



## TRATTAMENTO REFLUI CON MICROALGHE

Le microalghe sono microorganismi fotosintetici che possono metabolizzare dei composti inorganici inquinanti presenti nelle acque reflue civili ed industriali. Nei trattamenti tradizionali i fanghi attivi ossidano i composti organici e le microalghe possono aiutare a rimuovere i nutrienti residui.

### Introduzione

Il trattamento delle acque reflue è di fondamentale importanza per evitare fenomeni di eutrofizzazione e, di conseguenza, l'inquinamento delle acque marine. Inoltre, i limiti di concentrazione degli inquinanti nelle acque reflue industriali sono regolamentati da leggi sempre più restrittive. Il trattamento convenzionale delle acque reflue avviene nelle cosiddette "vasche a fanghi attivi", nelle quali un insieme di batteri svolge l'ossidazione dei composti organici. Tutti questi microorganismi costituiscono il fango attivo (*activated sludge*). Per favorire le reazioni, viene insufflata aria all'interno delle vasche: questa operazione incide approssimativamente per il 45-75% dei costi energetici totali di un impianto di trattamento delle acque reflue [1]. In questo contesto, è possibile trovare un'applicazione per le microalghe. Queste ultime, infatti, sono microorganismi capaci di svolgere fotosintesi e consumare sostanze inorganiche come nitrati e fosfati, normalmente presenti in elevate concentrazioni nelle acque reflue civili ed industriali (basti pensare alle acque reflue prodotte dall'agricoltura e dagli allevamenti) [2]. Inoltre, le microalghe possono essere impiegate per ridurre

la concentrazione di inquinanti particolari ed emergenti come i metalli pesanti. Le microalghe trovano applicazione nei processi di trattamento delle acque reflue per diverse ragioni:

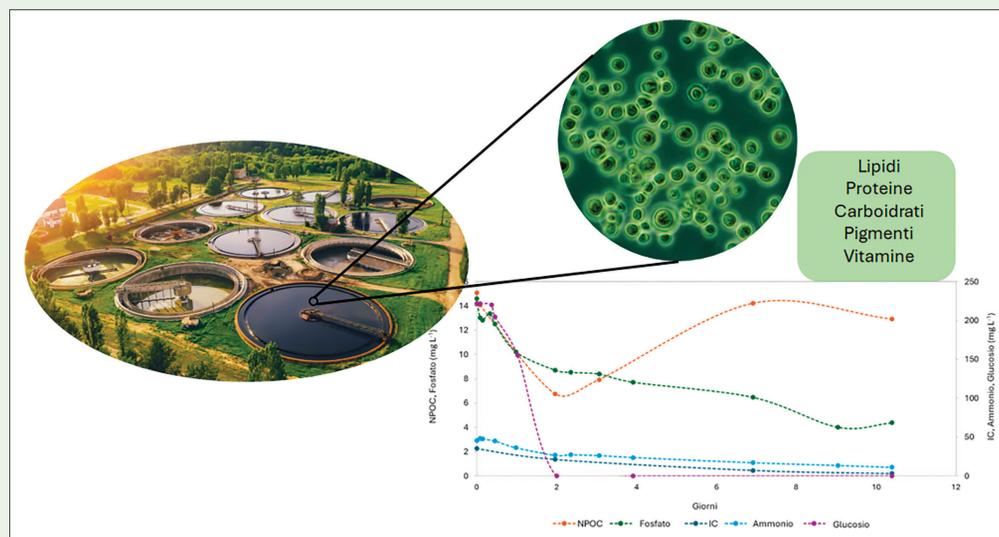
- i) la diminuzione della concentrazione di nitrati e fosfati;
- ii) la riduzione dei costi di aerazione, grazie all'ossigenazione dovuta alla fotosintesi;

iii) la produzione di una biomassa che può essere impiegata in vari settori e che contiene biomolecole di elevato valore [3].

La biomassa di microalghe, compresa quella accresciuta nelle vasche di trattamento delle acque reflue, può essere impiegata in diversi settori, come la produzione di biofuel o di carboidrati e lipidi per scopi alimentari e nutraceutici. Inoltre, vengono sfruttate per il loro contenuto in biomolecole di elevato valore (come carotenoidi e omega-3) e la ricerca, nel corso degli anni ha proposto diverse strategie per ottimizzare la produzione di queste biomolecole [4, 5].

In questo lavoro, si è testato il potenziale di bonifica di una microalga locale, *Chlorella sp. Pozzillo*, da sola ed in sinergia con del fango attivo. Durante la prima fase della campagna sperimentale, si è fatta accrescere la microalga in un refluo simulato, all'interno di un fotobioreattore *raceway*, ovvero una vasca a cielo aperto.

In seguito all'accrescimento della biomassa, è stato analizzato l'abbattimento dei principali inquinanti presenti. La seconda fase della campagna sperimentale ha analizzato le prestazioni in termini di abbattimento in un refluo civile reale della sola microalga, del solo fango attivo e del consorzio microalga + fango attivo, fatti accrescere in condizioni controllate.



Componente	Concentrazione [mg/L]
Glucosio	221,7
NH <sub>4</sub> Cl	153,0
NaNO <sub>3</sub>	160,0
CaCl <sub>2</sub> ·(2H <sub>2</sub> O)	165,0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	63,37
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	56,37
NaHCO <sub>3</sub>	200,0
EDTA (sale di Na <sub>2</sub> )	6,37
FeCl <sub>3</sub> ·(6H <sub>2</sub> O)	4,85
CuSO <sub>4</sub> ·(5H <sub>2</sub> O)	0,02
ZnSO <sub>4</sub> ·(7H <sub>2</sub> O)	0,03
CoCl <sub>2</sub> ·(6H <sub>2</sub> O)	0,02
MnCl <sub>2</sub> (4H <sub>2</sub> O)	0,28
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (2H <sub>2</sub> O)	0,01

Tab. 1

stato analizzato tramite HPLC. La sospensione è stata filtrata attraverso membrane da 0,45 µm (CA, Millipore) lo strumento, Dionex UltiMate 3000 era dotato di una colonna Rezex ROA - Organic acid H<sup>+</sup> operante a 60 °C e utilizzando 0,6 mL min<sup>-1</sup> di una soluzione acquosa di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5 mM come eluente. Il contenuto ionico (fosfato e ammonio) è stato analizzato tramite cromatografia ionica (IC, Metrohm 882 Compact IC plus). Per la cromatografia anionica, è stata impiegata una colonna Metrosep A Supp 5 utilizzando una soluzione acquosa di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3,2 mM e NaHCO<sub>3</sub> 1 mM ad una portata di 0,7 mL min<sup>-1</sup>. Nel caso della cromatografia cationica, la colonna utilizzata era una Metrosep C4-250/4.0, con una soluzione acquosa di H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5,5 mM a 1 mL min<sup>-1</sup>. Per ogni analisi, il campione è stato adeguatamente diluito e filtrato attraverso una cartuccia CHROMA-FIX con silice C18 per rimuovere tutto il contenuto organico. Per le prove con le sole microalghe è stato utilizzato un fotobioreattore *raceway* in scala di laboratorio, in modo che simulasse i reattori comunemente utilizzati per la coltivazione di microalghe all'aria aperta. Questo è stato realizzato utilizzando lastre di PMMA, con una lunghezza utile di 780 mm e una larghezza di 200 mm (Fig. 1). Per facilitare la miscelazione e la circolazione è stata installata su un lato del reattore una pala girante

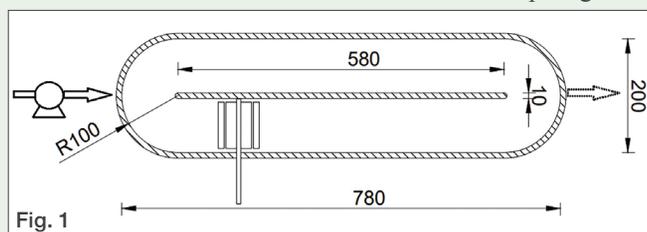


Fig. 1

## Materiali e metodi

Per le prove preliminari di trattamento con la sola microalga *Chlorella sp. Pozzillo* nel fotobioreattore *raceway*, è stata utilizzata un'acqua reflua sintetica con la composizione indicata in Tab. 1.

Il contenuto di carbonio e, in particolare, il carbonio inorganico (IC) e il carbonio organico (*Non-Purgeable Organic Carbon*, NPOC) è stato valutato mediante un analizzatore TOCL CSH/CSN Shimadzu. Il contenuto di glucosio è

azionata da un motore con velocità regolabile. Il volume operativo del reattore variava da 11 a 13 litri. Il sistema era illuminato con un flusso di fotoni di 200 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> e la temperatura della stanza veniva mantenuta costante a 27 °C.

Sia le acque reflue civili reali che il fango attivo sono stati prelevati da una centrale di trattamento municipale AMAP situata a Balestrate (PA). Per la seconda fase della campagna sperimentale, la microalga *Chlorella sp. Pozzillo*, precedentemente isolata, è stata coltivata nelle suddette acque reflue. Le microalghe sono state coltivate sia da sole che insieme al fango attivo nel rapporto 1:5 in peso. Per ogni campione è stata avviata una pre-coltura inoculando 10 mL di campione da una coltura madre in 100 mL di acque reflue. 10 mL della sospensione cellulare sono stati utilizzati per inoculare le acque reflue. 150 mL di coltura sono stati coltivati in flask Erlenmeyer da 500 mL posizionati in un incubatore oscillante (Corning Lse) sotto un flusso di fotoni di 130 µE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> (misurato con un quantometro Delta Ohm-HD 9021, con sonda Delta Ohm LP 9021 PAR), con un periodo luce/buio di 12 h a 27 °C. La coltura è stata analizzata 10 giorni e la concentrazione della sospensione di cellule è stata verificata misurando giornalmente l'assorbanza a 750 nm in uno spettrofotometro (Cary 60 Uv-vis, Agilent Technologies). Dopo la crescita, la sospensione cellulare è stata centrifugata (3600 rpm, 10 min., NEYA 10R) e la biomassa è stata congelata in azoto liquido e liofilizzata per 48 h in un liofilizzatore da banco (FreeZone 2.5 L, LABCONCO, US) e, in seguito, conservata a -20 °C. Circa 20 mg di biomassa microalga liofilizzata sono stati pesati in un tubo di vetro e aggiunti circa 7 mg di perline di vetro per favorire la rottura delle cellule. Successivamente, sono stati aggiunti 5 mL di cloroformio/metanolo (2:1 in volume) e 1 mL di NaCl all'1%, e la miscela è stata quindi miscelata con un vortex e successivamente centrifugata fino alla formazione di due fasi. La fase inferiore (fase del cloroformio) è stata trasferita in un tubo pre-pesato e il solvente è stato evaporato sotto flusso di azoto. Dopo la completa evaporazione del solvente, i lipidi totali sono stati determinati gravimetricamente. Il contenuto totale di carboidrati è stato determinato seguendo la procedura di Trevelyan *et al.* [6]. L'assorbanza di ciascun campione è stata letta a 750 nm (Cary 60 Uv-vis, Agilent Technologies). L'analisi del COD delle acque è stata eseguita seguendo il Metodo ISPRA 5135 utilizzando la provetta test LCK 514, Hach. Sono state, inoltre, effettuate le analisi di fosforo totale (TP) e azoto totale (TN) mediante una procedura di scomposizione seguendo la norma UNI EN ISO 11905-1 seguita da una reazione colorimetrica secondo DIN 38405-9 per il TN e UNI EN ISO 6878 per il TP. Per l'analisi colorimetrica è stato impiegato uno spettrofotometro UV-VIS DR6000, Hach Company.

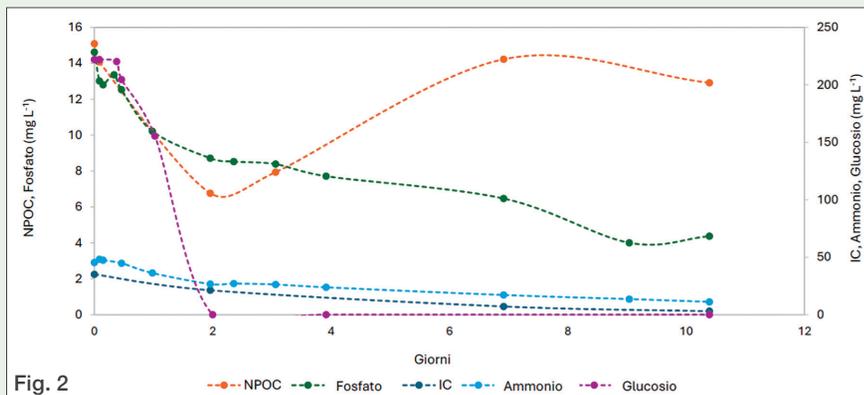


Fig. 2

## Risultati e discussione

I dati sull'evoluzione della concentrazione di inquinanti durante la coltivazione in batch nel *raceway*, con la sola microalga, rappresentati nella Fig. 2, forniscono importanti indicazioni sull'efficienza del trattamento delle acque reflue. Essi rivelano che l'efficienza complessiva dell'abbattimento è soddisfacente, come indicato dalla riduzione di fosfati, carbonio inorganico (IC), ammonio e glucosio rispettivamente del -73%, -91%, -77% e -100%. Tuttavia, la riduzione del carbonio organico (indicato come NPOC) non è altrettanto efficace. Ciò può essere dovuto alla produzione di composti organici da parte delle stesse alghe che vengono rilasciati nel terreno di crescita. Il carbonio inorganico (la cui fonte principale è bicarbonato nel terreno di coltura) viene trattato in modo efficiente, contrariamente al carbonio organico. Dato che il glucosio, che contribuisce al carbonio organico complessivo, è stato completamente consumato dopo soli due giorni di coltivazione, e considerando che non sono state introdotte altre forme di carbonio organico nel mezzo, possiamo concludere che i composti organici sono stati prodotti dagli stessi microorganismi. Ciò sottolinea l'efficacia della combinazione del trattamento delle acque reflue tramite

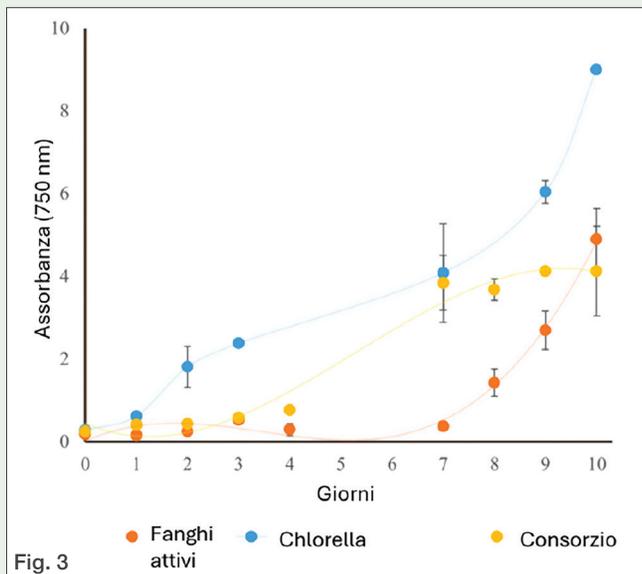


Fig. 3

alghe con batteri eterotrofi. Questi batteri hanno la capacità di utilizzare i composti organici rilasciati dalle microalghe nel terreno di crescita e sono supportati dall'ossigeno prodotto dalle alghe.

Data questa capacità della specie di microalga studiata, si è passati all'analisi del trattamento di un refluo reale. Infatti, la seconda fase della campagna sperimentale mira a mettere a confronto i trattamenti con sole microalghe, con solo fango attivo e con la miscela di microalghe e fango attivo in acque reflue civili.

La crescita dei campioni dei singoli inoculi e del consorzio microalghe + fango attivo è stata misurata attraverso il valore dell'assorbanza a 750 nm. Dalla Fig. 3 è possibile osservare che sia la microalga *Chlorella sp. Pozzillo* che il fango attivo si sono accresciuti nelle acque reflue. Inoltre, il consorzio formato dalla microalga *Chlorella sp. Pozzillo* e dal fango attivo è stato anche in grado di crescere nelle acque reflue. Il campione inoculato con il consorzio di microalghe e fango attivo mostra giorno per giorno una crescita intermedia tra le curve di crescita dei singoli campioni (solo fango attivo e solo microalghe). È comunque interessante notare come le curve di crescita delle singole specie mostrano un andamento ancora crescente, mentre la curva di crescita del consorzio sembra stabilizzarsi su un plateau già al nono giorno.

## Trattamento delle acque reflue

Al fine di indagare il ruolo delle comunità di microalghe nella bonifica delle acque reflue civili, è stato eseguito un confronto tra le analisi chimiche delle acque reflue prima e dopo il trattamento della durata di dieci giorni. È stato analizzato il COD, l'azoto totale e il fosforo totale e la Fig. 4 riporta i risultati dell'analisi. Il trattamento con la sola microalga *Chlorella sp. Pozzillo*, porta a un aumento del COD (*Chemical Oxygen Demand*, richiesta chimica di ossigeno) (+1,9%). Questo aumento è stato riscontrato nella coltura nel fotobioreattore *raceway*, ed osservato anche in altri lavori [7] ed è probabilmente dovuto al rilascio di composti organici dalle microalghe. Il COD è invece abbattuto in modo significativo dal fango attivo (-76,7%), mentre il trattamento con microalghe e fango attivo insieme porta a una diminuzione intermedia (-59,2%). Nella Fig. 4 è riportato anche il limite di legge per lo scarico delle acque reflue civili in Italia (linee tratteggiate) (D.Lgs. 152/06). Nella Fig. 4a si mostra che il trattamento con *Chlorella sp. Pozzillo* sia da sola che insieme al fango attivo non è sufficiente per abbattere il COD sotto il limite ammissibile. Invece, il trattamento solo con il fango attivo si mostra sufficiente. Ciò è probabilmente causato dal fatto che le microalghe del genere *Chlorella* rilasciano nel mezzo alcuni composti organici che vengono letti nella misurazione del COD.

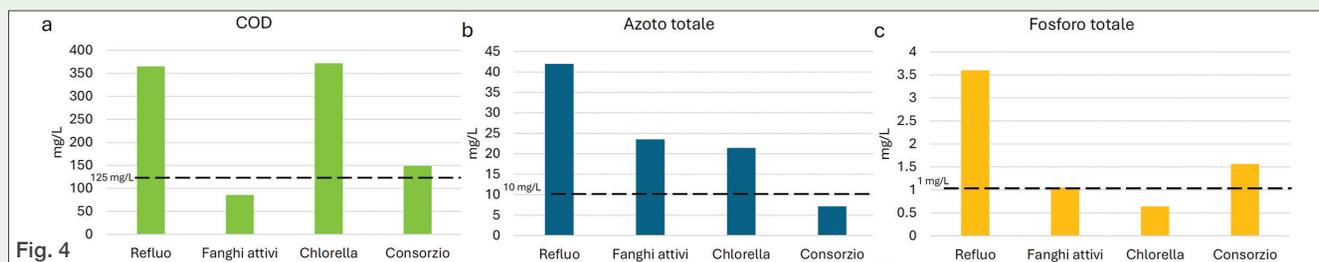


Fig. 4

Probabilmente si tratta di cellulosa, come spiegato in precedenti lavori [7]. Al contrario, inoculando insieme *Chlorella sp. Pozzillo* e fanghi attivi, si ottiene una buona rimozione dell'azoto totale, che risulta sotto il limite legislativo, come osservato nella Fig. 4b. In questo caso, la riduzione è dell'83%, mentre nelle acque reflue trattate solo con il fango attivo è del 44% e nelle acque reflue trattate solo con *Chlorella sp. Pozzillo* è del 49%. Per quanto riguarda il fosforo totale (Fig. 4c), anche in questo caso si ottengono delle buone percentuali di rimozione. In particolare, il campione inoculato con la microalga *Chlorella sp. Pozzillo* raggiunge un abbattimento dell'82%, mentre il fango attivo raggiunge il 71% e il consorzio di *Chlorella sp.* e fango attivo il 60%. Pertanto, in questo caso, l'aggiunta di fango attivo non è efficace nel ridurre ulteriormente il contenuto di fosforo totale. Inoltre, l'unico campione in grado di ridurre la concentrazione sotto il requisito di legge è quello trattato con la sola *Chlorella sp. Pozzillo*. È da notare comunque che le colture con le singole specie, non sembravano aver raggiunto una concentrazione di cellule costanti; per questo motivo, l'effetto del tempo sul trattamento è sicuramente un aspetto da analizzare in modo più approfondito.

### Analisi biochimica

La biomassa ottenuta dal trattamento delle acque reflue reali è stata analizzata per valutare quali tipi di applicazioni potrebbero essere vantaggiose per la sua valorizzazione. Per questo motivo, è stato valutato il contenuto totale di carboidrati e lipidi. I risultati mostrano che il contenuto di lipidi è più elevato nel campione costituito solo dalla microalga *Chlorella sp. Pozzillo* coltivata nelle acque reflue (32%), seguito dal 19% del consorzio di *Chlorella sp.* e fango attivo e dal 19% del AS. Anche il contenuto di carboidrati è più elevato nella *Chlorella sp. Pozzillo* (18%), seguita dal consorzio (9%) e dal fango attivo (9%).

### Conclusioni

Nel presente lavoro si è analizzata l'efficacia della microalga *Chlorella sp. Pozzillo* nel trattamento delle acque reflue. In una prima fase del lavoro, è stato studiato l'adattamento della sola microalga in un refluo artificiale, in condizioni che simulassero la coltivazione a cielo aperto in un fotobioreattore *raceway*. È stata quindi dimostrata la capacità della microalga di abbattere gli inquinanti presenti, in particolare fosfati e ammonio. Nella

seconda fase del lavoro è stato studiato l'effetto dell'inoculo di un ceppo di microalga insieme al fango attivo nelle acque reflue civili. La riduzione della richiesta chimica di ossigeno (COD), del fosforo totale e dell'azoto totale per ciascun campione è stata valutata alla fine della coltivazione. I risultati hanno mostrato che l'azoto totale è efficacemente ridotto dal consorzio (-84%) e il fosforo totale da *Chlorella sp. Pozzillo* (-82%). Per quanto riguarda la riduzione del COD, il trattamento con *Chlorella sp. Pozzillo* da sola porta a un leggero aumento del COD (+2%), mentre il fango attivo porta a un buon abbattimento (-77%), e il consorzio di microalghe e fango attivo porta a una diminuzione intermedia (-59%). La biomassa residua è stata analizzata per il contenuto in carboidrati, lipidi e acidi grassi e considerando la quantità di questi composti nella biomassa residua, potrebbe essere sfruttata in applicazioni bioenergetiche.

### Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare AMAP SpA e, in particolare, l'Ing. A. Siragusa e R. Arcuri, per aver gentilmente fornito le acque reflue ed il fango attivo per il trattamento.

### BIBLIOGRAFIA

- [1] L. Changqing, L. Shuai *et al.*, *Energy Procedia*, 2011, **5**, 2437.
- [2] S. Lima, N. D'Agostino *et al.*, *Chem. Eng. Trans.*, 2022, **93**, 301.
- [3] S. Lima, P.S.C. Schulze *et al.*, *J. Biotechnol.*, 2021, **325**, 15.
- [4] V. Plata, V. Kafarov *et al.*, *Chem. Eng. Trans.*, 2010, **21**, 1201.
- [5] A. Visca, F. Di Caprio *et al.*, *Chem. Eng. Trans.*, 2017, **57**, 127.
- [6] W.E. Trevelyan, R.S. Forrest *et al.*, *Nature*, 1952, **170**, 626.
- [7] S. Lima, V. Villanova *et al.*, *J. Water Proc. Engin.*, 2020, **38**, 101647.

### Wastewater Treatment with Microalgae

Microalgae are photosynthetic microorganisms that can metabolize inorganic pollutants present in civil and industrial wastewater. In traditional treatments, activated sludge oxidizes organic compounds, and microalgae can assist in removing residual nutrients.