. Anaerobic co-digestion of winery waste: comparative assessment of grape marc waste and lees derived from organic crops. *Environ Technol (United Kingdom)* 2020;0:1–9. <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1737735>.
- [32] Da Ros C, Cavinato C, Pavan P, Bolzonella D. Winery waste recycling through anaerobic co-digestion with waste activated sludge. *Waste Manag* 2014;34:2028–35. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.07.017>.
- [33] Richmond A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. 2004. <https://doi.org/10.1002/9780470995280>.
- [34] Singh G, Patidar SK. Microalgae harvesting techniques: A review. *J Environ Manage* 2018;217:499–508. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>.
- [35] Sze P. *A Biology of the algae 3 rd ed.* . McGraw-Hill, Boston. 1998.
- [36] Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other application: A review. *Renew Sustain Energy Rev* 2010;14:217–32.
- [37] Safi C, Zebib B, Merah O, P.Y. P, Vaca-Garcia C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew Sustain Energy Rev* 2014;35:265–278.
- [38] Zahn J, Rong J, Wang Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *Int J Hydrog Energy* 2017;42:8505–8517.

- [39] Markou G, Vandamme D, Muylaert K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Res* 2014;45:186–202.
- [40] Perez-Garcia O, Escalante Froylan ME, de-Bashan Luz E, Y. B. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res* 2011;45:11–36.
- [41] Uggetti E, Sialve B, Latrille E, Steyer JP. Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture: The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresour Technol* 2014;152:437–43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.036>.
- [42] Liang Y, Sarkany N, Cui Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett* 2009;31:1043–9. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9975-7>.
- [43] Elser JJ. Phosphorus: a limiting nutrient for humanity? *Curr Opin Biotechnol* 2012;23:833–8.
- [44] Huang B, Hong H. Alkaline phosphatase activity and utilization of dissolved organic phosphorus by algae in subtropical coastal waters. *Mar Pollut Bull* 1999;39:205–11.
- [45] Carvalho AP, Meireles LA, Malcata FX. Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol Prog* 2006;22:1490–506. <https://doi.org/10.1021/bp060065r>.
- [46] Gonçalves AL, Pires JCM, Simões M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Res* 2017;24:403–15. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>.
- [47] Aslan S, Kapdan IK. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecol Eng* 2006;28:64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.04.003>.
- [48] Renuka N, Sood A, Ratha SK, Prasanna R, Ahluwalia AS. Evaluation of microalgal consortia for treatment of primary treated sewage effluent and biomass production. *J Appl Phycol* 2013;25:1529–37. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9982-x>.
- [49] Boonma S, Chaiklangmuang S, Chaiwongsar S, Pekkoh J, Pumas C, Ungsethaphand T, et al. Enhanced Carbon Dioxide Fixation and Bio-oil Production of a Microalgal Consortium. *Clean - Soil, Air, Water* 2015;43:761–6. <https://doi.org/10.1002/clen.201400171>.
- [50] Xia A, Murphy JD. Microalgal Cultivation in Treating Liquid Digestate from Biogas Systems. *Trends Biotechnol* 2016;34:264–75. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.12.010>.
- [51] De la Rubia MÁ, Walker M, Heaven S, Banks CJ, Borja R. Preliminary trials of in situ ammonia stripping from source segregated domestic food waste digestate using biogas: Effect of temperature and flow rate. *Bioresour Technol* 2010;101:9486–92. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.096>.
- [52] Yang L, Tan X, Li D, Chu H, Zhou X, Zhang Y, et al. Nutrient removal and lipids production by *Chlorella pyrenoidosa* cultivation using anaerobic digested starch wastewater and alcohol wastewater.

Bioresour Technol 2015;181:54–61.

- [53] Tan X, Chu H, Zhang Y, Yang L, Zhao F, Zhou X. *Chlorella pyrenoidosa* cultivation using anaerobic digested starch processing wastewater in an airlift circulation photobioreactor. *Bioresour Technol* 2014;170:538–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.07.086>.
- [54] Cheng J, Ye Q, Yang Z, Zhou J, Cen K. Improving pollutants removal by microalgae *Chlorella* PY-ZU1 with 15% CO<sub>2</sub> from undiluted anaerobic digestion effluent of food wastes with ozonation pretreatment. *Bioresour Technol* 2016;216:273–9.
- [55] Wang L, Wang Y, Chen P, Ruan R. Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* for treating undigested and digested dairy manures. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;162:2324–32. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9005-1>.
- [56] Åkerström AM, Mortensen LM, Rusten B, Gislerød HR. Biomassa production and nutrient removal by *Chlorella* sp. as affected by sludge liquor concentration. *J Environ Manage* 2014;144:118–24.
- [57] Zhao Y, Sun S, Hu C, Zhang H, Xu J, Ping L. Performance of three microalgal strains in biogas slurry purification and biogas upgrade in response to various mixed light-emitting diode light wavelengths. *Bioresour Technol* 2015;187:338–45. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.130>.
- [58] Sayedin F, Kermanshahi-pour A, He QS, Tibbetts SM, Lalonde CGE, Brar SK. Microalgae cultivation in thin stillage anaerobic digestate for nutrient recovery and bioproduct production. *Algal Res* 2020;47:101867. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101867>.
- [59] Boussiba S, Gibson J. Ammonia translocation in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1991;88:1–14. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(91\)90692-4](https://doi.org/10.1016/0378-1097(91)90692-4).
- [60] Drath M, Kloft N, Batschauer A, Marin K, Novak J, Forchhammer K. Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol* 2008;147:206–15. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117218>.
- [61] Crofts AR. Uptake of ammonium ion by chloroplasts, and the mechanism of amine uncoupling. *Biochem Biophys Res Commun* 1966;24:127–34. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(66\)90420-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(66)90420-7).
- [62] Glibert PM, Wilkerson FP, Dugdale RC, Raven JA, Dupont CL, Leavitt PR, et al. Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions. *Limnol Oceanogr* 2016;61:165–97. <https://doi.org/10.1002/lno.10203>.
- [63] Debowski M, Rusanowska P, Zielinski M, Dudek M, Romanowska-Duda Z. Biomass Production and Nutrient Removal by *Chlorella vulgaris* from Anaerobic Digestion Effluents. *Energies* 2018;11:1654. <https://doi.org/10.3390/en11071654>.

- [64] Abu Hajar HA, Guy Riefler R, Stuart BJ. Anaerobic digestate as a nutrient medium for the growth of the green microalga *Neochloris oleoabundans*. *Environ Eng Res* 2016;21:265–75. <https://doi.org/10.4491/eer.2016.005>.
- [65] Uggetti E, Sialve B, Latrille E, Steyer J. Anaerobic digestate as substrate for microalgae culture : The role of ammonium concentration on the microalgae productivity. *Bioresour Technol* 2014;152:437–43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.036>.
- [66] Sutherland DL, Howard-Williams C, Turnbull MH, Broady PA, Craggs RJ. The effects of CO<sub>2</sub> addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. *Water Res* 2015;70:9–26. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.064>.
- [67] Lau PS, Tam NFY, Wong YS. Wastewater nutrients removal by *Chlorella vulgaris*: Optimization through acclimation. *Environ Technol (United Kingdom)* 1996;17:183–9. <https://doi.org/10.1080/09593331708616375>.
- [68] Li SP, Li JT, Kuang JL, Duan HN, Zeng Y, Shu WS. Effects of species richness on cadmium removal efficiencies of algal microcosms. *J Appl Ecol* 2012;49:261–7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2011.02091.x>.
- [69] Su Y, Mennerich A, Urban B. Coupled nutrient removal and biomass production with mixed algal culture: Impact of biotic and abiotic factors. *Bioresour Technol* 2012;118:469–76. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.093>.
- [70] Falkowski PG, Gan R, Wyman K. Growth-irradiance relationships in phytoplankton. *Limnol Ocean* 1985;30:311–21.
- [71] Sharma R. Effects of Culture Conditions on Growth and Biochemical Profile of *Chlorella Vulgaris*. *J Plant Pathol Microbiol* 2012;03. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000131>.
- [72] Stephenson AL, Dennis JS, Howe CJ, Scott SA, Smith AG. Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels* 2010;1:47–58. <https://doi.org/10.4155/bfs.09.1>.
- [73] Vaičiulyte S, Padovani G, Kostkevičiene J, Carozzi P. Batch growth of *Chlorella vulgaris* CCALA 896 versus semi-continuous regimen for enhancing oil-rich biomass productivity. *Energies* 2014;7:3840–57. <https://doi.org/10.3390/en7063840>.
- [74] Perez-Garcia O, Bashan Y, Esther Puente M. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella Vulgaris*. *J Phycol* 2011;47:190–9. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00934.x>.
- [75] Baglieri A, Sidella S, Barone V, Fragalà F, Silkina A, Nègre M, et al. Cultivating *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* microalgae to degrade inorganic compounds and pesticides in water.

Environ Sci Pollut Res 2016;23:18165–74. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6996-3>.

- [76] Chia M a, Lombardi AT, Melão MDGG. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *An Acad Bras Cienc* 2013;85:1427–38. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201393312>.
- [77] Sharma J, Kumar V, Kumar SS, Malyan SK, Mathimani T, Bishnoi NR, et al. Microalgal consortia for municipal wastewater treatment – Lipid augmentation and fatty acid profiling for biodiesel production. *J Photochem Photobiol B Biol* 2020;202:111638. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111638>.
- [78] Osundeko O, Dean AP, Davies H, Pittman JK. Acclimation of microalgae to wastewater environments involves increased oxidative stress tolerance activity. *Plant Cell Physiol* 2014;55:1848–57. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu113>.
- [79] Ayre JM, Moheimani NR, Borowitzka MA. Growth of microalgae on undiluted anaerobic digestate of piggery effluent with high ammonium concentrations. *Algal Res* 2017;24:218–26. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.023>.
- [80] Iyovo Dr G, Du G, Chen J. Poultry manure digestate enhancement of *Chlorella vulgaris* biomass under mixotrophic condition for biofuel production. *J Microb Biochem Technol* 2010;2:51–7. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000023>.
- [81] Arias DM, Solé-bundó M, Garfí M, Ferrer I, García J, Uggetti E. Integrating microalgae tertiary treatment into activated sludge systems for energy and nutrients recovery from wastewater. *Bioresour Technol* 2018;247:513–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.123>.
- [82] Ledda C, Idà A, Allemand D, Mariani P, Adani F. Production of wild *Chlorella* sp . cultivated in digested and membrane-pretreated swine manure derived from a full-scale operation plant. *Algal Res* 2015;12:68–73. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.010>.
- [83] Marazzi F, Bellucci M, Fornaroli R, Bani A, Ficara E, Mezzanotte V. Lab-scale testing of operation parameters for algae based treatment of piggery wastewater. *J Chem Technol Biotechnol* 2020;95:967–74. <https://doi.org/10.1002/jctb.5972>.
- [84] Lai YC, Chang CH, Chen CY, Chang JS, Ng IS. Towards protein production and application by using *Chlorella* species as circular economy. *Bioresour Technol* 2019;289:121625. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121625>.
- [85] Murray A, Skene K, Haynes K. The Circular Economy: An Interdisciplinary Exploration of the Concept and Application in a Global Context. *J Bus Ethics* 2017;140:369–80. <https://doi.org/10.1007/s10551-015-2693-2>.
- [86] Korhonen J, Nuur C, Feldmann A, Birkie SE. Circular economy as an essentially contested concept. *J*

Clean Prod 2018;175:544–52. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.111>.

- [87] Porter ME, van der Linde C. Toward a new conception of the environment-competitiveness relationship. *J Econ Perspect* 1995;9:97–118.
- [88] What is the circular economy? Fonte: <https://www.ellenmacarthurfoundation.org/circular-economy/what-is-the-circular-economy>. Ellen MacArthur Found 2021.
- [89] McDonough W, Braungart M. *Cradle to Cradle: Remaking the Way We Make Things*. Berkeley, CA: North Point Press. 2010.
- [90] Stiles WAV, Styles D, Chapman SP, Esteves S, Bywater A, Melville L, et al. Using microalgae in the circular economy to valorise anaerobic digestate : challenges and opportunities. *Bioresour Technol* 2018;267:732–42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.100>.
- [91] Marcato CE, Pinelli E, Pouech P, Winterton P, Guisresse M. Particle size and metal distributions in anaerobically digested pig slurry. *Bioresour Technol* 2008;99:2340–8.
- [92] Sigurnjak I, Vaneeckhaute C, Michels E, Ryckaert B, Ghekiere G, Tack FMG, et al. Fertilizer performance of liquid fraction of digestate as synthetic nitrogen substitute in silage maize cultivation for three consecutive years. *Sci Total Environ* 2017;599:1885–1894.
- [93] Passanha P, Esteves SR, Kedia G, Dinsdale RM, Guwy AJ. Increasing polyhydroxyalkanoate (PHA) yields from *Cupriavidus necator* by using filtered digestate liquors. *Bioresour Technol* 2013;147:345–352.
- [94] Lora R, Maria A, Antune DS, Valéria F, Sánchez A, Barrena R, et al. Technology overview of biogas production in anaerobic digestion plants : A European evaluation of research and development. *Renew Sustain Energy Rev* 2017;80:44–53. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.079>.
- [95] Espinoza Pérez AT, Camargo M, Narváez Rincón PC, Alfaro Marchant M. Key challenges and requirements for sustainable and industrialized biorefinery supply chain design and management: A bibliographic analysis. *Renew Sustain Energy Rev* 2017;69:350–9. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.084>.
- [96] Chew KW, Yap JY, Show PL, Suan NH, Juan JC, Ling TC, et al. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresour Technol* 2017;229:53–62. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>.
- [97] Vanthoor-Koopmans M, Wijffels RH, Barbosa MJ, Eppink MHM. Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresour Technol* 2013;135:142–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.135>.
- [98] Salati S, D’Imporzano G, Menin B, Veronesi D, Scaglia B, Abbruscato P, et al. Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. *Bioresour Technol*

2017;230:82–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.030>.

- [99] Veronesi D, D'Imporzano G, Menin B, Salati S, Adani F. Organic wastes/by-products as alternative to CO<sub>2</sub> for producing mixotrophic microalgae enhancing lipid production. *Bioprocess Biosyst Eng* 2020;43:1911–9. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02381-x>.
- [100] Martin-Gordillo L, Cuaresma M, Fernández-Recamales MÁ, Sayago A, Vílchez C, Garbayo I. Cultivation of Microalgae *Chlorella* Using Wine Industry by-Products. *Proceedings* 2021;66:30. <https://doi.org/10.3390/proceedings2020066030>.
- [101] Tsolcha ON, Tekerlekopoulou AG, Akratos CS, Aggelis G, Genitsaris S, Moustaka-Gouni M, et al. Biotreatment of raisin and winery wastewaters and simultaneous biodiesel production using a *Leptolyngbya*-based microbial consortium. *J Clean Prod* 2017;148:185–93. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.026>.
- [102] APHA/AWWA/WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. vol. 22nd ed. 2012. [https://doi.org/ISBN 978-087553-013-0](https://doi.org/ISBN%20978-087553-013-0).
- [103] APAT-IRSA/CNR. *Metodologie analitiche per il controllo della qualità delle acque [Analytical methodologies for water quality management]*. Poligr e Zecca Dello Stato Roma, Ital 2003;29:575–81.
- [104] Atanassova M, Georgieva S, Ivancheva K. Total Phenolic and Total Flavonoid Contents , Antioxidant Capacity and Biological Contaminants in Medicinal Herbs. *J Univ Chem Technol Metall* 2011;46:81–8.
- [105] Dickinson KE, Bjornsson WJ, Garrison LL, Whitney CG, Park KC, Banskota AH, et al. Simultaneous remediation of nutrients from liquid anaerobic digestate and municipal wastewater by the microalga *Scenedesmus* sp . AMDD grown in continuous chemostats. *J Appl Microbiol* 2014;118:75–83. <https://doi.org/10.1111/jam.12681>.
- [106] Prajapati SK, Kaushik P, Malik A, Vijay VK. Phycoremediation and biogas potential of native algal isolates from soil and wastewater. *Bioresour Technol* 2013;135:232–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.069>.
- [107] Lichtenthaler HK, Buschmann C. Chlorophylls and Carotenoids Measurement and UV-VIS characterization Lichtenthaler 2001. *Curr Protoc Food Anal Chem* 2001;F4.3.1-F4.:1–8. <https://doi.org/10.1002/0471709085.ch21>.
- [108] Safafar H, Hass MZ, Møller P, Holdt SL, Jacobsen C. High-EPA biomass from *Nannochloropsis salina* cultivated in a flat-panel photo-bioreactor on a process water-enriched growth medium. *Mar Drugs* 2016;14. <https://doi.org/10.3390/md14080144>.
- [109] Janairo, Gerardo, Linley Sy, Marianne, Yap, Leonisa, Llanos-Lazaro, Nancy, Robles J. Determination



of the Sensitivity Range of Biuret Test for Undergraduate Bio...: Discovery Service for Universiti Tunku Abdul Rahman. *E-Journal Sci Technol* 2011;6:77–83.

- [110] Itzhaki RF, Gill DM. A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal Biochem* 1964;9:401–10. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(64\)90200-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(64)90200-3).
- [111] Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497–509. <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9570-9>.
- [112] Izzo FC, Zendri E, Bernardi A, Balliana E, Sgobbi M. The study of pitch via gas chromatography-mass spectrometry and Fourier-transformed infrared spectroscopy: the case of the Roman amphoras from Monte Poro, Calabria (Italy). *J Archaeol Sci* 2013;40:595–600. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jas.2012.06.017>.
- [113] Fuster-López L, Izzo FC, Piovesan M, Yusá-Marco DJ, Sperti L, Zendri E. Study of the chemical composition and the mechanical behaviour of 20th century commercial artists' oil paints containing manganese-based pigments. *Microchem J* 2016. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.08.023>.
- [114] Izzo FC, Ferriani B, Van den Berg KJ, Van Keulen H, Zendri E. 20th century artists' oil paints: the case of the Olli by Lucio Fontana. *J Cult Herit* 2014. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.culher.2013.11.003>.
- [115] Fuster-López L, Izzo FC, Damato V, Yusá-Marco DJ, Zendri E. An insight into the mechanical properties of selected commercial oil and alkyd paint films containing cobalt blue. *J Cult Herit* 2019;35:225–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.culher.2018.12.007>.
- [116] Caravá S, Roldán García C, Vázquez de Agredos-Pascual ML, Murcia Mascarós S, Izzo FC. Investigation of modern oil paints through a physico-chemical integrated approach. Emblematic cases from Valencia, Spain. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2020;240:118633. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118633>.
- [117] Izzo FC, Zanin C, van Keulen H, da Roit C. From pigments to paints: studying original materials from the atelier of the artist Mariano Fortuny y Madrazo. *Int J Conserv Sci* 2017;8:547–64.
- [118] Rigon C, Izzo FC, Vázquez De Ágredos Pascual ML, Campíns-Falcó P, Van Keulen H. New results in ancient Maya rituals researches: The study of human painted bones fragments from Calakmul archaeological site (Mexico). *J Archaeol Sci Reports* 2020;32:102418. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2020.102418>.
- [119] Di Caprio F, Scarponi P, Altimari P, Iaquaniello G, Pagnanelli F. The influence of phenols extracted from olive mill wastewater on the heterotrophic and mixotrophic growth of *Scenedesmus* sp. *J Chem Technol Biotechnol* 2018;93:3619–26. <https://doi.org/10.1002/jctb.5743>.

- [120] Cho S, Lee N, Park S, Yu J, Thao T, Oh Y, et al. Microalgae cultivation for bioenergy production using wastewaters from a municipal WWTP as nutritional sources. *Bioresour Technol* 2013;131:515–20. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.176>.
- [121] Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. Nile Red " A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets n.d.:965–73.
- [122] Angelidaki I, Alves M, Bolzonella D, Borzacconi L, Campos JL, Guwy AJ, et al. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays. *Water Sci Technol* 2009;59:927–34. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.040>.
- [123] Hafner S, Fruteau H, Koch K, Holliger C. Improving Inter-Laboratory Reproducibility in Measurement of Biochemical Methane Potential (BMP). *Water* 2020;12:1752. <https://doi.org/doi:10.3390/w12061752>.
- [124] Scarponi P, Ghirardini AMV, Bravi M, Cavinato C. Evaluation of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* growth on pretreated organic solid waste digestate. *Waste Manag* 2021;119:235–41. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.047>.
- [125] Wilson DC, Velis CA. Waste management - Still a global challenge in the 21st century: An evidence-based call for action. *Waste Manag Res* 2015;33:1049–51. <https://doi.org/10.1177/0734242X15616055>.
- [126] Tyagi VK, Fdez-Güelfo LA, Zhou Y, Álvarez-Gallego CJ, Garcia LIR, Ng WJ. Anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste (OFMSW): Progress and challenges. *Renew Sustain Energy Rev* 2018;93:380–99. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.051>.
- [127] Bolzonella D, Battistoni P, Susini C, Cecchi F. Anaerobic codigestion of waste activated sludge and OFMSW: The experiences of Viareggio and Treviso plants (Italy). *Water Sci Technol* 2006;53:203–11. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.251>.
- [128] Serna-Maza A, Heaven S, Banks CJ. Ammonia removal in food waste anaerobic digestion using a side-stream stripping process. *Bioresour Technol* 2014;152:307–15. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.093>.
- [129] Zhang T, Bowers KE, Harrison JH, Chen S. Releasing Phosphorus from Calcium for Struvite Fertilizer Production from Anaerobically Digested Dairy Effluent. *Water Environ Res* 2010;82:34–42. <https://doi.org/10.2175/106143009x425924>.
- [130] Magrí A, Béline F, Dabert P. Feasibility and interest of the anammox process as treatment alternative for anaerobic digester supernatants in manure processing - An overview. *J Environ Manage* 2013;131:170–84. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.09.021>.
- [131] Barreiro-Vescovo S, Barbera E, Bertucco A, Sforza E. Integration of microalgae cultivation in a

biogas production process from organic municipal solid waste: From laboratory to pilot scale. *ChemEngineering* 2020;4:1–19. <https://doi.org/10.3390/chemengineering4020025>.

- [132] Yeh KL, Chang JS. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. *Bioresour Technol* 2012;105:120–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.103>.
- [133] Zuliani L, Frison N, Jelic A, Fatone F, Bolzonella D, Ballottari M. Microalgae cultivation on anaerobic digestate of municipal wastewater, sewage sludge and agro-waste. *Int J Mol Sci* 2016;17. <https://doi.org/10.3390/ijms17101692>.
- [134] Khanh NTT. Effects of Depth and Concentration of Digestate on Growth of Three Microalgal Species. *Vietnam J Sci Technol* 2016;54:591–6. <https://doi.org/10.15625/0866-708x/54/5/6752>.
- [135] Chiranjeevi P, Mohan SV. Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity. *Renew Energy* 2016;98:64–71. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.063>.
- [136] Molina Grima E, Belarbi E-H, Acién Fernández F g., Robles Medina A, Chisti Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv* 2003;20:491–515.
- [137] Franchino M, Comino E, Bona F, Riggio VA. Chemosphere Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere* 2013;92:738–44. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.023>.
- [138] Ledda C, Idà A, Allemand D, Mariani P, Adani F. Production of wild *Chlorella* sp . cultivated in digested and membrane-pretreated swine manure derived from a full-scale operation plant. *ALGAL* 2015;12:68–73. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.010>.
- [139] Jeevan Kumar SP, Vijay Kumar G, Dash A, Scholz P, Banerjee R. Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: A review. *Algal Res* 2017;21:138–47. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.014>.
- [140] Ji MK, Yun HS, Park YT, Kabra AN, Oh IH, Choi J. Mixotrophic cultivation of a microalga *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater supplemented with food wastewater and flue gas CO<sub>2</sub> for biomass production. *J Environ Manage* 2015;159:115–20. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.05.037>.
- [141] Cicci A, Bravi M. Production of the freshwater microalgae *scenedesmus dimorphus* and *arthrospira platensis* by using cattle digestate. *Chem Eng Trans* 2014;38:85–90. <https://doi.org/10.3303/CET1438015>.
- [142] Nuñez VJ, Voltolina D, Nieves M, Piña P, Medina A, Guerrero M. Nitrogen budget in *Scenedesmus*

obliquus cultures with artificial wastewater. *Bioresour Technol* 2001;78:161–4.

- [143] Kim G, Mujtaba G, Lee K. Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *tetraselmis* sp. For lipid production. *Algae* 2016;31:257–66. <https://doi.org/10.4490/algae.2016.31.8.18>.
- [144] Ruiz-Martinez A, Martin Garcia N, Romero I, Seco A, Ferrer J. Microalgae cultivation in wastewater: Nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresour Technol* 2012;126:247–53. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.022>.
- [145] Alemán-nava GS, Cuellar-bermudez SP, Cuaresma M, Bosma R, Muylaert K, Ritmann BE, et al. How to use Nile Red , a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids. *J Microbiol Methods* 2016;128:74–9. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.07.011>.
- [146] Doan TY, Obbard JP. Improved Nile Red staining of *Nannochloropsis* sp Improved Nile Red staining of *Nannochloropsis* sp . 2010. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9608-5>.
- [147] Scarponi P, Bonetto A, Bolzonella D, Astals S, Cavinato C. Anaerobic Co-Digestion Effluent as Substrate for *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* Cultivation. *Energies* 2020;13:4880. <https://doi.org/10.3390/en13184880>.
- [148] Ledda C, Idà A, Allemand D, Mariani P, Adani F. Production of wild *Chlorella* sp. cultivated in digested and membrane-pretreated swine manure derived from a full-scale operation plant. *Algal Res* 2015;12:68–73. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.08.010>.
- [149] Massa M, Buono S, Luca A, Castaldo L, Martello A, Paduano A, et al. Evaluation of anaerobic digestates from different feedstocks as growth media for *Tetrademus obliquus* , *Botryococcus braunii* , *Phaeodactylum tricornutum* and *Arthrospira maxima*. *N Biotechnol* 2017;36:8–16. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.12.007>.
- [150] Xia A, Murphy JD. Microalgal Cultivation in Treating Liquid Digestate from Biogas Systems. *Trends Biotechnol* 2015;34:264–75. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.12.010>.
- [151] Gentili FG. Microalgal biomass and lipid production in mixed municipal, dairy, pulp and paper wastewater together with added flue gases. *Bioresour Technol* 2014;169:27–32. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.061>.
- [152] Park J, Jin HF, Lim BR, Park KY, Lee K. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresour Technol* 2010;101:8649–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.142>.
- [153] Qin L, Wei D, Wang Z, Alam MA. Advantage Assessment of Mixed Culture of *Chlorella vulgaris* and *Yarrowia lipolytica* for Treatment of Liquid Digestate of Yeast Industry and Cogeneration of Biofuel Feedstock. *Applied Biochem Biotechnol* 2019;187:856–69.

- [154] Mohammadi M, Mowla D, Esmailzadeh F, Ghasemi Y. Cultivation of microalgae in a power plant wastewater for sulfate removal and biomass production: A batch study. *J Environ Chem Eng* 2018;6:2812–20. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.037>.
- [155] Mussgnug JH, Klassen V, Schlüter A, Kruse O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *J Biotechnol* 2010;150:51–6. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.07.030>.
- [156] Olguín EJ, Dorantes E, Castillo OS, Hernández-Landa VJ. Anaerobic digestates from vinasse promote growth and lipid enrichment in *Neochloris oleoabundans* cultures. *J Appl Phycol* 2015;27:1813–22. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0540-6>.
- [157] Xia A, Murphy JD. Microalgal Cultivation in Treating Liquid Digestate from Biogas Systems. *Trends Biotechnol* 2016;34:264–75. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.12.010>.
- [158] Veronesi D, D'Imporzano G, Salati S, Adani F. Pre-treated digestate as culture media for producing algal biomass. *Ecol Eng* 2017;105:335–40. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.05.007>.
- [159] Skorupskaite V, Makareviciene V, Levisauskas D. Optimization of mixotrophic cultivation of microalgae *Chlorella* sp. for biofuel production using response surface methodology. *ALGAL* 2015;7:45–50. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.12.001>.
- [160] Bjornsson WJ, Nicol RW, Dickinson KE, McGinn PJ. Anaerobic digestates are useful nutrient sources for microalgae cultivation: Functional coupling of energy and biomass production. *J Appl Phycol* 2013;25:1523–8. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9968-0>.
- [161] Talebi AF, Tabatabaei M, Mohtashami SK, Tohidfar M, Moradi F. Comparative Salt Stress Study on Intracellular Ion Concentration in Marine and Salt-adapted Freshwater Strains of Microalgae. *Not Sci Biol* 2013;5:309–15. <https://doi.org/10.15835/nsb539114>.
- [162] Singh P, Guldhe A, Kumari S, Rawat I, Bux F. Investigation of combined effect of nitrogen, phosphorus and iron on lipid productivity of microalgae *Ankistrodesmus falcatus* KJ671624 using response surface methodology. *Biochem Eng J* 2015;94:22–9. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.10.019>.
- [163] Whitton R, Le Mével A, Pidou M, Ometto F, Villa R, Jefferson B. Influence of microalgal N and P composition on wastewater nutrient remediation. *Water Res* 2016;91:371–8. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.054>.
- [164] Vo HNP, Bui XT, Nguyen TT, Nguyen DD, Dao TS, Cao NDT, et al. Effects of nutrient ratios and carbon dioxide bio-sequestration on biomass growth of *Chlorella* sp. in bubble column photobioreactor. *J Environ Manage* 2018;219:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.109>.
- [165] Marcilhac C, Sialve B, Pourcher AM, Ziebal C, Bernet N, Béline F. Control of nitrogen behaviour by

phosphate concentration during microalgal-bacterial cultivation using digestate. *Bioresour Technol* 2015;175:224–30. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.022>.

- [166] Tuszynska A, Czerwionka K, Obarska-Pempkowiak H. Phosphorus concentration and availability in raw organic waste and post fermentation products. *J Environ Manage* 2021;278:111468. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111468>.
- [167] Cai T, Ge X, Park SY, Li Y. Comparison of *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Nannochloropsis salina* for lipid production using artificial seawater and nutrients from anaerobic digestion effluent. *Bioresour Technol* 2013;144:255–60. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.101>.
- [168] Zhu S, Feng P, Feng J, Xu J, Wang Z, Xu J, et al. The roles of starch and lipid in *Chlorella* sp. during cell recovery from nitrogen starvation. *Bioresour Technol* 2018;247:58–65. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.120>.
- [169] Fernandes B, Teixeira J, Dragone G, Vicente AA, Kawano S, Bišová K, et al. Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. *Bioresour Technol* 2013;144:268–74. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.096>.
- [170] Zhu S, Feng S, Xu Z, Qin L, Shang C. Cultivation of *Chlorella vulgaris* on unsterilized dairy-derived liquid digestate for simultaneous biofuels feedstock production and pollutant removal. *Bioresour Technol* 2019;285:121353. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121353>.
- [171] European Standard EN 14214. Automotive Fuels – Fatty Acid Methyl Ester (FAME) for Biodiesel Engines – Requirements and Test Methods. 2004.
- [172] Koutra E, Economou CN, Tsafrakidou P, Kornaros M. Bio-Based Products from Microalgae Cultivated in Digestates. *Trends Biotechnol* 2018;36:819–33. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.02.015>.
- [173] Ahmad AL, Yasin NHM, Derek CJC, Lim JK. Comparison of harvesting methods for microalgae *Chlorella* sp. and its potential use as a biodiesel feedstock. *Environ Technol (United Kingdom)* 2014;35:2244–53. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.900117>.
- [174] Mata TM, Melo AC, Meireles S, Mendes AM, Martins AA, Caetano NS. Potential of Microalgae *Scenedesmus obliquus* Grown in Brewery Wastewater for Biodiesel Production. *Chem Eng Trans* 2013;32:901–6. <https://doi.org/10.3303/CET1332151>.
- [175] Damiani MC, Popovich CA, Constenla D, Leonardi PI. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresour Technol* 2010;101:3801–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.136>.
- [176] Gouveia L, Oliveira AC. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol*

Biotechnol 2009;36:269–74. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0495-6>.

- [177] Koutra E, Grammatikopoulos G, Kornaros M. Microalgal post-treatment of anaerobically digested agro-industrial wastes for nutrient removal and lipids production. *Bioresour Technol* 2017;224:473–80. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.022>.
- [178] Zbińkowski P, Zmywaczyk J, Koniorczyk P. Experimental investigations of thermophysical properties of some paraffin waxes industrially manufactured in Poland. *AIP Conf Proc* 2017;1866. <https://doi.org/10.1063/1.4994524>.
- [179] Nedybaliuk OA, Solomenko OV, Chernyak VY, Martysh EV, Vergun LY, Prysiashnevych IV, et al. Peculiarities of Plasma Assisted Stearine Combustion. *Phys Rev Res Int* 2013;3:522–30.
- [180] Paping S, Chom-In T, Noksa-nga S, Malakul P. Life cycle energy efficiency and potentials of biodiesel production from palm oil in Thailand. *Energy Policy* 2010;38:226–33. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2009.09.009>.
- [181] Afifah AN, Syahrullail S, Wan Azlee NI, Che Sidik NA, Yahya WJ, Abd Rahim E. Biolubricant production from palm stearin through enzymatic transesterification method. *Biochem Eng J* 2019;148:178–84. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.05.009>.
- [182] Vijay V, Pimm SL, Jenkins CN, Smith SJ. The impact of oil palm on recent deforestation and biodiversity loss. *PLoS One* 2016;11:e0159668. <https://doi.org/10.1038/35971>.
- [183] Ashokkumar V, Agila E, Salam Z, Ponraj M, Fadhil M, Nasir F. A study on large scale cultivation of *Microcystis aeruginosa* under open raceway pond at semi-continuous mode for biodiesel production. *Bioresour Technol* 2014;172:186–93. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.100>.
- [184] Bresaola MD, Morocho-Jácome AL, Matsudo MC, de Carvalho JCM. Semi-continuous process as a promising technique in *Ankistrodesmus braunii* cultivation in photobioreactor. *J Appl Phycol* 2019;31:2197–205. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01774-0>.
- [185] Mezzanotte V, Marazzi F, da Silva Cristóvão MBSM, Bellucci M, Ficara E. Phycoremediation to reduce the pollution load of piggery wastewater: results of semi-continuous lab tests using *Chlorella* and *Scenedesmus* spp. *Chem Eng Trans* 2018;64:679–84. <https://doi.org/10.3303/CET1864114>.
- [186] Huo S, Chen X, Zhu F, Zhang W, Chen D, Jin N, et al. Magnetic field intervention on growth of the filamentous microalgae *Tribonema* sp. in starch wastewater for algal biomass production and nutrients removal: Influence of ambient temperature and operational strategy. *Bioresour Technol* 2020;303:122884. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122884>.
- [187] Benvenuti G, Bosma R, Ji F, Lamers P, Barbosa MJ, Wijffels RH. Batch and semi-continuous microalgal TAG production in lab-scale and outdoor photobioreactors. *J Appl Phycol* 2016:3167–77. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0897-1>.

- [188] Chaiklahan R, Chirasuwan N, Siangdung W, Paithoonrangsarid K, Bunnag B. Cultivation of spirulina platensis using pig wastewater in a semi-continuous process. *J Microbiol Biotechnol* 2010;20:609–14. <https://doi.org/10.4014/jmb.0907.07026>.
- [189] Ruiz-Marin A, Mendoza-espinoza LG, Stephenson T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresour Technol* 2010;101:58–64. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.076>.
- [190] Nwoba EG, Mickan BS, Moheimani NR. *Chlorella* sp. growth under batch and fed-batch conditions with effluent recycling when treating the effluent of food waste anaerobic digestate. *J Appl Phycol* 2019;31:3545–56. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01878-7>.
- [191] Molina Grima E, García Camacho F, Sanchez Pérez JA, Acien Fernández FG, Fernández Sevilla JM, Valdés Sanz F. Effect of dilution rate on eicosapentaenoic acid productivity of *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 in outdoor chemostat culture. *Biotechnol Lett* 1994;16:1035–1040.
- [192] Feng Y, Li C, Zhang D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresour Technol* 2011;102:101–5. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.016>.
- [193] Ashokkumar V, Agila E, Sivakumar P, Salam Z, Rengasamy R, Ani FN. Optimization and characterization of biodiesel production from microalgae *Botryococcus* grown at semi-continuous system. *Energy Convers Manag* 2014;88:936–46. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.09.019>.
- [194] Cai T, Park SY, Racharaks R, Li Y. Cultivation of *Nannochloropsis salina* using anaerobic digestion effluent as a nutrient source for biofuel production. *Appl Energy* 2013;108:486–92. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.03.056>.
- [195] Yao Z, Ying C, Lu J, Lai Q, Zhou K, Wang H, et al. Removal of K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> from a saline-alkaline water using the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Chinese J Oceanol Limnol* 2013;31:1248–56.
- [196] Gorain PC, Bagchi SK, Mallick N. Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae. *Environ Technol (United Kingdom)* 2013;34:1887–94. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.812668>.
- [197] Pick U, Ben-Amotz A, Karni L, Seebergts CJ, Avron M. Partial characterization of K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> uptake systems in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* 1986;a:875–81.
- [198] Franchino M, Comino E, Bona F, Riggio VA. Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. *Chemosphere* 2013;92:738–44. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.023>.
- [199] González LE, Cañizares RO, Baena S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus*



- dimorphus. *Bioresour Technol* 1997;60:259–62. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00029-1).
- [200] Lu Q, Zhou W, Min M, Ma X, Chandra C, Doan YTT, et al. Growing *Chlorella* sp. on meat processing wastewater for nutrient removal and biomass production. *Bioresour Technol* 2015;198:189–97. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.133>.
- [201] Bellucci M, Marazzi F, Ficara E, Mezzanotte V. Effect of N:P Ratio on Microalgae/Nitrifying Bacteria Community in Agro-Digestate Treatment. *Environ Clim Technol* 2020;24:136–48. <https://doi.org/10.2478/rtuect-2020-0061>.
- [202] Huo S, Necas D, Zhu F, Chen D, An J, Zhou N, et al. Anaerobic digestion wastewater decolorization by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-enhanced electro-Fenton coagulation following nutrients recovery via acid tolerant and protein-rich *Chlorella* production. *Chem Eng J* 2021;406:127160. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127160>.
- [203] Cicci A, Stoller M, Bravi M. Analysis of microalgae growth in residual light: A diagnostics tool for low-cost alternative cultural media. *Chem Eng Trans* 2014;38:79–84. <https://doi.org/10.3303/CET1438014>.
- [204] Huo S, Kong M, Zhu F, Qian J, Huang D, Chen P, et al. Co-culture of *Chlorella* and wastewater-borne bacteria in vinegar production wastewater: Enhancement of nutrients removal and influence of algal biomass generation. *Algal Res* 2020;45:101744. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101744>.
- [205] Jiang R, Qin L, Feng S, Huang D, Wang Z, Zhu S. The joint effect of ammonium and pH on the growth of *Chlorella vulgaris* and ammonium removal in artificial liquid digestate. *Bioresour Technol* 2021;325:124690. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124690>.
- [206] Jail A, Boukhoubza F, Nejmeddine A, Sayadi S, Hassani L. Co-treatment of olive-mill and urban wastewaters by experimental stabilization ponds. *J Hazard Mater* 2010;176:893–900. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.120>.
- [207] Silva NFP, Gonçalves AL, Moreira FC, Silva TFCV, Martins FG, Alvim-Ferraz MCM, et al. Towards sustainable microalgal biomass production by phycoremediation of a synthetic wastewater: A kinetic study. *Algal Res* 2015;11:350–8. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.014>.
- [208] INDAM. ACQUE DI SCARICO: Acque reflue urbane e acque reflue industriali. All 5, P Terza, DLgs N152 n.d.:152.
- [209] Valori limiti di emissione in acque superficiali e in fognatura. D Lgs 152/06 2006;06:(Parte terza, Allegato 5, Tabella 3).
- [210] Naveed S, Li C, Lu X, Chen S, Yin B, Zhang C, et al. Microalgal extracellular polymeric substances and their interactions with metal(loid)s: A review. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2019;49:1769–802. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1583052>.

- [211] Aguilera A, Souza-Egipsy V, San Martín-Úriz P, Amils R. Extraction of extracellular polymeric substances from extreme acidic microbial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;78:1079–88. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1390-9>.
- [212] Cheng J, Xu J, Huang Y, Li Y. Growth optimisation of microalga mutant at high CO<sub>2</sub> concentration to purify undiluted anaerobic digestion effluent of swine manure. *Bioresour Technol* 2015;177:240–246.
- [213] Jimenez R, Markou G, Tayibi S, Barakat A, Chapsal C, Monlau F. Production of microalgal slow-release fertilizer by valorizing liquid agricultural digestate: Growth experiments with tomatoes. *Appl Sci* 2020;10. <https://doi.org/10.3390/app10113890>.
- [214] Kumar P, Prajapati SK, Malik A, Vijay VK. Cultivation of native algal consortium in semi-continuous pilot scale raceway pond for greywater treatment coupled with potential methane production. *J Environ Chem Eng* 2017;5:5581–7. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.10.044>.
- [215] Boonma S, Takarada T, Peerapornpisal Y, Pumas C, Chaiklangmuang S. Semi-continuous cultivation of microalgal consortium using low CO<sub>2</sub> concentration for large-scale biofuel production. *J Biotech Res* 2019;10:19–28.
- [216] Yang Y-C, Jian J-F, Kuo C-M, Zhang W-X, Lin C-S. Biomass and lipid production of *Chlorella* Sp. using municipal wastewater under semi-continuous cultivation. *Int Proc Chem Biol Environ Eng* 2017;101:18–25. <https://doi.org/10.7763/IPCBE>.
- [217] Kong F, Ren HY, Zhao L, Nan J, Ren NQ, Liu BF, et al. Semi-continuous lipid production and sedimentation of *Scenedesmus* sp. by metal ions addition in the anaerobic fermentation effluent. *Energy Convers Manag* 2020;203:112216. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112216>.
- [218] Álvarez X, Otero A. Nutrient removal from the centrate of anaerobic digestion of high ammonium industrial wastewater by a semi-continuous culture of *Arthrospira* sp. and *Nostoc* sp. PCC 7413. *J Appl Phycol* 2020;32:2785–94. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02175-4>.
- [219] Cai T, Park SY, Racharaks R, Li Y. Cultivation of *Nannochloropsis salina* using anaerobic digestion effluent as a nutrient source for biofuel production. *Appl Energy* 2013;108:486–92. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.03.056>.
- [220] Lee JC, Baek K, Kim HW. Semi-continuous operation and fouling characteristics of submerged membrane photobioreactor (SMPBR) for tertiary treatment of livestock wastewater. *J Clean Prod* 2018;180:244–51. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.159>.
- [221] Koutra E, Economou CN, Tsafraikidou P, Kornaros M. Bio-Based Products from Microalgae Cultivated in Digestates. *Trends Biotechnol* 2018;36:819–33. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.02.015>.

- [222] Fernández-Linares LC, Gutiérrez-Márquez A, Guerrero-Barajas C. Semi-continuous culture of a microalgal consortium in open ponds under greenhouse conditions using piggery wastewater effluent. *Bioresour Technol Reports* 2020;12. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100597>.
- [223] Bellou S, Baeshen MN, Elazzazy AM, Aggeli D, Sayegh F, Aggelis G. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnol Adv* 2014;32:1476–93. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.10.003>.
- [224] Yoon K, Han D, Li Y, Sommerfeld M, Hu Q. Phospholipid:Diacylglycerol acyltransferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turnover and degradation while synthesizing triacylglycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 2012;24:3708–24. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.100701>.
- [225] Fan J, Cui Y, Wan M, Wang W, Li Y. Lipid accumulation and biosynthesis genes response of the oleaginous *Chlorella pyrenoidosa* under three nutrition stressors. *Biotechnol Fuel* 2014;7:1–14. <https://doi.org/10.4314/thrb.v15i1.7>.
- [226] Piloto-Rodríguez R, Sánchez-Borroto Y, Lapuerta M, Goyos-Pérez L, Verhelst S. Prediction of the cetane number of biodiesel using artificial neural networks and multiple linear regression. *Energy Convers Manag* 2013;65:255–61. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2012.07.023>.
- [227] Giakoumis EG, Sarakatsanis CK. Estimation of biodiesel cetane number, density, kinematic viscosity and heating values from its fatty acid weight composition. *Fuel* 2018;222:574–85. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.02.187>.
- [228] Heywood JB. *Internal combustion engine fundamentals*. McGraw-Hill Education. 2018.
- [229] Bertazza G, Foladori P, Guglielmi L. *Recupero di materia e di energia negli impianti di depurazione*. Maggioli Editore S.P.A; 2018.
- [230] FAO. *Designing viable algal bioenergy co-production concepts*. *Algae-Based Biofuels Appl Co-Products* N° 44, Roma 2010.
- [231] Aresta M. Indirect utilization of carbon dioxide: utilization of terrestrial and aquatic biomass. In: Aresta M (ed) *Carbon dioxide as chemical feedstock*. 2010.
- [232] Norsker NH, Barbosa MJ, Vermuë MH, Wijffels RH. Microalgal production - A close look at the economics. *Biotechnol Adv* 2011;29:24–7. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.005>.
- [233] Dibenedetto A, Colucci A, Aresta M. The need to implement an efficient biomass fractionation and full utilization based on the concept of “biorefinery” for a viable economic utilization of microalgae. *Environ Sci Pollut Res* 2016;23:22274–83. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6123-5>.
- [234] León-Vaz A, León R, Díaz-Santos E, Vigara J, Raposo S. Using agro-industrial wastes for

mixotrophic growth and lipids production by the green microalga *Chlorella sorokiniana*. *N Biotechnol* 2019;51:31–8. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.02.001>.

- [235] Froissard M, Canonge M, Pouteaux M, Cintrat B, Mohand-Oumoussa S, Guillouet SE, et al. Lipids containing medium-chain fatty acids are specific to post-whole genome duplication *Saccharomycotina* yeasts Genome evolution and evolutionary systems biology. *BMC Evol Biol* 2015;15:1–16. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0369-2>.
- [236] Mishra P, Prasad R. An overview of lipids of *Candida albicans*. *Prog Lipid Res* 1990;29:65–85. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(90\)90006-7](https://doi.org/10.1016/0163-7827(90)90006-7).
- [237] Torija MJ, Beltran G, Novo M, Poblet M, Guillamón JM, Mas A, et al. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *Int J Food Microbiol* 2003;85:127–36. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00506-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00506-8).
- [238] Fleet GH. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol* 2003;86:11–22.
- [239] Walker GM, McLeod AH, Hogson VJ. Interaction between killer yeast and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Lett* 1995;127:213–22.
- [240] Bisson LF. Stuck and sluggish fermentation. *Am J Enol Vitic* 1999;50:107–19.
- [241] Gao C, Fleet GH. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeast. *J Appl Bacteriol* 1988;65:405–10.
- [242] Bisson LF, Block DE. Ethanol tolerance in *Saccharomyces*. Ciani, M (Ed), *Biodivers Biotechnol Wine Yeast Res Signpost*, Kerala, India 2002:85–98.
- [243] Sponholz W. Wine spoilage by microorganisms. Fleet, GH (Ed), *Wine Microbiol Biotechnol* Harwood Acad Publisher, Chur, Switz 1993:395–420.
- [244] Prajapati SK, Malik A, Vijay VK. Comparative evaluation of biomass production and bioenergy generation potential of *Chlorella* spp . through anaerobic digestion. *Appl Energy* 2014;114:790–7. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.08.021>.
- [245] Sakarika M, Kornaros M. *Chlorella vulgaris* as a green biofuel factory: Comparison between biodiesel, biogas and combustible biomass production. *Bioresour Technol* 2019;273:237–43. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.017>.
- [246] Zhang Y, Caldwell GS, Zealand AM, Sallis PJ. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella vulgaris* and potato processing waste: Effect of mixing ratio, waste type and substrate to inoculum ratio. *Biochem Eng J* 2019;143:91–100. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.12.021>.
- [247] Zhao B, Ma J, Zhao Q, Laurens L, Jarvis E, Chen S, et al. Efficient anaerobic digestion of whole

microalgae and lipid-extracted microalgae residues for methane energy production. *Bioresour Technol* 2014;161:423–30. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.079>.

- [248] Sialve B, Bernet N, Bernard O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol Adv* 2009;27:409–16. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.03.001>.
- [249] Alzate ME, Muñoz R, Rogalla F, Fdz-Polanco F, Pérez-Elvira SI. Biochemical methane potential of microalgae biomass after lipid extraction. *Chem Eng J* 2014;243:405–10. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.07.076>.
- [250] Buswell AM, Neave SL. Laboratory studies of sludge digestion. *Div State Water Surv* 1930:84.
- [251] Prajapati SK, Malik A, Vijay VK. Comparative evaluation of biomass production and bioenergy generation potential of *Chlorella* spp. through anaerobic digestion. *Appl Energy* 2014;114:790–7. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.08.021>.
- [252] Liu C, Subashchandrabose SR, Megharaj M, Hu Z, Xiao B. *Diplosphaera* sp. MM1 – A microalga with phycoremediation and biomethane potential. *Bioresour Technol* 2016;218:1170–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.077>.
- [253] Lakaniemi AM, Hulatt CJ, Thomas DN, Tuovinen OH, Puhakka JA. Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass. *Biotechnol Biofuels* 2011;4:1–12. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-34>.

## Ringraziamenti

Ringrazio fortemente la Prof.ssa Cavinato che ha creduto in me dal primo momento, supportandomi e sopportandomi per tutti questi lunghi anni. Senza la sua disponibilità e pazienza non sarei riuscita a crescere e concludere questo percorso lungo e tortuoso che è il dottorato.

Ringrazio immensamente i miei genitori, che hanno affrontato immense difficoltà, rafforzando un legame già indissolubile, con un grande sorriso. Senza di voi che mi avete dato radici ed ali, non credo sarei riuscita in tutto questo.

Ringrazio il Prof. Bravi e la Dott.ssa Cicci, oltre alla profonda stima ed amicizia, la vostra presenza nella mia vita di tutti i giorni, ed in particolare in questi tre anni di dottorato, è stata fondamentale. Siete il mio punto fermo e porto, una famiglia dove il sangue non ci lega, ma l'anima sicuramente.

Ringrazio chi mi ha voluto bene, chi c'è stato e chi c'è ancora. Perché per quanto è vero che nasciamo e moriamo da soli, la strada che percorriamo è meno dura se in felice compagnia.

Ringrazio i miei colleghi Marco ed Alice, dotati di immensa pazienza e calma, qualità a me purtroppo sconosciute. L'ansia è mia compagna fedele, ci prendiamo il caffè insieme la mattina. Spero di migliorare col tempo prima che il cuore ceda. Col sommo motto del laboratorio "*Pecunia non olet*" vi auguro il meglio perché ve lo meritate.

Un ringraziamento di merito è per Ninkasi. Il tuo calore e la tua gioia hanno reso il rientro a casa pieno di luce, col sole, pioggia, vento o neve. Senza di te, sulle mie gambe, quelle interminabili giornate al computer sarebbero state molto più dure. Una compagna del genere dovrebbe esserci per ogni essere umano.

L'ultimo ringraziamento è per me. Perché alla fine il pacchetto "sudore della fronte, rinunce, stress, attacchi di cuore e depressione" è tutto mio, non di altri. Ho iniziato questo percorso e l'ho portato a termine, togliendomi forse anche troppo, ma ho trovato la forza e ho dimostrato a me stessa che qualcosa alla fine valgo. In questo mio personalissimo elogio voglio dire a tutte quelle persone che hanno esordito con "è troppo per te", "questo lavoro non è adatto a te" e "non sei portata" che vi saluto a testa alta col mio miglior sorriso e dito medio alzato. Perché forse della vita raccontava bene Esopo, la volpe disse «Ὅμφακέξ εἰσιν.» solo perché ai grappoli d'uva non ci arrivava, con immensa ironia della sorte data la tesi che ho scritto.

Forse i migliori anni della mia vita li ho spesi, in termini di tempo, energie e rinunce, dentro un laboratorio. Guardando indietro a questi 1460 giorni di vita vissuta penso solo che lo rifarei ancora, senza esitazione. Sperando che nella vita il ricercatore sia veramente il mio futuro.

Per non dimenticarti mai "le vent se lève, il faut tenter de vivre" mia cara.