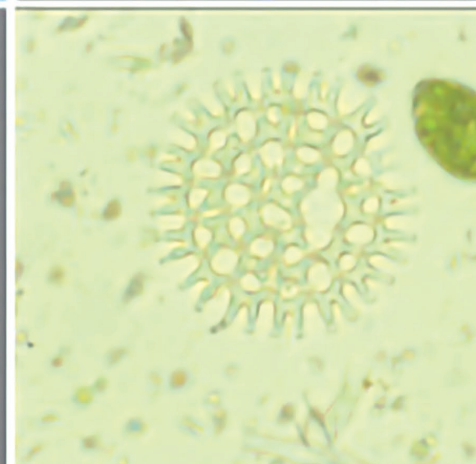
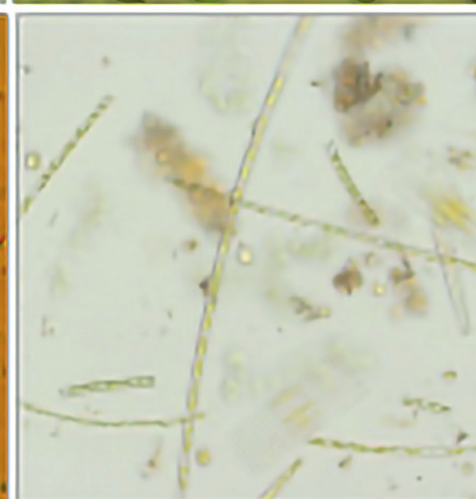
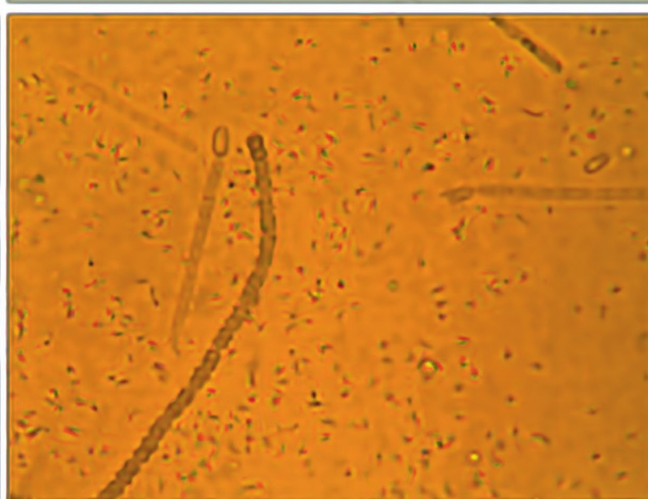
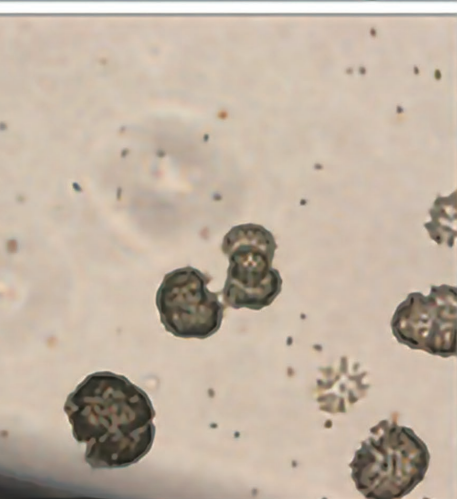
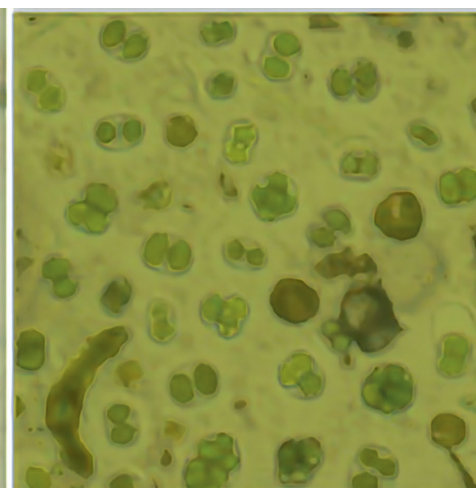
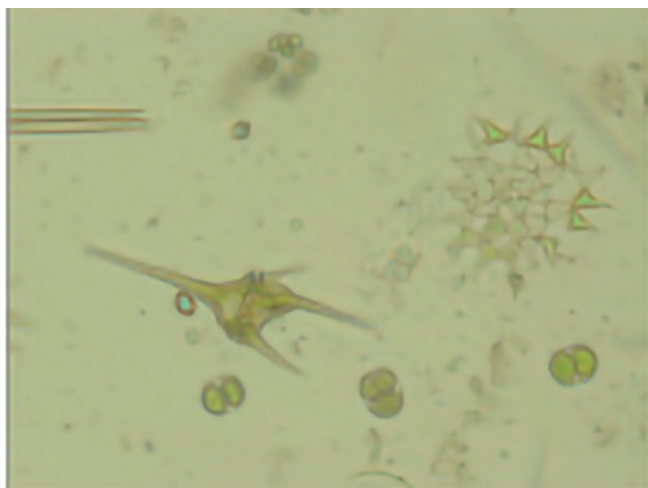


# SALUTE E SICUREZZA NELLE BIOTECNOLOGIE INDUSTRIALI

**INAIL**

Monitoraggio e valutazione degli impatti  
di bioraffinerie microalgali

**2023**



COLLANA **SALUTE E SICUREZZA**



# SALUTE E SICUREZZA NELLE BIOTECNOLOGIE INDUSTRIALI

**INAIL**

Monitoraggio e valutazione degli impatti  
di bioraffinerie microalgali

**2023**

## **Pubblicazione realizzata da**

### **Inail**

Dipartimento innovazioni tecnologiche e sicurezza degli impianti, prodotti e insediamenti antropici (Dit)

### **Autori**

Biancamaria Pietrangeli<sup>1</sup>, Fabrizio Adani<sup>3</sup>, Elisa Clagnan<sup>3</sup>, Giuliana D'Imporzano<sup>3</sup>, Marta Dell'Orto<sup>3</sup>, Roberto Lauri<sup>1</sup>, Emma Incocciati<sup>2</sup>, Anna Risuglia<sup>4</sup>, Mara Stefanelli<sup>1</sup>

### **Responsabili scientifici**

Biancamaria Pietrangeli<sup>1</sup>, Fabrizio Adani<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Inail, Settore Ricerca, Dipartimento innovazioni tecnologiche e sicurezza degli impianti, prodotti e insediamenti antropici

<sup>2</sup> Inail, Consulenza tecnica per la salute e la sicurezza

<sup>3</sup> Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze agrarie, Agroenergia - Gruppo RICICLA

<sup>4</sup> Sapienza, Università di Roma, Dipartimento Chimica e Tecnologie del Farmaco

## **per informazioni**

**Inail** - Dipartimento innovazioni tecnologiche e sicurezza degli impianti, prodotti e insediamenti antropici  
via Roberto Ferruzzi, 38/40 - 00143 Roma  
dit@inail.it  
**www.inail.it**

© 2023 Inail

ISBN 978-88-7484-819-5

Gli autori hanno la piena responsabilità delle opinioni espresse nella pubblicazione, che non vanno intese come posizioni ufficiali dell'Inail.

Le pubblicazioni vengono distribuite gratuitamente e ne è quindi vietata la vendita nonché la riproduzione con qualsiasi mezzo. È consentita solo la citazione con l'indicazione della fonte.

# Progetto Inail Bric 2019 - ID 53 "Monitoraggio e valutazione degli impatti di bioraffinerie microalgali"

## Responsabili scientifici

Prof. Fabrizio Adani

Università degli Studi di Milano - Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali- Produzione, Territorio, Agroenergia.  
Gruppo RICICLA

Dott.ssa Biancamaria Pietrangeli

Inail, Settore Ricerca, Dipartimento innovazioni tecnologiche e sicurezza degli impianti, prodotti e insediamenti antropici



## Premessa

L'attività di ricerca del Laboratorio X "Sicurezza delle tecnologie per lo sviluppo sostenibile" del Dipartimento Innovazioni Tecnologiche (Dit) dell'Inail nel settore delle biotecnologie industriali (white biotech), è focalizzata sugli aspetti di salute e sicurezza sul lavoro ed esamina, in particolar modo, gli impianti ed i processi biotecnologici.

Nell'ambito della Ricerca scientifica del Piano di attività 2019-2021 dell'Inail, il Laboratorio X ha proposto due progetti Bric, inerenti alcuni aspetti complementari per lo sviluppo in sicurezza di bioprocessi secondo modelli di economia circolare. L'obiettivo è quello di definire protocolli per la valutazione ed il controllo dei rischi professionali di bioprocessi innovativi nei settori delle bonifiche sostenibili (Bric 2019-Id 52) e delle bioraffinerie di terza generazione da microalghe (Bric 2019-Id 53).

Effettuare le bonifiche, riqualificare siti orfani, costituisce un capitolo importante della transizione ecologica ed in tale contesto il sistema produttivo ha sviluppato azioni sul territorio che vanno nella direzione di un recupero di siti ed una riconversione industriale, investendo in tecnologie ecosostenibili per produrre beni innovativi e di elevata qualità ambientale. Al termine delle operazioni di risanamento ambientale è possibile lo sviluppo di nuovi processi industriali ecosostenibili, come ad esempio, le bioraffinerie, per la produzione di prodotti ad alto valore aggiunto, valorizzando biomasse, quali reflui e rifiuti, in un'ottica di economia circolare.

Attualmente è crescente l'interesse nell'impiego delle microalghe che contribuiscono, direttamente o indirettamente, a tutti i 17 obiettivi per lo sviluppo sostenibile elencati nella, ormai celebre, Agenda 2030 delle Nazioni Unite, approvata nel 2015 e ratificata da tutti gli Stati membri. Il principale contributo delle microalghe è chiaro nell'Obiettivo 6 "Acqua pulita e servizi igienico-sanitari", nell'Obiettivo 7 "Energia accessibile e pulita" e nell'Obiettivo 13 "Azione per il clima". Inoltre, le microalghe rivestono un ruolo significativo nell'economia circolare, come piattaforme biotecnologiche (bioraffinerie di terza generazione) per la produzione di prodotti di alto valore, quali intermedi biochimici, bioplastiche e biocarburanti. Trovare nuovi modi per riutilizzare l'anidride carbonica in processi industriali è strategico per ridurre le emissioni di gas climalteranti utilizzando approcci di economia circolare. Nel caso delle applicazioni microalgali, attraverso il processo naturale di fotosintesi, le molecole di anidride carbonica vengono biofissate da parte delle microalghe, coltivate in modo intensivo all'interno di fotobioreattori o in open ponds. La tecnologia apre la possibilità da un lato di contribuire a ridurre le emissioni,

sfruttandole per la crescita delle coltivazioni algali, dall'altro di occupare aree non valorizzabili a scopi agricoli. Un ulteriore beneficio sta nelle opportunità di sviluppo locale conseguente all'attivazione di progetti imprenditoriali basati su questi impianti.

Alla luce dei vantaggi offerti dall'applicazione di bioprocessi innovativi e dal contesto normativo, europeo e nazionale, a supporto di un nuovo modello di sviluppo industriale, è necessario che venga garantita la conformità del settore ai più elevati standard di sicurezza. La corretta progettazione e gestione degli impianti è condizione necessaria per garantire la tutela dell'ambiente e dei lavoratori con la definizione di modelli di approccio alla valutazione della sicurezza a partire da specifici casi-studio di sperimentazione industriale o preindustriale.

L'adozione di adeguate misure di prevenzione e protezione e di sistemi di controllo e monitoraggio dei processi permettono di contenere l'esposizione professionale agli agenti di rischio e perciò di tutelare la salute e la sicurezza del lavoratore.

In tale contesto si colloca il progetto Inail Bric 2019 - ID 53 "Monitoraggio e valutazione degli impatti di bioraffinerie microalgali", che ha avuto l'obiettivo primario di fornire un quadro delle aree di impatto sull'uomo e sull'ambiente degli impianti per la produzione di biomassa micro-algale e delle bioraffinerie ad essi collegate, evidenziando gli indicatori da utilizzare e le relative modalità di misura.

Partendo da una rassegna degli impianti produttivi di microalghe al 2022, si è focalizzata l'attenzione sui sistemi produttivi maggiormente in uso evidenziandone le relative caratteristiche strutturali e funzionali in base al prodotto finale di interesse. Attualmente, i sistemi aperti sono i più utilizzati per produrre biomassa a basso costo, mentre i reattori chiusi vengono impiegati esclusivamente per produrre componenti/ biomassa di alto valore. Sono stati quindi analizzati gli impatti ambientali ed occupazionali degli impianti di coltivazione delle microalghe, con particolare riguardo al biohazard professionale, quale pericolo maggiormente percepito dai gestori degli impianti. A tale scopo sono stati studiati due sistemi raceway su scala dimostrativa e due impianti su scale reale, dedicati, rispettivamente, alla produzione di Spirulina per il settore alimentare e al trattamento di acque reflue civili. Il progetto ha prodotto nuove evidenze sperimentali e dati derivanti dal monitoraggio di tali impianti microalgali rispetto agli indicatori identificati.



# Indice

<b>LISTA ACRONIMI</b>	9
<b>1. INTRODUZIONE</b>	11
<b>2. RASSEGNA DEGLI IMPIANTI PRODUTTIVI DI MICROALGHE</b>	15
<b>3. SISTEMI PRODUTTIVI IN USO PER LA COLTIVAZIONE E LAVORAZIONE DELLE MICROALGHE</b>	19
<b>3.1 SISTEMI APERTI</b>	19
<i>Circular Ponds</i>	20
<i>Impianti esistenti</i>	21
<i>Raceway Ponds</i>	21
<i>Impianti esistenti</i>	22
<i>Thin Layers Cascade Reactors</i>	22
<i>Impianti esistenti</i>	23
<b>3.2 SISTEMI CHIUSI</b>	24
<i>Tubular Photobioreactors</i>	24
<i>Impianti esistenti</i>	26
<i>Column Photobioreactors e Sleeve Bags</i>	26
<i>Impianti esistenti</i>	27
<i>Flat Panel Photobioreactors</i>	27
<i>Impianti esistenti</i>	28
<b>3.3 SISTEMI IBRIDI</b>	28
<b>3.4 SISTEMI IMMOBILIZZATI</b>	28
<b>4. RACCOLTA DELLA BIOMASSA ALGALE</b>	29
<b>4.1 BIOMASSA DI ALTO VALORE</b>	29
<i>Filtrazione</i>	29
<i>Centrifugazione</i>	29
<i>Processo di filtrazione a membrana</i>	30
<b>4.2 BIOMASSA DI BASSO VALORE</b>	30
<i>Sedimentazione e flocculazione</i>	30
<i>Dissolved Air Flotation</i>	30
<b>5. LAVORAZIONE DELLA BIOMASSA MICROALGALE</b>	31
<b>5.1 DISIDRATAZIONE</b>	31
<b>5.2 DISTRUZIONE CELLULARE ED ESTRAZIONE ATTIVA</b>	33
<b>6. IMPATTI AMBIENTALI ED OCCUPAZIONALI DEGLI IMPIANTI DI COLTIVAZIONE DELLE MICROALGHE</b>	36
<b>6.1 RISCHI SANITARIO-AMBIENTALI</b>	37
<i>Impatti odorigeni</i>	38
<i>Sistemi di coltivazione di microalghe</i>	40
<i>Sistemi di trattamento di acque reflue con microalghe</i>	44
<b>6.2 RISCHI PROFESSIONALI</b>	46
<i>Sistemi di coltivazione di microalghe</i>	46
<i>Trattamenti della biomassa e impiego di solventi di estrazione</i>	47
<i>Estrazione con solvente</i>	47

	<i>Estrazione supercritica di CO2</i>	49
	<i>Estrazione tramite liquidi ionici</i>	49
	<i>Estrazione dell'olio dalla biomassa algale umida</i>	49
	<i>Sistemi di trattamento di acque reflue con microalghe</i>	51
<b>6.3</b>	<b>IL BIOHAZARD AMBIENTALE ED OCCUPAZIONALE NEGLI IMPIANTI DI MICROALGHE</b>	53
<b>7.</b>	<b>CASI STUDIO</b>	57
<b>7.1</b>	<b>IMPIANTI SU SCALA DIMOSTRATIVA</b>	57
	<i>Risultati</i>	58
	<i>Composizione della comunità eucariotica</i>	59
	<i>Composizione della comunità batterica</i>	62
	<i>Screening delle specie potenzialmente patogene</i>	65
<b>7.2</b>	<b>IMPIANTI SU SCALA REALE</b>	69
	<i>Impianto su scala reale per la produzione di Spirulina</i>	69
	<i>Impianto per il trattamento di acque reflue urbane</i>	70
	<i>Risultati</i>	71
<b>7.2.1</b>	<b>STUDIO DELLA CITOTOSSICITÀ DELLE MICROALGHE COLTIVATE NEI RW OGGETTO DELLO STUDIO</b>	74
	<i>Saggio biologico di tossicità algale in vivo</i>	75
	<i>Saggio di citotossicità algale in vitro</i>	76
<b>8.</b>	<b>IL CONTROLLO DEL BIOHAZARD NEGLI IMPIANTI DI COLTIVAZIONE DELLE MICROALGHE</b>	79
<b>9.</b>	<b>STRUMENTO DI CALCOLO PER LA VALUTAZIONE DEGLI IMPATTI AMBIENTALI DEGLI IMPIANTI DI MICROALGHE</b>	84
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONI DEL PROGETTO</b>	87
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	88
	<b>ALLEGATO 1</b>	110
	<b>FONTI DELLE IMMAGINI</b>	112

## Lista acronimi

DO: dissolved Oxygen (ossigeno disciolto)

CP: circular ponds (stagni circolari)

RW: raceway ponds (stagni a canaletta)

TLC: thin layers cascade reactors (reattori a cascata a strati sottili)

tPBR: tubular photobioreactors (fotobioreattori tubolari)

cPBR: column photobioreactors (fotobioreattori a colonna)

SB: sleeve bags (sacchetti a manica)

fpPBR: flat panel (plate) photobioreactors (fotobioreattori a pannello piatto (piastre)).

DAF: dissolved air flotation (flottazione ad aria disciolta)

PCR: polymerase chain reaction (reazione a catena della polimerasi)

qPCR: quantitative polymerase chain reaction (reazione a catena della polimerasi quantitativa)

WGS: whole genome sequencing (sequenziamento dell'intero genoma)

F-RW: fertilizer-fed raceway (raceway alimentato con acque e fertilizzante)

WW-RW: waste water-fed raceway (raceway alimentato con acque reflue civili)

NGS: next generation sequencing (sequenziamento genetico di nuova generazione)

DPI: dispositivi di protezione individuale

RPE: respiratory protective equipment (dispositivi di protezione delle vie respiratorie)



## 1. Introduzione

Le microalghe sono microrganismi presenti in tutti gli ecosistemi della terra e svolgono un ruolo fondamentale in natura: generano nell'oceano il 50% dell'ossigeno di cui gli esseri umani hanno bisogno, assorbono circa il 25% delle emissioni di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) e catturano circa il 90% del calore in eccesso. Grazie alla presenza di clorofilla, esse assorbono la luce solare e assimilano la CO<sub>2</sub> dall'aria ed i nutrienti dagli habitat acquatici (composti azotati e fosfatici principalmente), per produrre lipidi, proteine e carboidrati. Questi microrganismi fotosintetici, grazie alla loro semplice struttura, sono in grado di crescere rapidamente e vivere in diverse condizioni ambientali, sia acquatiche che sub-areali. Hanno una efficienza fotosintetica, corrispondente alla percentuale di energia solare che può essere immagazzinata in energia chimica, dell'ordine del 3-8%, rispetto allo 0,5% delle piante terrestri. La loro velocità di crescita è ben superiore a quella delle piante agricole e ciò comporta che siano sufficienti aree di minor estensione per ottenere una data quantità di prodotto rispetto a quelle necessarie per le colture tradizionali. Le microalghe possono inoltre crescere in acque reflue e presentano elevate capacità di rimozione d'inquinanti e sostanze tossiche dalle acque di scarico, nonché in territori non sfruttabili per l'agricoltura.

Alcune microalghe posseggono un elevato potere nutrizionale e grandi proprietà ricostituenti grazie all'alto contenuto in proteine (fino a 60-70%, rispetto al 40% della carne e 26 % del latte) carboidrati (fino al 30-40%), iodio, ferro, calcio, vitamine (A, B1, B2, B12 e C) e acidi grassi (10-20%). Vengono coltivate, raccolte ed essiccate e trasformate in polvere e così conservate a lungo e utilizzate poi nella preparazione di prodotti alimentari di facile consumo, come pane, pasta, biscotti o bevande. I residui delle lavorazioni possono trovare spazio come biofertilizzanti e biostimolanti in agricoltura e ciò offre un ulteriore contributo alla sostenibilità del loro impiego.

Per tutte queste caratteristiche, unitamente alla loro elevata biodiversità, e alla capacità di produrre un'ampia gamma di molecole, le microalghe sono quindi considerate una risorsa rinnovabile, sostenibile ed economica, dimostrando di avere un grande potenziale nei processi di bioraffineria, per la produzione di biocarburanti e di molecole d'interesse per i settori farmaceutico e alimentare (es. peptidi, pigmenti, carotenoidi, probiotici), che trovano un numero crescente di impieghi sul mercato (Figura 1). Fra i prodotti di maggiore interesse spiccano il  $\beta$  carotene, l'astaxantina, la vitamina B12, gli acidi grassi polinsaturi, omega 3-DHA e omega 6, e altre biomolecole ad alto valore nutraceutico (Khan et al., 2018; Hussain, 2020; Olguin EJ et al., 2022; Ampofu J et al., 2022).

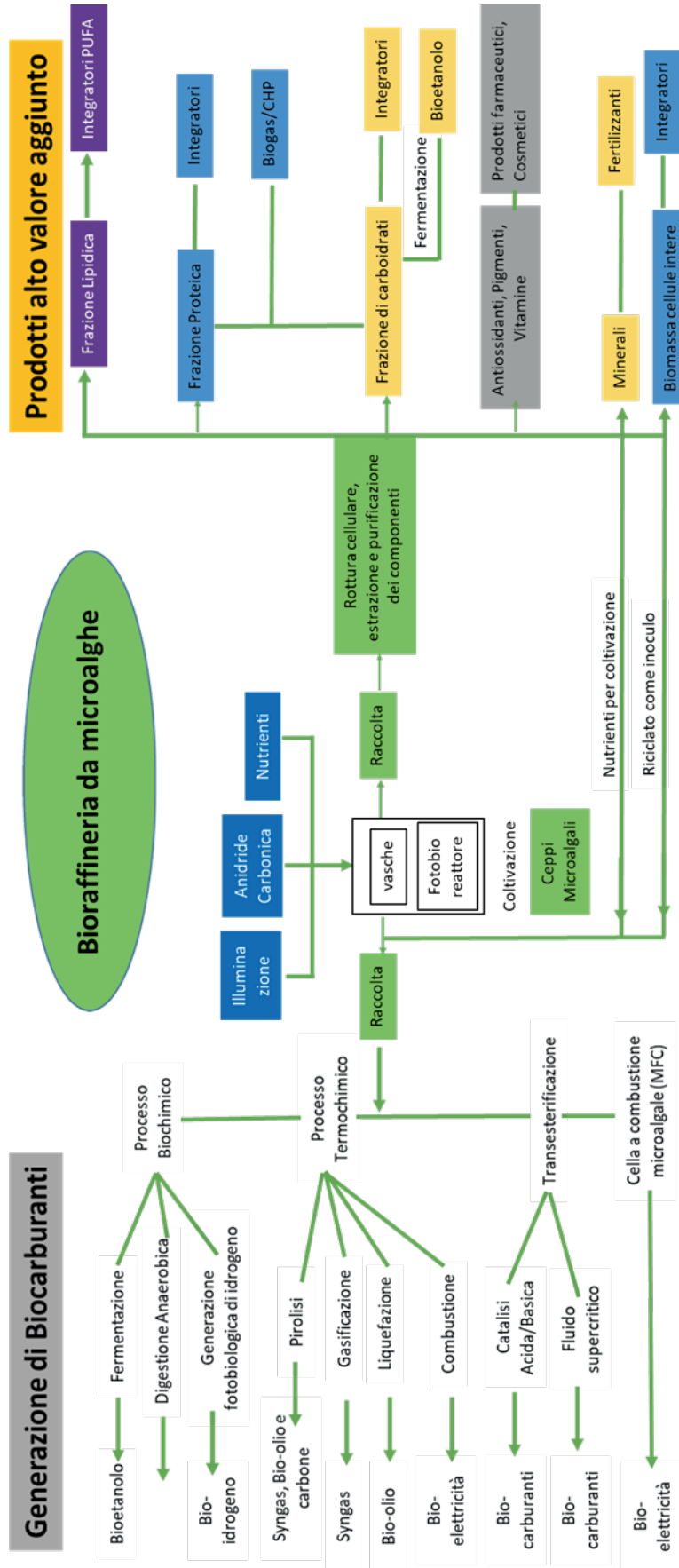


Figura 1. Bioraffinerie microalgali (Fonte: Bhattacharya e Goswami, 2020, mod).

Esistono più di 50.000 specie di microalghe, raggruppabili in procariote (Cyanobacteria), eucariote (Chlorophyta) e diatomee (Bacillariopyta), caratterizzate da un contenuto lipidico che varia dal 20 al 70% e in determinate condizioni alcune specie possono raggiungere anche il 90% e questo rende di interesse la loro coltura per la produzione di biodiesel di terza generazione. Le microalghe mostrano, infatti, valori più elevati in resa di olio rispetto ad altre colture oleaginose (circa 59.000-137.000 L/ha, a seconda del contenuto lipidico). Confrontando le efficienze di produzione e di uso del suolo per il biodiesel prodotto dalle microalghe e da altre colture oleaginose, risulta infatti evidente che le microalghe sono le più vantaggiose sia in termini di rendimento in olio che per l'elevata produttività in biodiesel (da 52.000 a 120.000 kg di biodiesel/ha) e allo stesso tempo richiedono una minore estensione di suolo (anche 49-132 volte minore di quella richiesta dalla coltivazione del colza e della soia) (Amicarelli et al., 2012). A valle dell'estrazione dell'olio forniscono biomassa esausta, che può essere recuperata per generare calore, vapore o elettricità.

Nonostante i numerosi vantaggi, la realizzazione di sistemi di produzione di biodiesel da microalghe su scala industriale presenta attualmente alcuni limiti evidenti, legati a criticità non ancora risolte, quali:

- le basse efficienze fotosintetiche, impiegando le attuali tecnologie;
- un bilancio totale di energia negativo, se si considera il pompaggio dell'acqua, l'aggiunta di nutrienti, i processi di separazione ed estrazione dell'olio;
- le difficoltà nella scelta della specie microalgale più adatta a bilanciare la produzione di biodiesel e di co-prodotti di valore, al fine di migliorare l'economicità del processo.

Tutti questi aspetti rendono non ancora competitivi i costi del biodiesel da microalghe rispetto alla produzione da fonti non rinnovabili.

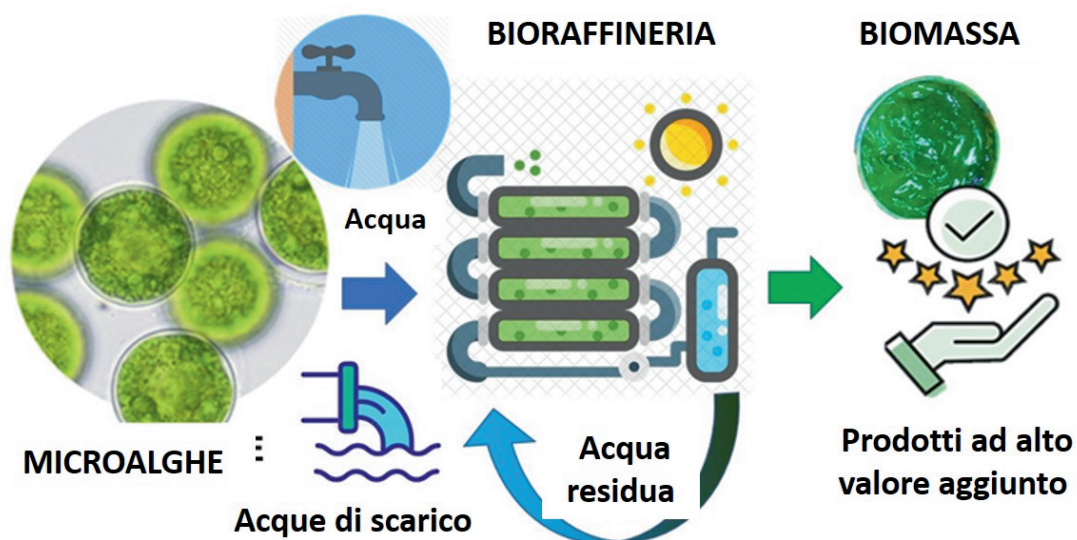
Secondo il rapporto dell'Agenzia europea dell'ambiente (EEA, 2002), il trattamento delle acque reflue con le microalghe costituisce una promettente tecnologia per il recupero dei nutrienti ed il riutilizzo dell'acqua trattata, coerentemente con i principi di economia circolare, in accordo con gli obiettivi del Green Deal europeo (Olabi AG., 2023).

Gli effluenti provenienti dal trattamento primario delle acque reflue sono infatti ancora carichi di azoto e fosforo inorganici, che causano fenomeni eutrofici, molecole organiche refrattarie e metalli pesanti. L'impiego delle microalghe su tali reflui fornisce un biotratamento terziario, per la rimozione dalle acque di azoto inorganico e fosforo, dei metalli pesanti, per bioadsorbimento e bioaccumulo, e di alcuni composti organici tossici e nel contempo, permette di produrre biomassa che può essere valorizzata (Kumar et al., 2022).

La tecnica di depurazione delle acque reflue attraverso l'impiego delle microalghe risulta efficace, paragonabile ai trattamenti tradizionali e di sicuro interesse da un punto di vista economico (Mohsenpour et al., 2021). Il processo si basa sulla

conversione da parte delle comunità batteriche della sostanza organica in anidride carbonica, che viene rilasciata nel sistema. Le microalghe consumano l'anidride carbonica prodotta dai batteri e la convertono in biomassa attraverso il processo di fotosintesi. Un prodotto secondario del processo è l'ossigeno, che permette di superare la necessità di aerazione meccanica, tipica dei sistemi di depurazione delle acque reflue. Il processo algale-batterico, non solo elimina il fabbisogno energetico di aerazione, ma sequestra azoto e fosforo dall'acqua, evitando possibili effetti ambientali di eutrofizzazione. La conversione del carbonio contenuto nelle acque reflue in biomassa permette la sua successiva valorizzazione per la produzione di svariati prodotti nei processi di bioraffinazione.

In tale contesto le microalghe costituiscono una opportunità per la gestione integrata delle risorse idriche permettendo di depurare le acque reflue con un minor consumo energetico e, quindi, aumentare la sostenibilità del processo (Li et al., 2019; Herrera et al., 2021; Molina Grima et al., 2022). (Figura 2).



**Figura 2.** Impiego delle microalghe per il trattamento delle acque reflue di diversa origine (Fonte: Olguin EJ et al., 2022, mod).

Un approccio innovativo nella gestione delle acque reflue dovrebbe comprendere non solo grandi impianti di trattamento, che possono fornire notevoli efficienze di scala, ma anche il trattamento decentralizzato delle acque reflue che può consentire la circolarità a livello locale. Garantire approcci flessibili per soddisfare gli standard di qualità richiesti può incentivare l'innovazione e indurre ad adottare soluzioni appropriate a livello locale, in funzione delle risorse finanziarie, la disponibilità di terra, la densità di popolazione, la natura delle acque da trattare e le diverse attività industriali del territorio.



## 2. Rassegna degli impianti produttivi di microalghe

Nell'ambito del progetto, è stata predisposta una lista dei principali impianti produttivi di microalghe europee ed extraeuropee. La lista comprende 66 aziende, tra cui alcuni grandi player extraeuropei (Allegato 1). Da tale rassegna si evidenziano i segmenti di produzione, per scopi alimentari e non, generalmente corrispondenti a prodotti ad alto e medio basso valore aggiunto ed il tipo di sistema produttivo (configurazione impiantistica ed attrezzature).

Per meglio comprendere la realtà degli impianti di microalghe e i dettagli di ogni sistema produttivo, è stata elaborata una rassegna attraverso la predisposizione di un questionario per fare una ricognizione:

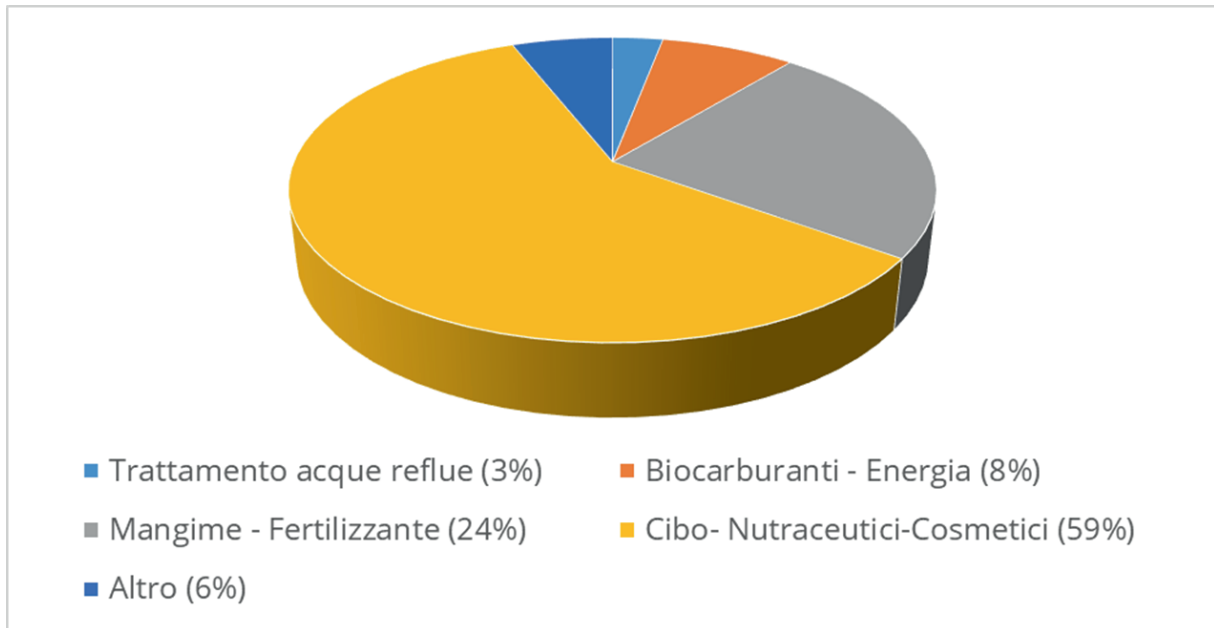
- delle tecnologie produttive attraverso l'impiego di microalghe;
- dei rischi reali e percepiti dai gestori degli impianti, dal punto di vista dell'impatto ambientale e della salute e sicurezza occupazionale;
- dei sistemi di contenimento e di prevenzione rispetto a tali rischi;
- delle legislazioni cui ogni impianto specificatamente si attiene.

Il questionario è stato inviato agli impianti identificati e diffuso, attraverso canali informatici, agli stakeholder della European Algae Biomass Association (EABA). Il questionario ha ricevuto un basso numero di risposte spontanee, nonostante l'elevato numero di aziende contattate. Questo risultato è probabilmente dovuto in parte al fatto che il questionario non viene percepito come utile per la mission aziendale e in parte al fatto che le aziende sono restie, in questo settore molto innovativo e competitivo, a dare informazioni sui loro prodotti e tecnologie, se non attraverso contatti personali.

Allo scopo di integrare le informazioni desumibili dai questionari, sono state contattate direttamente le aziende con cui era possibile avviare una relazione diretta e sono stati intervistati gli esperti del settore che hanno esperienza diretta con i maggiori player. Il lavoro ha consentito di censire, per gli aspetti principali, e senza entrare nel merito dei dati riservati delle industrie, un campione di 66 impianti. La dimensione del campione ha permesso di delineare il sistema produttivo attuale. Dai dati raccolti risulta che circa il 60% delle aziende censite è impegnata nella produzione di prodotti ad alto valore aggiunto, legati a alimentazione, nutraceutica e cosmetica (Figura 3).

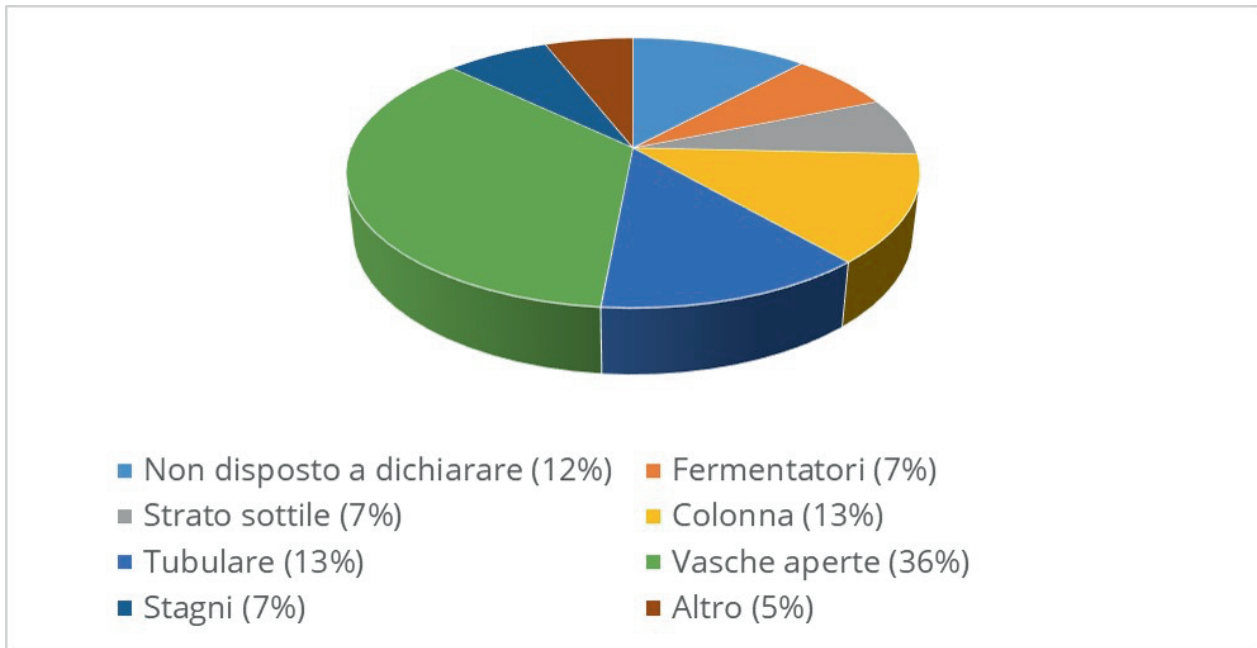
Circa il 24% delle aziende lavora su un settore di minor valore, come la produzione di fertilizzanti, biostimolanti (prodotti per l'agricoltura) e mangimi o integratori per mangimistica. Il 3% delle aziende utilizza la tecnologia a microalghe per il trattamento delle acque di depurazione, con recupero della biomassa algale a fini fertilizzanti ed

infine l'8% delle aziende dichiara di avere una produzione o una linea di ricerca per la produzione di biocarburante da microalghe. È da segnalare che le aziende impegnate sul fronte biocarburanti sono soprattutto extraeuropee, mentre le realtà europee (come ENI) sembrano avere solo una linea di ricerca, caratterizzata, per il momento, da un Technology Readiness Level (TRL) inferiore a 5.



**Figura 3.** Uso della biomassa algale nelle aziende oggetto di indagine

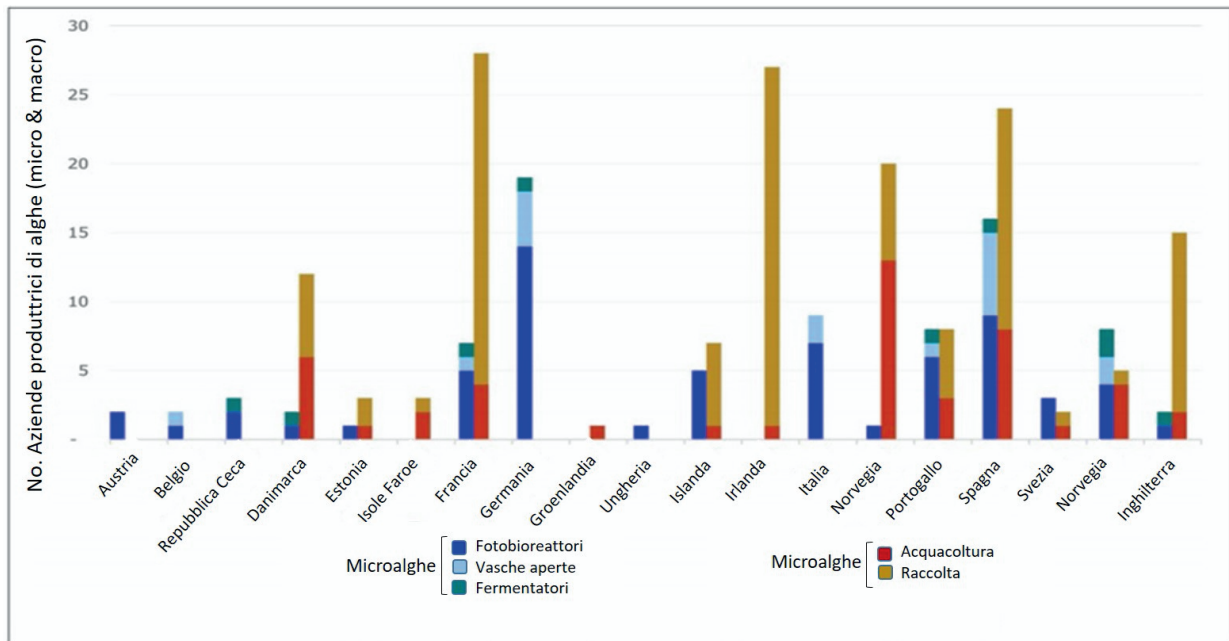
Per quanto riguarda la tipologia di produzione, circa il 50% ha un impianto aperto (ponds, raceway o thin layer), compatibile sia con la produzione alimentare della microalga Spirulina che di biostimolanti e fertilizzanti, mentre il 38% ha diverse tipologie di impianto chiuso. Circa il 12% delle imprese non dichiara e non intende divulgare la propria tecnologia di produzione (Figura 4).



**Figura 4.** Tipologia di sistema produttivo nelle aziende oggetto di indagine

Dai dati dell'indagine condotta, allo stato attuale risulta limitata la valorizzazione degli stream di scarto, quali acque reflue e anidride carbonica da combustione. Tali recuperi sono limitati al settore non food (anche a causa di normative molto stringenti nella produzione di biomassa destinata al settore food), al trattamento delle acque reflue (Aqualia, Spagna – quarta più grande società di gestione dell'acqua in Europa) e alla produzione di biostimolanti, bio-fertilizzanti e biocarburanti (per ora in Europa a livello sperimentale). Dalla ricognizione fatta sono risultate poche le aziende in Europa che adottano un sistema di recupero delle acque reflue per la produzione di biomassa algale (3 aziende identificate con circa 5 impianti).

I dati raccolti nell'ambito del progetto concordano con quanto riportato in un lavoro che ha previsto un censimento da parte del Joint Research Centre (JRC) della Commissione europea (Araújo et al 2021). Lo studio ha individuato in Europa 74 impianti che coltivano microalghe (produzione totale di 220 ton/anno) e 222 impianti che coltivano la microalga Spirulina (produzione di 142 ton/anno, impianti molto piccoli, taluni con produzioni quasi familiari) (Figura 5).



**Figura 5.** Distribuzione delle tipologie produttive attraverso l'impiego di microalghe (esclusa la produzione di Spirulina) (Fonte: Araújo et al., 2021, mod).

Gli impianti di produzione di Spirulina adottano un sistema di produzione abbastanza comune: crescita delle alghe in raceway ponds in struttura protetta (serra), raccolta delle microalghe con vagli, trafilatura della biomassa concentrata e infine essiccamento a bassa temperatura (riscaldamento e ventilazione). Sempre secondo tale studio, e come verificato anche dal censimento svolto, le altre tipologie di microalghe vengono prevalentemente coltivate in reattori chiusi di diverse tipologie.

### 3. Sistemi produttivi in uso per la coltivazione e lavorazione delle microalghe

Secondo la letteratura, l'indagine sugli impianti e le interviste ad esperti del settore, il tipo di modello di produzione dipende dai prodotti o dalle funzioni desiderati. Attualmente, i sistemi aperti sono i più utilizzati per produrre biomassa a basso costo, mentre i reattori chiusi vengono utilizzati solo per produrre componenti/biomassa di alto valore (Benemann, 2013). Alcune produzioni di beni d'uso alimentare vengono eseguite anche in sistemi aperti quando le condizioni ambientali prevengono il rischio di contaminazione della coltura.

La coltivazione (sia in sistema aperto che chiuso) è seguita da step di raccolta, che possono essere articolati in un'unica fase o in fasi diverse con più dispositivi. Dopo la raccolta, la biomassa algale alimentare viene generalmente essiccata per essere immagazzinata e venduta o ulteriormente lavorata. D'altra parte, la biomassa algale destinata ad essere utilizzata come biostimolante o biofertilizzante non viene essiccata, ma semplicemente immagazzinata o idrolizzata ottenendo aminoacidi liberi.

#### 3.1 Sistemi aperti

I sistemi di coltivazione a open ponds ("stagno aperto") sono i metodi più antichi e semplici per coltivare microalghe su vasta scala. In generale i sistemi aperti, rispetto a quelli chiusi, presentano una maggior facilità di costruzione, con un effetto positivo sui costi di impianto. In questi sistemi, la produttività delle alghe varia da 5 a 50 g di peso secco della biomassa cellulare (DCW)  $m^{-2}$  giorno<sup>-1</sup> (Rawat et al., 2013). Il 98% della biomassa algale per prodotti nutrizionali o per biocarburanti è prodotta all'interno di questi sistemi (Benemann, 2008; Wen e Johnson, 2009). Gli open ponds sono collocati in fosse scavate o in superficie e vengono possibilmente coperti da una serra per evitare contaminazioni esterne. Sono generalmente utilizzati in modalità batch o semicontinua (Ahmad et al., 2017).

I vantaggi dei sistemi aperti sono i bassi costi, la facilità di manutenzione, l'elevato utilizzo della luce, i buoni tassi di scambio di gas, la facilità di funzionamento e la possibilità di scalabilità. Tuttavia, in questi sistemi è impossibile impedire il contatto delle alghe con potenziali organismi "predatori". Sono infatti caratterizzati da un alto rischio di contaminazione e da elevate perdite per evaporazione. Questi sistemi richiedono superfici molto estese per la realizzazione delle condizioni di reazione, poiché lo spessore dello strato limita la permeazione della luce (Jerney e Spillin, 2020) (Tabella 1).

I principali sistemi aperti commercialmente utilizzati sono i circular ponds (stagni circolari, CP), i raceway ponds (stagni a canaletta, RW) e i thin layers cascade reactors (reattori a cascata a strati sottili, TLC). Sono tuttavia presenti anche altri allestimenti quali: stagnant pond system (sistema stagno stagnante), floating ponds (vasche galleggianti), bacini artificiali poco profondi o acque naturali.

**Tabella 1.** Confronto delle caratteristiche tra sistemi aperti e chiusi  
(Fonte: Lösing, 2011 mod).

Parametri	Fotobioreattori chiusi	Vasche aperte
Area di illuminazione	Grande	Piccola
Percorso luminoso	Piccolo	Lungo
Produttività	Alta	Bassa
Concentrazione di biomassa	Alta	Bassa
Area richiesta	Bassa	Alta
Consumo di acqua	Praticamente nessuno	Alto, a causa dell'evaporazione
Consumo di Anidride Carbonica	Basso	Alto, scambio diretto con ambiente
Rischio di contaminazione	Molto basso	Alto
Flessibilità verso specie coltivabili	Nessuna restrizione	Bassa, solo specie selezionate
Progetto	Complesso	Semplice
Costi	Alti	Bassi
Manutenzione	Intensiva	Semplice
Realizzazione su larga scala	Difficile	Possibile
Controllo di processo	Buono	Difficile
Suscettibilità ambientale	Dipendente solo dalla disponibilità di luce	Molto dipendente dalle condizioni esterne

### *Circular Ponds*

I circular ponds (CP) sono stati i primi stagni artificiali ad essere utilizzati su larga scala (Tan et al., 2020). Sono composti da una vasca circolare con un diametro generalmente di 45 m (fino a 50 m), una profondità di 10-70 cm e con un volume massimo di  $1,5 \times 10^4$  L, al cui centro è tipicamente posizionato un agitatore rotante (Shen et al., 2009; Borowitzka, 2013). La dimensione di questi sistemi è generalmente progettata in modo tale da evitare la sedimentazione della biomassa e per limitare l'energia utilizzata dall'agitatore (Lee et al., 2001; Tredici, 2004; Borowitzka, 2005; Show et al., 2017).

La produttività dei CP è nell'intervallo di 1.6-21.5 (g di peso secco  $m^{-2}$  giorno $^{-1}$ ) (Kanazawa et al., 1958; Tsukuda et al., 1977). I costi del CP sono paragonabili a quelli

dei raceways ponds e di impianti per il trattamento aerobico delle acque reflue. Se da una parte, i CP sono caratterizzati da bassi costi di costruzione e manutenzione, da facilità d'uso e bassi input energetici, dall'altra richiedono un'ampia area per la costruzione. I CP sono efficaci per la coltivazione di biomassa algale anche se consentono uno scarso controllo delle condizioni di coltura con un alto rischio di contaminazione. Il loro uso è quindi limitato a ceppi forti con produttività limitata. La miscelazione è ridotta rispetto ai RW (Borowitzka, 1999).

### *Impianti esistenti*

I CP sono comunemente usati nel Sud-est asiatico (Indonesia, Giappone e Taiwan) per produzioni da destinare alla nutraceutica (Borowitzka e Moheimani, 2013). Tra gli esempi di impianti in esercizio vi è Chlorella Industry Co. in Giappone.

### *Raceway Ponds*

I raceway ponds (RW) sono stati proposti per la prima volta per il trattamento delle acque reflue negli anni '60 (Oswald e Golueke, 1968) e sono uno dei sistemi aperti più studiati (Vieira Costa et al., 2019). Attualmente i RW sono il tipo di reattore più utilizzato per la produzione di microalghe, con oltre il 90% della produzione globale, destinata prevalentemente al consumo umano (Weissman e Goebel, 1987).

Essi sono costruiti su terreno compattato ricoperto da polimeri, nonostante possa essere utilizzato anche il solo terreno compattato (Craggs et al., 2012). Sono generalmente costituiti da due canali (singolo loop) in cui la coltura viene fatta ricircolare da una ruota a pale (10-12 pale, con un diametro totale di quattro volte la profondità dell'acqua, che ruota a velocità di 10-20 rpm). I RW con loop multipli non sono consigliati a causa del maggior costo derivante dall'azionamento della ruota a pale per superare le maggiori perdite di pressione causate dalle curve aggiuntive. Il rapporto lunghezza/larghezza varia da 10 a 20, tuttavia sono preferibili rapporti inferiori per ridurre le perdite di pressione. I RW fino a 5.000 m<sup>2</sup> sono generalmente utilizzati su scala industriale, dimensioni superiori non sono realizzabili a causa delle grandi perdite di pressione. La profondità dell'acqua varia generalmente da 0,2 a 0,4 m (fino a 1 m), nonostante siano consigliabili profondità inferiori per aumentare la disponibilità della luce. Tuttavia, quando si trattano le acque reflue, sono raccomandabili profondità maggiori poiché la capacità di trattamento per tempo di residenza aumenta. La velocità dell'acqua varia da 0,2 a 0,3 m s<sup>-1</sup> per ridurre al minimo il consumo di energia senza consentire la sedimentazione. Il trasferimento di massa gas-liquido nel pozzetto può essere aumentato per migliorare la degassificazione (rimozione dell'ossigeno) e l'apporto di CO<sub>2</sub>. L'iniezione di gas ricchi di CO<sub>2</sub> è il metodo più utilizzato per fornire tale gas, ottimizzarne l'assorbimento e controllare il pH (de Godos et al., 2014). I RW sono in gran parte influenzati dalla temperatura ambientale. Design avanzati di RW sono stati perfezionati attraverso

l'aggiunta di pozzi di digestione anaerobica e stagni di maturazione (Craggs, 2005; Craggs et al., 2011).

In relazione alla produttività, in questi reattori vengono coltivati solo ceppi di microalghe robusti, a rapida crescita e tolleranti condizioni estreme (per esempio, *Spirulina*, *Chlorella* e *Dunaliella*). La concentrazione di biomassa rimane al di sotto di 1,0 g/l a causa dell'elevata profondità dell'acqua. Sebbene siano state riportate produttività di biomassa fino a 40 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> (equivalenti a 150 t ha<sup>-2</sup> y<sup>-1</sup>) (Lundquist et al., 2010), le produttività medie sono generalmente comprese tra 9-15 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> per la produzione di *Tetraselmis suecica* o *Nannochloropsis* sp. (Chiaramonti et al., 2013), 13 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> per la produzione di *Chlorella* (Hase et al., 2000), e 21 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> per la produzione di *Spirulina* (Vonshak e Guy, 1992).

I costi di investimento per questi sistemi vanno da 0,13 a 0,37 M€ ha<sup>-1</sup> su una scala di 100 ha (Chisti, 2012; Norsker et al., 2011). I RW sono soggetti a contaminazioni da altri microrganismi aumentando il rischio di cedimento e riducendo la produttività complessiva. Sono anche influenzati da ulteriori fattori esterni quali precipitazioni, presenza di polveri, inquinanti e contaminanti biologici. Non è inoltre possibile controllare la temperatura su larga scala, l'unica possibilità è aumentare la profondità dell'acqua per modificare l'inerzia termica. Inoltre, a causa della grande profondità dell'acqua e del basso movimento verticale delle cellule, non più del 25% del volume totale della coltura, ha irradiazione sufficiente a garantire la fotosintesi (Barceló-Villalobos et al., 2019a; Fernández-Del Olmo et al., 2017). Sono stati altresì segnalati problemi di accumulo di ossigeno disciolto (DO) (Weissman e Goebel, 1987; Marquez et al., 1995; Singh et al., 1995; Vonshak, 1997; Jiménez et al., 2003).

#### *Impianti esistenti*

Le strutture che producono microalghe in RW si trovano in tutto il mondo (per esempio, negli Stati Uniti, in Thailandia, Cina, Cile e Israele). Esempi di impianti esistenti sono: DIC LIFETEC Co., Ltd (Giappone) – Earthrise Nutritionals, LLC (California, USA), Hainan DIC Microalgae (Cina), Cyanotech Co. (Hawaii, USA), Parry Agro Industries Ltd (India), TAAU Australia Spirulina PTY Ltd, Thailandia Boonsom Farm, Nature Beta Technologies Ltd (Israele), Aurora Algae, Inc. (California, USA), Algae 4 Future (Portogallo), Biorizon Biotec (Spagna), Jiangxi Alga Biotech Co., Ltd. (Cina), Japan Algae (Giappone) e Pondicherry Spirulina Farms (India).

#### *Thin Layers Cascade Reactors*

I Thin Layers Cascade Reactors (TLC) sono stati sviluppati presso l'Istituto di Microbiologia di Třeboň, Repubblica Ceca (Šetlík et al., 1970), tuttavia il loro design non è stato ancora ottimizzato per la produzione su larga scala.



I TLC sono divisi in tre parti principali: la superficie o loop in cui avviene la fotosintesi, il serbatoio di ritenzione, in cui viene gestita la coltura e la pompa utilizzata per far ricircolare la coltura dal serbatoio alla superficie. Il serbatoio è progettato per immagazzinare il volume totale della coltura, prevenire fuoriuscite e assorbire CO<sub>2</sub>, quando fornita per il controllo del pH e l'apporto di carbonio. La superficie è leggermente inclinata (0,1-1,0%) per facilitare il flusso tramite gravità a velocità comprese tra 0,1-1,0 m s<sup>-1</sup>. La profondità dell'acqua è inferiore a 1 cm e l'efficienza di miscelazione e la velocità (0,5 m s<sup>-1</sup>) creano un rapido ciclo luce-buio che porta a concentrazioni elevate di biomassa (fino a 20 g l<sup>-1</sup>) (Masojídek et al., 2011). La lunghezza della superficie illuminata è determinata dalla concentrazione massima ammissibile di DO. Ad alta disponibilità di luce, dove il tasso di produzione di ossigeno è alto, è raccomandabile una lunghezza massima inferiore a 100 m (Morales-Amaral et al., 2015; Barceló-Villalobos et al., 2019b). Il principale meccanismo che contribuisce al raffreddamento è l'evaporazione dell'acqua, come per gli altri sistemi aperti.

La produzione della biomassa è una delle più elevate e può essere aumentata con adeguati sistemi progettuali e procedure operative (Barceló-Villalobos et al., 2019b). Si possono raggiungere concentrazioni di biomassa fino a 40-50 g l<sup>-1</sup>, con quantità di 55 g m<sup>-2</sup> prodotte durante l'estate anche nelle zone a clima temperato (Masojídek e Prášil, 2010). Sono stati riportati valori fino a 42 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> durante la produzione di *Scenedesmus* (Morales-Amaral et al., 2015), mentre valori da 23 a 38 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> sono stati registrati nei periodi estivi nella Repubblica Ceca con *Chlorella* utilizzando una profondità di 6-7 mm (Doucha e Lívanský, 2015; Doucha e Lívanský, 2006).

Il consumo di energia è correlato al dislivello tra il serbatoio e l'inizio delle piastre di coltivazione. I valori tipici riportati sono 1-10 W m<sup>-2</sup> (40-400 W m<sup>-3</sup>), maggiori rispetto ai reattori a canaletta, ma inferiori ai fotobioreattori tubolari. Il costo di costruzione è almeno cinque volte superiore a quello dei RW (Borowitzka e Moheimani, 2013). Il principale vantaggio di questo tipo di reattore è la minimizzazione della profondità dell'acqua con una massimizzazione della disponibilità della luce, della miscelazione e quindi della produttività della biomassa. Poiché la progettazione richiede ancora accorgimenti di ottimizzazione, possono verificarsi problemi legati al controllo del pH, al trasferimento di CO<sub>2</sub> e alla regolazione della temperatura (Barceló-Villalobos et al., 2019b).

#### *Impianti esistenti*

Sono state utilizzate solo alcune unità su scala pilota, mentre reattori fino a 100 m<sup>2</sup> sono stati installati presso l'Istituto di Microbiologia di Trebon (Repubblica Ceca) e ad Almeria (Spagna), fino a 900 m<sup>2</sup> a Rupite (Bulgaria) e fino a 1.500 m<sup>2</sup> a Pataias (Portogallo).

### 3.2 Sistemi chiusi

I sistemi chiusi sono caratterizzati da un buon controllo dei parametri di coltivazione delle microalghe permettendo una elevata produttività, ridotti rischi di contaminazione e perdite di anidride carbonica e consentendo una coltivazione riproducibile. D'altra parte, essi sono relativamente costosi da costruire e gestire, richiedono anche un sistema di raffreddamento e risultano difficilmente ampliabili (Jerney & Spillin, 2020). A causa dei loro costi elevati, i sistemi chiusi sono attualmente utilizzati per prodotti di alto valore (per esempio, cosmetici e nutraceutici). La massima produttività teorica è stimata nell'intervallo di 77-96 g di DCW m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> (Rawat et al., 2013).

I principali sistemi chiusi commercialmente utilizzati sono i tubular photobioreactors (fotobioreattori tubolari, tPBR), i column photobioreactors (fotobioreattori a colonna, cPBR), le sleeve bags (sacchetti a manica, SB) e i flat panel (plate) photobioreactors (fotobioreattori a pannello piatto (piastre), fpPBR). Sono presenti anche altre configurazioni meno comuni (ad es. membrane PBRs (PBR a membrana), biofilm based PBRs (PBR a biofilm), hybrid PBRs (PBR ibridi), torus PBRs (PBR toroidali) e reattori a serbatoio simil-fermentatore (Li et al., 2017; Johnson et al., 2018).

#### *Tubular Photobioreactors*

I Tubular Photobioreactors (tPBRs) sono stati inizialmente proposti per massimizzare la produttività delle colture di *Chlorella* (Little, 1953) e sono attualmente il design più comune e la tecnologia consigliata per produrre commercialmente biomassa di qualità per applicazioni di alto valore e per coltivare ceppi ad elevata sensibilità, quali, ad esempio, *Isochrysis*, *Phaeodactylum*, *Nannochloropsis*, *Tetraselmis*, *Porphyridium* e *Haematococcus* (Torzillo e Zittelli, 2015; Tredici et al., 2010).

I tPBRs sono caratterizzati da un collettore solare realizzato tramite tubi lungo i quali la coltura di microalghe ricircola, con una velocità di 0,4-1,0 m s<sup>-1</sup>, verso una colonna a bolle o serbatoio che riduce l'accumulo di ossigeno disciolto utilizzando una pompa centrifuga che fornisce l'energia necessaria per resistere alla caduta di pressione nel collettore solare. Il design dei tPBR è influenzato dalla distribuzione dei tubi nel collettore solare e dal diametro e dalla lunghezza dei tubi. È possibile selezionare diverse configurazioni (ad es. a serpentina/collettore, verticale/orizzontale ed elicoidale/piatta) per massimizzare l'efficienza di utilizzo della luce, la capacità di trasferimento di massa (i.e. desorbimento di ossigeno) e per controllare la temperatura (Brindley et al., 2016; Fernández et al., 2017; Torzillo et al., 2015; de Vree et al., 2015; Fernández-Sevilla et al., 2010; Richmond et al., 1993; Robinson et al., 1988; Tredici et al., 2010; Tredici e Zittelli, 1998). Per massimizzare le prestazioni sono necessari diametri di tubo piccoli, inferiori a 0,1 m (min. 0,03 m), nonostante la riduzione del diametro aumenti il consumo di energia (Molina et al., 2001). La

lunghezza massima del tubo è di 100 m per il collettore e 400 m per la serpentina per ridurre l'accumulo di ossigeno disciolto e limitare il volume complessivo di un singolo tPBR a 20 m<sup>3</sup> per unità. L'aria (0,1 v<sup>v</sup>-1 min<sup>-1</sup>) viene generalmente fornita alla colonna/serbatoio a bolle ed ottimizzata per massimizzare la capacità di desorbimento dell'ossigeno, mentre l'anidride carbonica (0,001 v<sup>v</sup>-1 min<sup>-1</sup>) viene fornita nel circuito per massimizzare l'assorbimento e efficienza di utilizzo (Camacho-Rubio et al., 1999; Fernández et al., 2017). È stata dimostrata l'applicazione di strategie di controllo per migliorare il pH-stat, la rimozione dell'ossigeno e per massimizzare l'efficienza e la produttività (Fernández et al., 2010; Pawlowski et al., 2014). È possibile regolare la temperatura attraverso sistemi di controllo del calore (es. nebulizzazione d'acqua e scambiatori di calore interni) (Ippoliti et al., 2016; Richmond et al., 1993). La concentrazione della biomassa è generalmente di 1,0-3,0 g l<sup>-1</sup>. Sono state riportate produttività di biomassa di 8-18 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> per *Isochrysis* (van Bergeijk et al., 2010; Ippoliti et al., 2016) di 18 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> per *Phaeodactylum* (Silva Benavides et al., 2013), e di 20-50 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> per *Scenedesmus* (Acién et al., 2012).

Il costo di riferimento per la biomassa algale (sulla base della sostanza secca) è calcolato a 290 € kg<sup>-1</sup> e 329 € kg<sup>-1</sup> rispettivamente per i tPBRs a luce artificiale e installati in serra (Oostlander et al., 2020). Il costo d'investimento per i tPBRs è di 0,51 M€ ha<sup>-1</sup> su una scala di 100 ha, due volte superiore a quello per i RW (Norsker et al., 2011). L'elevata velocità del liquido aumenta il consumo energetico dei tPBRs fino a 100-400 W m<sup>-3</sup>. Attualmente, una riduzione del costo del 92% potrebbe essere ottenuta aumentando le dimensioni da 25 a 1500 m<sup>2</sup> per tPBR nelle serre (Oostlander et al., 2020).

Poiché i tPBR sono chiusi e la concentrazione di biomassa è maggiore, gli svantaggi derivanti dalla contaminazione e il rischio di guasto sono ridotti (Carney et al., 2014; Forehead e O'Kelly, 2013). I tPBR sono utili per produrre ceppi sensibili, poiché l'affidabilità è maggiore a causa delle maggiori concentrazioni di biomassa e del più elevato livello di controllo dei parametri di coltura. La produzione riportata per i tPBRs è simile a quella per i RW, tuttavia i primi consentono un migliore controllo delle condizioni di coltura. Nei tPBR non è possibile regolare completamente le condizioni della radiazione solare e della temperatura negli allestimenti all'aperto e, anche in tPBR progettati in modo ottimale, la produttività della biomassa è ridotta di un terzo del massimo, a causa della variazione delle condizioni ambientali (Ippoliti et al., 2016). La minore profondità dell'acqua e la maggiore velocità del liquido dei tPBR rispetto ai RW, consentono di aumentare la frequenza della luce, innalzando la produttività della biomassa (Brindley et al., 2016; Fernández-Del Olmo et al., 2017). Tuttavia, l'eccesso di turbolenza e l'uso di pompe centrifughe possono ridurre le prestazioni complessive (Alfás et al., 2004). Questi sistemi richiedono elevati costi di capitale e operativi.

### *Impianti esistenti*

I tPBRs sono stati installati solo di recente e sono ormai ampiamente presenti (ad esempio in Germania, Francia, Portogallo, Spagna, Stati Uniti, Israele e Cina). Esempi di impianti esistenti sono: Algae4Future (Portogallo), Algaenergy (Spagna), Algomedm (Germania), Biorizon Biotech (Spagna), Algatech (USA, Israele) e Ocean's Alive (USA-Spagna).

### *Column Photobioreactors e Sleeve Bags*

I Column Photobioreactors (cPBR) e le Sleeve Bags (SB) sono i dispositivi di coltivazione più comunemente utilizzati nei vivai e nelle aziende cosmetiche, alimentari o farmaceutiche.

I cPBR sono costituiti da cilindri trasparenti rigidi tipicamente alti 2–2,5 m e larghi 30–50 cm. Le SB sono sacchi in polietilene di capacità comprese tra 50 e 500L appesi ad un'intelaiatura o supportati all'interno di una rete. La miscelazione è ottenuta principalmente mediante gorgogliamento o air-lift con una miscela di aria e CO<sub>2</sub>. I cPBR e le SB possono essere utilizzati al chiuso per controllare la temperatura e la luce; i cPBR possono anche essere illuminati internamente (Chini Zittelli et al., 2013; Tredici et al., 2010).

Altri design di cPBR includono le annular columns (colonne anulari) in cui vengono utilizzati due cilindri trasparenti concentrici di diverso diametro per aumentare il rapporto superficie/volume raggiungendo produttività da 5 a 10 volte superiori rispetto ai sistemi tradizionali (Borowitzka e Moheimani, 2013). Un volume tipico per questi sistemi è 30–230L (Borowitzka e Moheimani, 2013). Un altro progetto di cPBR può essere lo stirred tank reactor, reattore a serbatoio agitato (Li et al., 2003; Sloth et al., 2006; Eriksen et al., 2007).

I cPBR e le SB hanno un basso rapporto superficie/volume, quindi le produttività volumetriche sono piuttosto basse (0,1 g l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) (Fulks e Main, 1991). Tuttavia, quando si utilizzano colonne per simulare un impianto su scala reale, sono state osservate elevate produttività (fino a 38 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>) (Chini Zittelli et al., 2006). Le colonne anulari possono produrre biomassa algale di alta qualità raggiungendo produttività 510 volte superiori rispetto al PBR tradizionale.

Il costo di riferimento per la biomassa algale (sulla base della sostanza secca) è calcolato in 587 € kg<sup>-1</sup> e 573 € kg<sup>-1</sup> per cPBR, rispettivamente installati sotto luce artificiale e in serra (Oostlander et al., 2020).

I cPBR sono caratterizzati da bassi consumi energetici, basso stress meccanico, buona miscelazione e trasferimento di massa. Tuttavia sono costosi e richiedono elevati costi di pulizia (Huang et al. 2017).

Le SB sono relativamente economiche in quanto i costi di biofouling sono ridotti, tuttavia sono necessarie quantità elevate per la produzione su larga scala (Chini Zittelli et al., 2013). I principali svantaggi di questi sistemi sono la fotolimitazione, la cattiva miscelazione, la fragilità alle perdite e la breve durata di vita (Huang et al. 2017).

#### *Impianti esistenti*

I cPBR e le SB sono largamente presenti. Esempi di impianti operativi sono: Algatech (Israele), GreenSea (Francia) e NOVAgreen GmbH (Germania).

#### *Flat Panel Photobioreactors*

I Flat Panel Photobioreactor (fpPBRs) sono costituiti da due pannelli paralleli, tra i quali è racchiusa la sospensione microalgale (Carvalho et al., 2006). I pannelli sono caratterizzati da un'altezza normalmente inferiore a 1,8 m, una lunghezza generalmente consigliata è inferiore a 20 m con una larghezza di 0,03-0,10 m per massimizzare l'irraggiamento. La dimensione di una singola unità è generalmente di 1-3 m<sup>3</sup> (Tredici et al., 2015). I fpPBRs possono essere installati verticalmente o inclinati e orientati verso il sole per raggiungere una migliore efficienza in termini di energia assorbita (Carvalho et al., 2006; Slegers et al., 2011). La miscelazione e il trasferimento di massa sono forniti contemporaneamente dall'aria gorgogliante o dal ponte aereo, la velocità di aerazione deve essere ridotta a valori inferiori a 0,1 v v<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> per minimizzare il consumo energetico del sistema (Jacobi et al., 2010). È possibile ottenere un trasferimento di massa fino a 25 l h<sup>-1</sup> (Sierra et al., 2008). Gli fpPBRs possono essere raffreddati spruzzando acqua sulla superficie del reattore e utilizzando scambiatori di calore interni (Griffiths, 2013; Tredici et al., 1991a; Sierra et al., 2008).

La produttività della biomassa è stata registrata a valori superiori a 2 g l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Tredici et al., 1991b). Una grande varietà di microalghe è stata prodotta in fpPBR, come *Botryococcus* e *Nannochloropsis*, con produttività comprese tra 5-35 g m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> (Bazaes et al., 2012; Ruiz et al., 2013; Tredici et al., 2015).

Il consumo di energia varia tra 20 e 200 W m<sup>-3</sup> (tra RW e tPBR) (Sierra et al., 2008).

I vantaggi di questa configurazione sono la possibilità di controllare da vicino le condizioni in quanto il sistema è quasi chiuso, prevenendo quindi contaminazioni, e la possibilità di ottimizzazione dell'irraggiamento sulla superficie del reattore (Tredici et al., 2015). Una maggiore produttività è stata segnalata per pannelli di larghezza ridotta (Hu et al., 1996; Zou e Richmond, 1999) che però sono più costosi da costruire, più difficili da pulire e più facilmente soggetti a inibizione della luce e sbalzi di temperatura (Wang et al., 2012). Il biofouling e la contaminazione all'aperto rappresentano per gli fpPBR le principali criticità che possono essere superate utilizzando materiali usa e getta (per es. Green Wall Reactor (Rodolfi et al., 2009), fotobioreattore ProviAPT, Solix Biosystems, sistema Phytobag) per costruire i reattori riducendo ulteriormente i costi. Generalmente il design del reattore con pannelli a

film flessibili consiste in un sacchetto di plastica flessibile trasparente contenuto tra due telai rigidi che contengono un pannello verticale relativamente sottile.

Sebbene inizialmente costosi, mostrano una lunga durata e bassi costi operativi. Gli fpPBR sono caratterizzati da un elevato rapporto tra superficie illuminata e volume, un basso consumo energetico e una riduzione dello stress meccanico. La temperatura è facilmente controllabile garantendo buona miscelazione e trasferimento di massa (Huang et al., 2017).

#### *Impianti esistenti*

Esempi di Impianti esistenti sono: Algae4Future (Portogallo), Ecoduna (Austria), Microalghe Camporosso Società Agricola Srl (Italia), Necton - Phytobloom (Portogallo), Phytolutions (Germania) e Proviron (Belgio).

### **3.3 Sistemi ibridi**

Gli allestimenti ibridi sono sistemi che tendono ad avvicinare il design del fotobioreattore agli open ponds aperti per ridurre i costi. Si riscontrano due tipologie principali. Il primo è un open pond coperto in cui la copertura separa l'intercapedine sopra il canale di coltura dall'ambiente circostante riducendo la contaminazione, mentre il secondo è un design tubolare parzialmente riempito, che viene allargato e gonfiato (Chini Zitelli et al., 2013).

### **3.4 Sistemi immobilizzati**

Un altro metodo di produzione di massa algale meno studiato è il design a packed bed/immobilized/biofilm (letto impaccato/immobilizzato/biofilm). All'interno dei sistemi di immobilizzazione (incapsulamento), le cellule algali sono immobilizzate su una matrice polimerica che ne consente la crescita evitandone la perdita tramite lavaggio (Shen et al., 2009). Gli studi per questa configurazione si sono concentrati principalmente sul trattamento delle acque reflue (Robinson et al., 1986; Huntley et al., 1989) e includono design come le cellule non immobilizzate tramite bolle d'aria, le cellule immobilizzate in sfere di alginato, le cellule immobilizzate su schermi di alginato e le cellule immobilizzate su schermi di alginato, ma condizionate in aria (Shen et al., 2009). I sistemi immobilizzati generalmente risolvono i problemi di raccolta e forniscono flessibilità operativa migliorando l'attività microbica e la qualità del prodotto (Chevalier e De la Noue, 1985; Mallick e Rai, 1993; Muños et al., 2009).

I principali svantaggi sono l'alto costo del materiale, la complessità del processo di incapsulamento e il limitato trasferimento di massa. È inoltre possibile il distacco del biofilm dovuto alle forze idrodinamiche (Pires et al., 2013; de-Bashan e Bashan, 2010). Inoltre, non tutte le specie di alghe possono aderire e crescere sui supporti.

## 4. Raccolta della biomassa algale

Il processo di raccolta della biomassa algale è uno dei principali colli di bottiglia che ostacola la crescita della coltivazione di microalghe, in quanto rappresenta fino al 15-20% del costo di produzione totale (Kadir et al., 2018).

In letteratura sono riportati vari metodi di raccolta, ad esempio la separazione fisica, chimica, biologica, elettrica e mediata da particelle magnetiche. I metodi fisico/meccanici sono i più utilizzati e comprendono la centrifugazione, la sedimentazione per gravità, la filtrazione e la flottazione (Kadir et al., 2018; Mathimani e Mallick, 2018). Tuttavia, nessun singolo metodo si è dimostrato sufficientemente efficiente ed economico per tutti i requisiti di conservazione della biomassa (stress meccanico), recupero della biomassa (quantità totale effettivamente raccolta) e risparmio energetico. Quindi tecnologie diverse vengono utilizzate in diversi design per soddisfare le specifiche esigenze.

La scelta del trattamento di raccolta è principalmente legata al tipo di produzione. Nel caso di prodotti di alto valore (alimentari e nutraceutici), ad esempio, la fase di raccolta è progettata per massimizzare la quantità e la qualità del prodotto, tenendo relativamente poco in considerazione il fabbisogno energetico e i costi, poiché la biomassa deve essere raccolta evitando la degradazione e la contaminazione. D'altra parte, per la produzione di biomassa a basso valore (biofertilizzanti, biostimolanti e biomassa dal trattamento delle acque reflue), le fasi di raccolta sono per lo più progettate con la finalità di risparmiare energia.

### 4.1 Biomassa di alto valore

#### *Filtrazione*

La raccolta della biomassa attraverso il processo di filtrazione è conveniente; non richiede l'aggiunta di sostanze chimiche ed è efficace per le cellule sensibili allo stress meccanico. Questo processo può recuperare fino al 70-90% della biomassa. La filtrazione con semplici setacci viene generalmente eseguita per microalghe caratterizzate da grandi dimensioni cellulari come Spirulina.

#### *Centrifugazione*

La centrifugazione è ampiamente utilizzata in quanto è il metodo di raccolta più veloce, ma non è adottabile per tutte le alghe (per esempio, Spirulina o ceppi marini). La separazione tramite centrifuga dipende dalle caratteristiche di sedimentazione cellulare, quindi dalla forma e dimensione delle cellule microalgali, e dalla durata della procedura.

Le centrifughe a dischi sono le più utilizzate su scala industriale (soprattutto per prodotti algali di alto valore) con una forza applicata pari a 4.000-14.000 volte la forza

gravitazionale (Grima et al., 2003; Milledge e Heaven, 2011). Le centrifughe a dischi concentrano microalghe di dimensioni comprese tra 3 e 30 mm raggiungendo una concentrazione del 15-25% dei solidi totali nel fango. Il consumo energetico è compreso tra 0,4 e 0,8 kWh m<sup>-3</sup> (Piek, 2012).

#### *Processo di filtrazione a membrana*

Nella filtrazione a membrana, la coltura di alghe può passare attraverso filtri che operano sottopressione o sottovuoto per trattenere le alghe e creare una forma densa di pasta. Il sistema può essere continuo o discontinuo. La biomassa raccolta è di alta qualità rispetto a quella ottenuta con altre tecniche di raccolta, poiché la distruzione delle cellule è ridotta (ridotto stress meccanico). La cross-flow filtration (filtrazione a flusso incrociato), rispetto alla dead-end filtration (filtrazione senza uscita), è più efficiente nel ridurre lo stress meccanico, poiché il flusso è tangenziale alla superficie delle membrane.

## **4.2 Biomassa di basso valore**

#### *Sedimentazione e flocculazione*

La sedimentazione per gravità è il metodo più comune ed economico per la rimozione della biomassa algale nel trattamento delle acque reflue. Le cellule delle microalghe hanno una superficie con carica negativa ed una densità prossima alla densità del mezzo di crescita, determinando quindi una sedimentazione naturale lenta. Una pre-flocculazione o coagulazione può tuttavia aumentare la velocità di decantazione naturale (Chen et al., 2011). I flocculanti agiscono neutralizzando la carica negativa e consentendo l'agglomerazione delle microalghe. I flocculanti inorganici sono cationi multivalenti (e.g. solfato di alluminio, cloruro ferrico e solfato ferrico) che formano complessi polioidrossilici a pH ottimale. I flocculanti organici generalmente impiegano polielettroliti come poliacrilammide o polietilenimina. Dopo la coagulazione, la decantazione avviene in appositi sedimentatori, vasche con pareti inclinate che favoriscono la sedimentazione di biomasse, analoghe a quelle utilizzate per la disidratazione dei fanghi.

#### *Dissolved Air Flotation*

La Dissolved Air Flotation (Flottazione ad aria disciolta, DAF) è un tipo di separazione per gravità in cui l'aria viene fatta gorgogliare attraverso una sospensione solido-liquida. Le molecole gassose sono attaccate alle particelle solide che sono trasportate verso la superficie del liquido dove si accumulano come sospensione che può essere rimossa. La DAF è stata spesso combinata con la coagulazione-flocculazione ottenendo fanghi microalgali contenenti solidi secchi fino al 6% (Bare et al., 1975). La domanda di energia della DAF è tuttavia superiore a quella della sedimentazione (0,04 kWh m<sup>-3</sup>), ma l'impiego di sostanze chimiche è inferiore. Operazioni di "scrematura" vengono utilizzate per rimuovere le particelle galleggianti dalla superficie.



## 5. Lavorazione della biomassa microalgale

Dopo la raccolta della biomassa microalgale, generalmente è necessario un ulteriore trattamento per ottenere prodotti di alto valore, come i prodotti alimentari o di qualità alimentare. Tale fase di lavorazione consente di stabilizzare i prodotti, ne permette lo stoccaggio e la successiva distribuzione o una ulteriore estrazione. La raccolta generalmente si traduce in una concentrazione da 50 a 200 volte della biomassa algale. La biomassa raccolta (5-15% di solidi secchi) deve essere lavorata quasi immediatamente, altrimenti subisce deterioramento nell'arco di poche ore a temperatura ambiente (Molina-Grima et al., 2003). I metodi di lavorazione consistono essenzialmente in: 1) disidratazione, 2) trattamento termochimico, 3) distruzione cellulare e 4) frazionamento mirato. Metodi diversi possono essere impiegati anche in combinazione in funzione del prodotto finale da ottenere (de Carvalho et al., 2020).

### 5.1 Disidratazione

I processi di disidratazione o essiccazione consistono nella rimozione dell'acqua mediante riscaldamento, o applicazione di vuoto. La disidratazione può essere utilizzata come pretrattamento prima di una ulteriore estrazione o per stabilizzare la biomassa poiché il basso contenuto di acqua riduce l'attività degradativa da parte dei microrganismi e/o di sostanze chimiche. La disidratazione è comunemente usata per prolungare la durata di conservazione della biomassa, specialmente se la biomassa stessa è il prodotto finale (Molina-Grima et al., 2003). Tuttavia, i componenti della biomassa e la struttura cellulare possono essere denaturati o distrutti dallo stress meccanico con conseguenze per il successivo trattamento, in quanto ciò può aumentare la digeribilità, la precipitazione proteica, l'inattivazione enzimatica, il collasso e la distruzione cellulare, portando sia vantaggi che svantaggi a seconda del processo o del prodotto finale richiesti (de Carvalho et al., 2020). È quindi possibile eseguire una fase di disidratazione prima dei processi di estrazione di metaboliti con il vantaggio di aumentare la shelf-life e contribuire alla distruzione cellulare. Una drastica disidratazione aumenta l'efficacia di estrazione con solvente, in particolare dei lipidi (Belarbi et al., 2000).

Diversi metodi di disidratazione/essiccazione sono applicabili in funzione dei diversi prodotti finali (Tabella 2):

- Spray drying ("essiccazione spray"): adatto per prodotti di alto valore, ma troppo costoso per la produzione di biomassa in polvere da utilizzare in alimenti e mangimi (Molina Grima et al., 2003). Può causare deterioramento (per esempio dei pigmenti);
- Drum drying ("essiccazione a tamburo"): meno costoso dal punto di vista energetico ma anche con un rendimento inferiore rispetto allo spray drying, il

calore può causare danni ad alcune molecole e ridurre la qualità della microstruttura (de Carvalho et al., 2020). Efficacemente utilizzato per l'essiccazione della biomassa ricca in carotene di *Dunaliella* (Molina Grima et al., 2003);

- **Liofilizzazione:** ampiamente utilizzata nella ricerca, ma piuttosto costosa per la produzione commerciale su larga scala. Limitato a prodotti di alto valore, principalmente a causa del fabbisogno energetico per unità di biomassa (Carvalho et al., 2020). L'applicazione del metodo è stata associata ad un miglioramento dell'estrazione dei lipidi in *Isochrysis galbana* (Molina Grima et al., 1994);
- **Essiccazione al sole:** (de Carvalho et al., 2020);
- **Essiccazione termica per ventilazione e calore:** utilizzata per la biomassa di Spirulina.

L'essiccazione è generalmente la tecnica di lavorazione più efficacemente implementata su vasta scala negli impianti di produzione di microalghe. Ulteriori lavorazioni, descritte di seguito, vengono generalmente eseguite in altre strutture dedicate alla lavorazione degli alimenti e alla produzione nutraceutica.

**Tabella 2.** Metodi per l'essiccazione delle microalghe  
(Fonte: de Carvalho et al., 2020, mod.)

Metodo di essiccazione	Principio	Effetto sulla biomassa	Spese operative (energia, aria, pressione)	Pro	Contro
Solare	Riscaldamento solare della biomassa	Compattamento, un pò di degradazione durante l'essiccazione lenta	Basse	Bassi costi energetici	Lento, richiede ampi spazi, dipende dal clima
A microonde	Riscaldamento al microonde	Variabile, compattamento, può esserci espansione o deterioramento	Moderate	Veloce, altamente controllabile	Spese investimento elevato, elevatissimi problemi di sicurezza
Diretto o convettivo	L'aria calda riscalda la biomassa e trasporta l'acqua	Compattamento, deterioramento a più alte temperature	Moderate	Pratico	Può degradare la biomassa
A spruzzo	Un liquido caldo e aria trasportano l'acqua	Maggiore permeazione e può verificarsi un certo deterioramento	Elevate	Veloce, generazione di polvere	Maggiore intensità energetica, richiede alti volumi di aria
Letto fluido, letto con beccuccio	L'aria calda riscalda e trasporta l'acqua in un terreno sospeso su mezzo solido	Maggiore permeazione e può verificarsi un certo deterioramento	Elevate	Veloce, generazione di polvere	Maggiore intensità energetica, richiede alti volumi di aria
Conduzione o contatto	Superfici calde riscaldano la biomassa	Compattamento, probabile degradazione	Moderate	Veloce	Degrada la biomassa
Liofilizzazione (congelamento-scongelo)	Superfici calde congelano la biomassa. Acqua sublimata.	Basso, può mantenere la vitalità cellulare; torte di biomasse molto porose	Elevate	Biomassa di alta qualità	Lento, spese di investimento elevate

## 5.2 Distruzione cellulare ed estrazione attiva

I metodi di distruzione cellulare possono essere applicati direttamente sulla biomassa fresca o dopo una fase di essiccazione. La distruzione cellulare è spesso necessaria al fine di demolire le pareti e/o le membrane cellulari per:

- recuperare i prodotti intracellulari (per esempio, pigmenti e carotenoidi) dalle microalghe prima del trattamento con solventi, aumentando così le rese di estrazione;
- migliorare la biodisponibilità e l'assimilabilità di alcuni nutrienti e nutraceutici, quando la biomassa di microalghe viene utilizzata per la produzione di alimenti o mangimi.

Esistono numerose tecniche basate su processi meccanici, fisici e chimici. I metodi fisici e meccanici sono ampiamente utilizzati nei laboratori di ricerca o su piccola scala, mentre quelli chimici sono più adatti alla scala industriale. I più diffusi metodi di distruzione cellulare scalabili, con i relativi fabbisogni energetici sono:

- Bead mills (macinatura a sfere): trattamento della biomassa microalgale con microsferi di vetro o ceramica (diametro 100-2000  $\mu\text{m}$ ) in appositi macinatori. Viene generalmente utilizzato su biomasse umide. Adottato per *Scenedesmus obliquus*, *S. platensis* e *Monodus subterraneus* (Hedenskog et al., 1969);
- Ultrasonificazione: utilizzato nei laboratori per la completa distruzione cellulare prima dell'estrazione di proteine, acidi nucleici o lipidi. Questo processo ha un elevato fabbisogno energetico, necessita di raffreddamento e non è economico. Generalmente viene utilizzato su piccola scala, ma è scalabile grazie a sonicatori industriali ad alta potenza e ad alto rendimento (Molina Grima et al., 2003);
- Omogeneizzatori ad alta pressione: la sospensione di microalghe viene pompata attraverso una valvola di omogeneizzazione ad alta pressione (500-1500 bar) che porta alla rottura cellulare a causa del forte gradiente di velocità. La caduta di pressione fa aumentare la temperatura e di conseguenza è necessaria la refrigerazione (de Carvalho et al., 2020);
- Macinazione di biomasse in polvere: le biomasse microalgali, precedentemente essiccate, vengono polverizzate. Il fabbisogno energetico cresce tanto più quanto più piccola è la granulometria del prodotto finale. Uno svantaggio comune è l'aumento della temperatura a valori critici a causa dell'assenza di acqua (de Carvalho et al., 2020);
- Liofilizzazione: utilizzato per specifiche specie di microalghe (per esempio, *Arthrospira*), come pretrattamento delicato ma efficace per facilitare l'estrazione di ficocianine (Moraes et al., 2011) e amido (Rempel et al., 2019). L'unico vincolo è l'elevata quantità di energia richiesta per il congelamento. Distrugge le pareti cellulari e le membrane creando cristalli di ghiaccio;
- Campi elettrici pulsati (PEF): applicazione di campi elettrici ad alta tensione (da 10 a 100 kV  $\text{cm}^{-1}$ ) per breve tempo (durata dell'impulso: 1-10 ms) a sospensioni

- microalgali per destabilizzare le membrane cellulari. Ad alte conducibilità di sospensione, la corrente elettrica può essere elevata portando al riscaldamento del sistema e di conseguenza richiedendo il raffreddamento. La tecnologia è ampiamente commercializzata per l'industria alimentare ed il suo utilizzo è in fase di sviluppo per varie specie di microalghe (Straessner et al., 2016; de Carvalho et al., 2020). L'apporto energetico è paragonabile a quello di altri metodi meccanici;
- Alcali: i trattamenti alcalini vengono eseguiti utilizzando basi forti come idrossido di potassio e di sodio. Sono altamente efficaci in quanto possono degradare completamente sia le pareti cellulari che i componenti della membrana. Sono economici, richiedono poca energia e sono particolarmente adatti per l'estrazione di acidi grassi liberi, ad esempio da *Porphyridium cruentum* e *Phaeodactylum tricorutum*. Tuttavia, possono degradare anche altri componenti cellulari, quindi non sono adatti nel contesto dell'estrazione di proteine (Molina Grima et al., 2003);
  - Solventi organici: il trattamento con solventi organici è generalmente preceduto da altri pretrattamenti (per esempio, essiccamento, trattamento termico alcalino, disgregazione cellulare meccanica) volti a disgregare le pareti cellulari al fine di rendere più accessibili i lipidi cellulari. Solventi come esano, etanolo, cloroformio ed etere etilico vengono utilizzati per estrarre acidi grassi essenziali (per esempio acido eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA) e pigmenti lipofili, come astaxantina e carotenoidi, per uso nutrizionale, ma anche per estrarre lipidi per la produzione di biodiesel (Molina Grima et al., 2003; Tan et al., 2020);
  - Solventi acquosi: soluzioni acquose tamponate vengono utilizzate per estrarre proteine dalla biomassa microalgale (20% pp<sup>-1</sup>), spesso a seguito di una fase di disgregazione meccanica. L'estrazione di molte proteine deve essere eseguita su biomassa umida (non essiccata) (Molina-Grima et al., 2003) e l'aggiunta di detergenti (per esempio, SDS e sali biliari) è spesso utilizzata per dissolvere le membrane cellulari (de Carvalho et al., 2020);
  - Anidride carbonica (CO<sub>2</sub>): la CO<sub>2</sub> supercritica è stata riconosciuta come un metodo sicuro ed ecologico per l'estrazione dei lipidi da varie tipologie di biomasse microalgali (Morais et al., 2014). È particolarmente indicata a scopi nutrizionali, per esempio, nella produzione di acidi grassi liberi e carotenoidi (Taher et al., 2014). La resa di estrazione può essere aumentata con l'aggiunta di solventi non tossici, come l'etanolo, ad esempio per l'estrazione dell'astaxantina (Fujii, 2012);
  - Trattamento per biostimolanti e biofertilizzanti: il trattamento di idrolisi avviene sulla biomassa raccolta e concentrata, senza essiccamento, ed è generalmente utilizzato per esaltare proprietà specifiche legate a molecole a basso peso, come amminoacidi e acidi organici, che possono agire come molecole segnale, biostimolanti o ormoni;
  - Idrolisi acida: i trattamenti con acidi forti concentrati (per esempio acido solforico) sono efficaci nel catalizzare l'idrolisi dei componenti della parete cellulare. Sono a basso costo e a basso consumo energetico, ma possono degradare altri componenti cellulari (de Carvalho et al., 2020);

- Idrolisi enzimatica: generalmente utilizzato per indebolire o distruggere le pareti cellulari idrolizzando parzialmente o completamente i loro componenti attraverso miscele di enzimi, quali cellulasi, xilanasi, amilasi e lisozimi. Il metodo può essere impiegato in alternativa o come facilitatore di altri metodi di disagregazione (Demuez et al., 2015). A causa dei costi degli enzimi, non è adatto per prodotti di basso valore. Il fabbisogno energetico è basso e il processo può essere mirato in modo specifico contro le pareti cellulari rimanendo più leggero rispetto alle molecole non bersaglio (de Carvalho et al., 2020).

Sulla base dei dati raccolti nella prima fase del progetto Bric, si evince che i sistemi di produzione più largamente usati sono i reattori aperti per la produzione di Spirulina, per la valorizzazione della biomassa ai fini della produzione di fertilizzanti e biostimolanti e quelli per la depurazione delle acque reflue, mentre per la coltivazione di altre microalghe destinate alla produzione alimentare o alla nutraceutica i reattori sono di tipo chiuso.

Per quanto riguarda la valorizzazione degli stream di scarto, di fatto allo stato attuale risultano poche le aziende in Europa che adottano un sistema di recupero delle acque reflue per la produzione di biomassa algale (3 aziende identificate con circa 5 impianti).

Evidenziata la maggiore diffusione della coltivazione delle microalghe in sistemi aperti, è possibile identificare i principali pericoli connessi a questa modalità di produzione, sia per gli operatori che per l'ambiente.

## 6. Impatti ambientali ed occupazionali degli impianti di coltivazione delle microalghe

Dalla mappatura e caratterizzazione degli impianti di produzione di alghe su scala europea riportata nel capitolo 2 emerge che, allo stato attuale, risulta maggiormente rilevante la produzione in sistemi aperti. Di questi impianti si tratterà nel proseguo in riferimento ai pericoli e agli eventuali rischi ad essi connessi sia per gli operatori che per l'ambiente. Sotto lo stesso profilo si farà cenno, tuttavia, anche ai sistemi di trattamento di acque reflue con microalghe, pure oggetto di crescente interesse. La letteratura di merito attesta che, per queste due tipologie di impianto, mentre i rischi sanitario-ambientali sono oggetto di caratterizzazione e, almeno in parte, concorrono alle analisi di ciclo vita (LCA), quelli professionali hanno, almeno fino ad oggi, ricevuto minor attenzione.

Dal censimento degli impianti di microalghe emerge che i principali pericoli ambientali, individuati e/o percepiti dai gestori degli stessi, sono i seguenti:

- Rilascio nell'ambiente di specie o ceppi di microalghe non autoctone. Tale rischio consiste nella proliferazione e possibile rilascio nell'ambiente di specie o ceppi alloctoni, che, peraltro, alterano, la qualità dei prodotti microlagali di interesse commerciale;
- Produzione di metano (CH<sub>4</sub>). Il rischio è correlato al potenziale di gas serra del metano, anche se la quantità emessa dalle microalghe è trascurabile se confrontata con quella derivante da altre attività agricole.
- Produzione di protossido d'azoto (N<sub>2</sub>O). L'emissione di N<sub>2</sub>O può verificarsi in ogni attività agricola che preveda l'utilizzo di azoto con disponibilità di carbonio. La denitrificazione e le emissioni di N<sub>2</sub>O sono particolarmente favorite dalla fase anossica della crescita algale durante la notte, quando la produzione endogena di ossigeno si ferma e l'ossigeno disciolto medio diminuisce. Come per il metano, il rischio è legato al suo potenziale di gas serra. La riduzione delle emissioni di N<sub>2</sub>O può essere ottenuta ottimizzando la miscelazione e procedendo al monitoraggio continuo dell'ossigeno durante il giorno per raggiungere il 100% di saturazione.
- Produzione di ammoniaca (NH<sub>3</sub>). L'emissione e successiva volatilizzazione di NH<sub>3</sub> può verificarsi in stagni aperti in terreni ricchi di ammoniaca. La volatilizzazione è molto variabile e dipende dalla concentrazione di NH<sub>3</sub> libero, dal tipo di fertilizzante impiegato per la crescita algale, dalla temperatura e dal pH. I principali rischi connessi comportano eutrofizzazione, acidificazione e produzione di particolato atmosferico. Alcuni studi mostrano che il rilascio di azoto, dovuto alla volatilizzazione di NH<sub>3</sub>, varia dall'1% al 46% dell'input totale di azoto. La volatilizzazione dell'NH<sub>3</sub> è la causa principale del rilascio di azoto, rappresentando dal 37,5% al 41% del totale di azoto disciolto (Nuez et al., 2001), mentre altri studi riportano un tasso di volatilizzazione inferiore (Woertz et al., 2009; Zimmo et al.,

2000). Tempistiche corrette ed erogazione graduale di azoto, a seconda della crescita della cultura, permettono di contenere le emissioni.

Dal censimento degli impianti di microalghe emerge altresì che i principali pericoli per la salute e sicurezza occupazionale individuati e/o percepiti dai gestori degli stessi sono i seguenti:

- Presenza di biohazard derivante da:
  - Trattamento di acque reflue, per i sistemi aperti che le utilizzano;
  - Bacini e serbatoi di stoccaggio, quali potenziali *reservoir* di agenti patogeni e/o microrganismi produttori di tossine;
  - Operazioni di manutenzione delle attrezzature, pulizia delle vasche di coltivazione ecc;
- Presenza di sostanze chimiche nelle acque reflue;
- Crescita di specie microalgali produttori di tossine o metaboliti tossici. Questo rischio ha una bassa probabilità nei sistemi chiusi, mentre è rilevante nei sistemi aperti dove è possibile la contaminazione da parte di altre specie di microalghe;
- Impiego di sostanze chimiche nelle fasi di lavorazione. Come emerso dalla rassegna sugli impianti esistenti, tutte le strutture limitano la loro attività alla produzione, raccolta, eventuale essiccazione e stoccaggio della biomassa. Non sono stati segnalati uso di solventi o sostanze chimiche pericolose. Alcune sostanze chimiche possono essere utilizzate per l'estrazione specifica di sostanze quali la ficocianina, l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA). Tuttavia, queste fasi dei processi produttivi vengono generalmente effettuate in strutture separate e opportunamente a ciò attrezzate. Solo le strutture sperimentali hanno segnalato l'uso di solventi durante le attività di laboratorio;
- Emissioni di ammoniaca con conseguenti condizioni di pericolo per la salute dei lavoratori e per la sicurezza degli impianti (rischio incendio, esplosione). I rischi per la salute sono generalmente valutati bassi, essendo le strutture generalmente all'aperto.

Nel proseguo si propone l'approfondimento dei fattori di rischio sopra elencati unitamente ad alcuni cenni sulle principali metodologie applicabili per il relativo abbattimento e/o contenimento.

## 6.1 Rischi sanitario-ambientali

Vi è unanime accordo nel ritenere che la coltivazione di microalghe su larga scala dia luogo ad emissioni atmosferiche di entità sconosciuta ma che necessitano di essere monitorate e gestite di conseguenza. Gli impatti atmosferici di un sistema aperto si prevede siano significativamente più elevati di quelli associati a sistemi chiusi, poiché in questi ultimi può essere possibile l'intrappolamento delle emissioni gassose. Anche nel caso di utilizzo delle microalghe come opzione per il trattamento delle acque

reflue, tra gli elementi di sostenibilità dei processi applicabili, vi è lo studio delle emissioni dei gas serra con particolare riferimento a CH<sub>4</sub> e N<sub>2</sub>O (Usher et al., 2014). I composti volatili emessi da tali tipologie di impianto possono costituire fonte di inquinamento del comparto aria in cui si disperdono in misura dipendente dalle condizioni meteo-climatiche. In proposito è necessario distinguere il tema degli impatti odorigeni da quello del potenziale rischio tossicologico per la popolazione che risiede in prossimità degli impianti stessi.

### *Impatti odorigeni*

Il crescente interesse verso la qualità dell'ambiente ha portato a riconoscere gli odori molesti come inquinanti atmosferici generati dalle attività antropiche ed a coniare il termine "inquinamento olfattivo" per indicare il relativo impatto negativo sull'ambiente circostante e sulla popolazione esposta, prodotto dalla diffusione di flussi osmogeni.

La difficoltà di definire quantitativamente e in modo univoco le caratteristiche di un odore (percettibilità, intensità, tono edonico, qualità, natura chimico-fisica delle sostanze) spiega il ritardo che si registra, allo stato attuale, nella regolamentazione legislativa dell'inquinamento olfattivo rispetto ad altri settori della qualità dell'aria. Se da un lato le molestie olfattive non sono in genere pregiudizievoli per la salute (normalmente la concentrazione dei composti odorigeni in atmosfera è di gran lunga inferiore ai threshold limit value (TLV) impiegati ai fini della valutazione della tossicità degli inquinanti), dall'altro possono certamente configurarsi come un fattore di stress per le popolazioni esposte o potenzialmente esposte diventando spesso elemento di conflitto nel caso di impianti esistenti o nella scelta del sito per la localizzazione di nuove attività.

Nel Testo Unico Ambientale - d.lgs. 152/2006 - l'inquinamento odorigeno viene genericamente ricondotto all'inquinamento atmosferico ed è oggetto di una trattazione orientata alla prevenzione e alla limitazione delle emissioni per le singole sostanze caratterizzate solo sotto l'aspetto tossicologico. A fronte di disposizioni di ordine generale, nel Testo Unico non sono individuabili limiti specifici per le emissioni odorogene, se non quelli assegnati ad alcune sostanze per le emissioni convogliate e alla loro conseguente regolamentazione. Tale lacuna normativa ha fatto sì che alcune Regioni/Province Autonome abbiano redatto specifiche norme e Linee guida allo scopo di disciplinare i casi di molestia olfattiva occorsi e oggetto di molteplici contestazioni e contenziosi legali fissando in alcuni casi valori limite di emissione.

Specifici elementi valutativi sono stati messi a punto soprattutto nell'ambito dei procedimenti autorizzativi per le attività industriali (AIA-Autorizzazioni Ambientali Integrate), ove vengano prodotte emissioni odorogene. A causa degli elementi di soggettività rispetto alle emissioni odorogene, non esiste un unico metodo per la



misura degli odori ma è necessario ricorrere ad un insieme di indagini e di tecniche, tra loro complementari. Possono essere distinte:

- 1) metodologie finalizzate a caratterizzare le fonti di odore, che fondano sulla identificazione dei cicli lavorativi e delle sorgenti emmissive di maggiore interesse olfattometrico e/o chimico;
- 2) metodologie finalizzate a valutare la risposta e l'esposizione della popolazione, che mirano a comprovare le segnalazioni e i reclami, cercando di trovare attendibili correlazioni con le attività presenti sul territorio e determinando l'estensione geografica e/o temporale della problematica denunciata.

Sulla base di questa distinzione possono essere definite diverse modalità di misurazione e monitoraggio delle emissioni odorigene, che comprendono, tra le altre, la determinazione quali-quantitativa della composizione della miscela di sostanze che determinano l'odore alle analisi in olfattometria dinamica secondo la norma UNI EN 13725<sup>1</sup>, l'impiego di metodologie senso-strumentali (cosiddetti *Nasi Elettronici*), la rendicontazione della percezione del disturbo olfattivo da parte della popolazione residente (SNPA, 2018). Va registrata in proposito anche un'intensa attività di normazione tecnica che ha condotto all'emissione di diversi standard, sia in ambito europeo che a livello nazionale (UNI 11761, 2019; UNI EN 13725, 2004; UNI EN 16841-1, 2017; UNI EN 16841-2, 2017).

In riferimento alle metodologie di abbattimento delle emissioni odorigene, l'applicazione di misure di gestione e di tipo ingegneristico è strettamente connessa alla conoscenza delle specifiche fasi di lavorazione dalle quali le emissioni vengono generate e comporta la necessità di intervenire su uno o più passaggi della relazione sorgente - percorso - recettore. Le misure di carattere progettuale e gestionale di tipo palliativo (ad esempio con coperture delle sorgenti) o preventivo (ad esempio tramite riduzione preventiva delle emissioni alla fonte o limitazione delle condizioni che ne favoriscono la formazione ed il rilascio in atmosfera) possono dimostrarsi insufficienti e/o economicamente troppo onerose per la soluzione del problema. Metodi di tipo curativo (captazione e successivo processo di depurazione delle emissioni) prevedono l'utilizzo di opportune tecnologie di trattamento che, rimuovendo l'inquinante dall'aria captata, operano quando l'emissione si è già verificata.

Per talune attività, tra le quali vi sono impianti di trattamento di acque reflue, sono predisposti e resi disponibili a livello europeo dei documenti di riferimento (BREF) finalizzati a rendere diffusa ed efficace la conoscenza sulle best available techniques (BAT) disponibili per la riduzione delle emissioni. Il piano di gestione degli odori, parte di un più ampio piano di gestione ambientale, ha proprio la finalità di ridurre le

---

<sup>1</sup> Ai sensi della norma l'impatto odorigeno è valutato in base ai dati di concentrazione di odore espressi in unità odorimetriche o olfattometriche al metro cubo ( $OU_E/m^3$ ) che rappresentano il numero di diluizioni necessarie affinché il 50% di un pool di esaminatori non avverta più l'odore del campione analizzato.

emissioni odorigene nonché quella di controllare nel tempo il mantenimento degli obiettivi di riduzione.

### *Sistemi di coltivazione di microalghe*

L'entità degli impatti sull'atmosfera della coltivazione delle microalghe su larga scala (con particolare riferimento ai sistemi di coltivazione aperti del tipo *receways ponds*) dipende in gran parte dal tipo di sistema di coltivazione. Le possibili emissioni gassose e di aerosol provenienti dalla coltivazione delle microalghe, così come il potenziale di riduzione delle emissioni di gas serra attraverso il relativo assorbimento durante la coltivazione risultano ampiamente documentate in letteratura (Usher et al., 2014). Oltre agli impatti diretti vanno considerate le ulteriori reazioni atmosferiche che possono avvenire come risultato delle specie inquinanti emesse. Le principali sostanze chimiche comprendono CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O, DMS/DMSP (dimetilsofuro/dimetilsolfoniopropionato) COV (composti organici volatili: isoprene e terpeni), composti alogenati, H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>. Di particolare rilevanza è il fenomeno per cui la produzione di metano negli strati anaerobici dà luogo ad emissioni odorose (per esempio H<sub>2</sub>S) e di gas serra (per esempio CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O) con un forte impatto sul potenziale di riscaldamento globale.

Nel seguito si esaminano nel dettaglio le caratteristiche dei principali inquinanti menzionati ossia ammoniaca, metano e protossido di azoto.

### *Ammoniaca (NH<sub>3</sub>)*

L'ammoniaca (ammoniaca anidra, NH<sub>3</sub>, CAS No. 7664-41-7) è un gas infiammabile, solubile in acqua, la cui principale via d'ingresso nell'organismo è il tratto respiratorio. Ai sensi del Regolamento n. 1272/2008 (Regolamento CLP) i codici di classe e di categoria di pericolo ad essa associati sono i seguenti (in parentesi si riportano le indicazioni di pericolo o frasi H):

- Flam. Gas 2 (H221: gas infiammabile)
- Press. Gas
- Acute Tox. 3\* (H331: tossico se inalato)
- Skin Corr. 1B (H314: provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari)
- Aquatic Acute 1 (H400: molto tossico per gli organismi acquatici).

Le emissioni di ammoniaca in atmosfera sono ascrivibili essenzialmente al settore agricolo e principalmente alle forme intensive sviluppatesi negli ultimi decenni. Molto rilevanti risultano le emissioni prodotte dall'utilizzo esteso dei fertilizzanti sintetici e organici e dalla gestione degli allevamenti (emissioni dal ricovero e dallo stoccaggio). Una quota minima delle emissioni nazionali di NH<sub>3</sub> proviene da altri processi produttivi, dai trasporti stradali e dal trattamento/smaltimento dei rifiuti.

Per ciò che riguarda le emissioni da microalghe, una potenziale sorgente di  $\text{NH}_3$  è rappresentata dai fertilizzanti a base di urea con un meccanismo emissivo dovuto a variazione del pH per effetto della fotosintesi. Gli impatti diretti delle emissioni consistono nella formazione di pioggia acida ( $\text{HNO}_3$ ), nitrato di ammonio, sali ed aerosol mentre ulteriori reazioni comportano la formazione di composti di zolfo e di aerosol con conseguenti effetti sul bilancio della radiazione globale (Renard et al., 2004).

La deposizione di  $\text{NH}_3$  a terra contribuisce a diversi problemi ambientali, quali l'acidificazione dei suoli, l'alterazione della biodiversità e l'eutrofizzazione delle acque. Come già detto, essa interviene anche nella formazione del particolato e nell'inquinamento da ozono, con conseguenze sulla salute umana.

Il d.lgs. 155/2010 non fissa alcun limite di emissione per l'ammoniaca in riferimento alla salute umana. Cionondimeno, la versione aggiornata del 2016 della direttiva NEC (EU, 2016) stabilisce impegni di riduzione delle emissioni per il 2020 e il 2030 per cinque principali inquinanti atmosferici, tra cui l'ammonica. L'obiettivo fissato dalla Direttiva è pari alla riduzione del 5% di emissioni di ammoniaca per ogni anno dal 2020 al 2029 (come stabilito dall'aggiornamento del Protocollo di Göteborg del 2012) e del 16% a partire dal 2030, rispetto alle emissioni del 2005.

Per ciò che riguarda la coltivazione delle microalghe, la volatilizzazione dell'inquinante può verificarsi in stagni aperti che utilizzano un mezzo ricco di ammoniaca (Sabana project). Il livello di aerodispersione dell'ammoniaca è molto variabile e dipende dalla concentrazione di sostanza libera nell'acqua dello stagno, dal composto fertilizzante utilizzato, dalla temperatura e dal valore del pH. Opportune aggiunte di  $\text{CO}_2$  e regolazioni del pH possono impedire l'eccessivo trasferimento di ammoniaca dallo stato liquido a quello gassoso e la successiva aerodispersione anche a distanza dell'inquinante.

#### *Metano ( $\text{CH}_4$ )*

Il metano ( $\text{CH}_4$ , CAS No. 74-82-8) è un gas estremamente infiammabile, solo leggermente solubile in acqua, la cui principale via d'ingresso nell'organismo è il tratto respiratorio.

Ai sensi del Regolamento n. 1272/2008 (Regolamento CLP) i codici di classe e di categoria di pericolo ad essa associati sono i seguenti (in parentesi si riportano le indicazioni di pericolo o frasi H):

- Flam. Gas 1 (H220: gas altamente infiammabile)
- Press. Gas.

Il d.lgs. 155/2010 non fissa alcun limite di emissione per l'ammoniaca in riferimento alla salute umana.

CH<sub>4</sub> è tra le più importanti fonti di emissione di gas a effetto serra, provenienti dal settore agricolo per effetto della gestione degli allevamenti e dell'uso dei fertilizzanti. CH<sub>4</sub> e NO<sub>2</sub>, in particolare, hanno origine dalla gestione delle deiezioni prodotte dal bestiame, dai processi fisico-chimici e biologici che avvengono nei suoli agricoli, dalla gestione delle risaie e dalla combustione dei residui agricoli.

Per ciò che riguarda le emissioni da microalghe, la letteratura attesta che costituiscono sorgenti potenziali di metano la decomposizione anaerobica e la produzione batterica in ambiente aerobico (Ferrón et al., 2012). Nei sedimenti presenti negli stagni di alghe può verificarsi la metanogenesi: è stato dimostrato che il CH<sub>4</sub> può essere prodotto aerobicamente in ambienti poveri di nutrienti attraverso l'assorbimento batterico o la degradazione di prodotti algali come il metilfonato o il dimetilsulfoniopropionato. Attraverso esperimenti di rilascio di traccianti è stata quantificata la velocità di trasferimento del gas negli stagni, e ciò ha consentito di calcolare i flussi aria-acqua. La sperimentazione, condotta in un impianto pilota industriale alle Hawaii, ha evidenziato che le acque dello stagno erano costantemente sovrasature di CH<sub>4</sub> (fino al 725%) con conseguente emissione media di  $19,9 \pm 5,6 \mu\text{mol CH}_4 \text{ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  (Ferrón et al., 2012).

Normalmente la formazione di CH<sub>4</sub> ha luogo quando:

- si verificano condizioni di bassa concentrazione di ossigeno e nel sedimento è presente materia organica;
- la temperatura del mezzo di crescita è elevata (Stadmark e Leonardson, 2005);
- si è in condizioni di pH neutro;
- non sono presenti altre specie di donatori di elettroni come NO<sub>3</sub>. La metanogenesi è inibita dai composti azotati che i batteri possono usare come accettori di elettroni, compresi nitrati e nitriti, che però possono essere ridotti facilmente in ambienti privi di ossigeno.

Ulteriori reazioni del CH<sub>4</sub> comprendono la decomposizione in CO<sub>2</sub> e la formazione di organoalogeni di cui la molecola può essere precursore (Ballschmiter, 2003). Quale misura prevenzionale, per inibire la metanogenesi, è possibile agire sul tempo di ritenzione idraulica (HRT): impostando un corretto HRT e operando un'opportuna gestione della coltura si può prevenire l'accumulo di detriti di microalghe.

#### *Protossido di azoto (N<sub>2</sub>O)*

Il protossido di azoto (monossido di diazoto, N<sub>2</sub>O, CAS No. 10024-97-2) è un gas ossidante, solo leggermente solubile in acqua la cui principale via d'ingresso nell'organismo è il tratto respiratorio. Ai sensi del Regolamento n. 1272/2008

(Regolamento CLP) i codici di classe e di categoria di pericolo ad essa associati sono i seguenti (in parentesi si riportano le indicazioni di pericolo o frasi H):

- Oxidising gas, 1 (H270: può provocare o aggravare un incendio; comburente)
- Tox. STOT SE (Specific Target Organ Toxicity – Single Exposure), 3 (H336: può provocare sonnolenza o vertigini).

Il d.lgs. 155/2010, nella sua versione aggiornata del 2/07/2018, ha riconfermato per il biossido di azoto i valori limite già fissati quali obiettivi di qualità dell'aria ambiente che dovevano essere raggiunti entro il 1° gennaio 2010 (Tabella 3) unitamente ad un livello critico annuale (anno civile) per la protezione della vegetazione pari a  $30 \mu\text{g}/\text{m}^3 \text{NO}_x$ .

**Tabella 3.** Obiettivi di qualità dell'aria ambiente fissati per  $\text{NO}_2$  dal d.lgs. 155/2010

Periodo di mediazione	Valore limite
1 ora	$200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , da non superare più di 18 volte per anno civile
Anno civile	$40 \mu\text{g}/\text{m}^3$

Rispetto alla emissione di gas serra, vale quanto già detto per il  $\text{CH}_4$  essendo associato anche a  $\text{NO}_2$  un notevole potenziale di riscaldamento globale.

L'emissione di  $\text{N}_2\text{O}$  costituisce fonte di radicali NO che contribuiscono alla distruzione stratosferica dell' $\text{O}_3$ .

Per ciò che riguarda la coltivazione di alghe negli stagni, principalmente di notte, gli scenari incidentali più frequenti corrispondono all'arresto della formazione endogena di ossigeno con corrispondente diminuzione del tasso di ossigeno disciolto (DO) nel mezzo di crescita: le condizioni anossiche promuovono la denitrificazione. La riduzione delle emissioni di  $\text{N}_2\text{O}$  può essere ottenuta ottimizzando la miscelazione e il monitoraggio continuo dell'ossigeno durante il giorno per raggiungere il 100% di saturazione.

Diversi studi sono stati condotti con la finalità di confrontare le emissioni di gas serra provenienti da differenti tipologie di impianti di produzione delle microalghe. L'entità di tale impatto ambientale dipende marcatamente dalla localizzazione geografica, dal design e dal funzionamento di ogni impianto di processo per cui la valutazione delle prestazioni ambientali delle biotecnologie algali richiede quantificazioni attente e specifiche nel contesto. Una metodologia pratica per quantificare le emissioni di gas serra durante la coltivazione delle alghe su larga scala oltre che altri fattori di sostenibilità (la spesa energetica, il consumo di acqua, l'uso del suolo) è stata messa a punto e applicata a cinque impianti di coltivazione delle alghe in fotobioreattori chiusi e in stagni aperti presenti in cinque località rappresentative di cinque climi diversi (Béchet et al., 2017).

### *Sistemi di trattamento di acque reflue con microalghe*

Nelle acque reflue possono essere presenti molti inquinanti di natura organica. Diversa è l'origine e varie le classi cui appartengono essendo distinguibili idrocarburi alifatici, idrocarburi aromatici monociclici e policiclici, alogeni, clorofenoli e clorobenzeni, idrocarburi policiclici aromatici clorurati, pesticidi, esteri di ftalati, nitrosoammine.

I residui di detersivi (ad esempio nonilfenolo, NP), tensioattivi (ad esempio alchil benzene solfonato lineare, LAS), agenti plastificanti (ad esempio di-(2-etilesil)ftalato, DEHP) sono quantitativamente tra i contaminanti organici più abbondanti presenti nelle acque reflue.

Alcuni potenziali inquinanti delle acque reflue assimilabili dalle microalghe e i relativi impatti sulla salute umana sono riportati in letteratura (Usher et al., 2014): tra gli altri agenti chimici compaiono interferenti endocrini, metalli pesanti, olii e grassi, idrocarburi policiclici aromatici e bifenili policlorurati.

Pur essendo alcuni di questi inquinanti caratterizzati da una elevata pericolosità intrinseca per la salute umana, le preoccupazioni principali sono connesse alla loro possibile presenza nella catena alimentare non essendo chiaro se i processi di trattamento con le alghe abbiano le stesse prestazioni di rimozione dei tradizionali processi di depurazione delle acque reflue (Sabana project). I possibili scenari incidentali sono connessi alla presenza nelle acque reflue di inquinanti difficilmente degradabili che si accumulano nella biomassa o che rimangono nelle acque scaricate a valle dei trattamenti operati dall'impianto. Può anche verificarsi che la coltura algale non cresca adeguatamente e perciò non assicuri le condizioni necessarie alla degradazione degli inquinanti.

Il danno ambientale che ne consegue riguarda il comparto aria solo in caso di inquinanti sufficientemente volatili e in condizioni di temperatura e pressione tali da favorire il passaggio in fase vapore di sostanze inizialmente presenti allo stato liquido. Non si può escludere, in assoluto, la possibilità che si verifichino scenari di esposizione connessi all'aerodispersione di inquinanti organici: in tal caso si impone la necessità di un'adeguata valutazione del rischio e l'approntamento delle misure più adeguate per gestirlo. Tuttavia, l'impatto odorigeno, in linea generale, può essere considerato prevalente sul rischio tossicologico. Negli impianti di trattamento di acque reflue sono infatti documentate consistenti emissioni odorigene connesse a VOC nei punti di raccolta e stoccaggio di materiali a forte carico organico (grigliatura, pozzetti di estrazione dei fanghi), nelle fasi caratterizzate da tempi di permanenza prolungati (ispessitori di fanghi freschi, digestori), nelle unità di processo nelle quali sono facilitati i fenomeni di volatilizzazione (pre-aerazione, disidratazione e

trattamenti termici dei fanghi). La Commission Implementing Decision (EU) 2016/902 (EU, 2016) contiene le misure tecnico - gestionali di validità generale ai fini del contenimento di tali emissioni.

Infine, per ciò che riguarda gli inquinanti ammoniacca, metano e protossido di azoto, già analizzati in riferimento ai sistemi di coltivazione di microalghe, va detto che:

- lo sviluppo di  $\text{NH}_3$  si rileva in tutte le fasi del ciclo produttivo in cui vengano favorite condizioni di anossia come avviene nel pre-trattamento, ai collettori verso l'impianto di depurazione in fase di sollevamento iniziale, allo scarico bottini e autobotti e nella fase di equalizzazione in presenza di vasche non areate. Anche nella linea fanghi, in fase di digestione anaerobica, l'emissione di ammoniacca potrebbe essere rilevante soprattutto nel caso in cui l'impianto non disponga di un adeguato sistema di raccolta e convogliamento del biogas prodotto. Specifiche misure tecnico - gestionali possono essere adottate per ridurre al minimo le emissioni odorigene: le principali consistono nel minimizzare il tempo di permanenza delle acque reflue e dei fanghi nei sistemi di raccolta e stoccaggio, in particolare in condizioni anaerobiche; nell'ottimizzare il trattamento aerobico, ad esempio attraverso il controllo del contenuto di ossigeno, la manutenzione frequente del sistema di aerazione, l'uso di ossigeno puro e/o la rimozione di schiuma nei serbatoi; nel dotare di coperture le strutture per la raccolta e il trattamento delle acque reflue e dei fanghi, in modo da raccogliere e successivamente trattare la relativa aria esausta odorigena; nell'utilizzare le tecnologie di trattamento end-of-pipe, che agendo a valle del processo produttivo, intervengono sul trattamento dell'inquinamento dopo che esso è stato prodotto. In tal senso, le BAT applicabili in questo settore sono comuni a quelle codificate, per un'ampia serie di impianti chimici, dall'Allegato alla Commission Implementing Decision (EU) 2016/902.
- le maggiori emissioni di  $\text{CH}_4$  si registrano nella linea fanghi in fase di digestione anaerobica. I reattori in cui ha luogo sono chiusi e le emissioni dovrebbero essere ridotte se l'impianto dispone di un adeguato sistema di raccolta e convogliamento del biogas prodotto, che dovrebbe essere avviato al recupero energetico. Tuttavia, poiché spesso tale gas viene semplicemente inviato in atmosfera e bruciato in torcia, il contributo emissivo del metano può essere rilevante. Per le misure tecnico - gestionali che possono essere adottate per ridurre al minimo le emissioni odorigene si rimanda a quanto già evidenziato in riferimento all'ammoniaca e alla Commission Implementing Decision (EU) 2016/902. In riferimento alla digestione anaerobica, il controllo della produzione di biogas si ottiene stabilizzando il processo (età del fango, temperatura, pH, alcalinità, ecc.) che garantiscano un rapporto SV/ST costante, accompagnato da una idonea produzione di biogas.

In generale la sostenibilità dei processi che accoppiano la produzione di microalghe con il trattamento delle acque reflue è incrementata, oltre che dall'abbattimento dei

costi del trattamento e dalla riduzione del fabbisogno energetico anche da una minore emissione di gas serra. La sfida principale attuale è dimostrare la validità di questo tipo di processi su larga scala, a diverse condizioni e utilizzando tipologie di acque reflue di differenti composizioni (Fernandez et al., 2018) partendo dai processi messi a punto nell'ambito di progetti di ricerca mirati a ottimizzare le tecnologie fondate sull'impiego di microalghe per il recupero dei nutrienti diminuendo i tempi di ritenzione idraulica e l'estensione delle superfici necessarie allo svolgimento del processo.

- le maggiori emissioni di  $N_2O$  avvengono durante il trattamento secondario all'interno delle vasche a fanghi attivi laddove hanno luogo i processi di rimozione biologica dell'azoto e le emissioni olfattive sono connesse alle vaste superfici libere dei bacini e allo strippaggio dei composti presenti nel refluo in ingresso. Per ciò che riguarda le misure di contenimento tecnico-gestionali degli impianti vale quanto già evidenziato per  $NH_3$  e  $CH_4$ .

## 6.2 Rischi professionali

### *Sistemi di coltivazione di microalghe*

Nelle aziende in cui si svolgono attività di produzione in sistemi aperti, raccolta, eventuale essiccazione e stoccaggio della biomassa non si segnala uso di solventi o agenti pericolosi: alcune sostanze chimiche possono essere utilizzate, sia pur in strutture separate dalle altre e opportunamente attrezzate, per l'estrazione specifica. Tra queste vi sono la ficocianina, l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA).

La ficocianina è un elemento caratteristico delle microalghe verdi-azzurre come Spirulina: in quest'ultima, da cui viene estratta, rappresenta circa il 10% del peso secco. Spirulina è nota infatti anche per la capacità di sintetizzare la C-ficocianina (ficocianina da cianobatteri, C-PC), un pigmento blu e solubile in acqua. Oltre ad essere usato come pigmento nella formulazione di prodotti alimentari, l'interesse per la C-PC è aumentato a causa delle sue attività antiossidanti, antinfiammatorie e anticancerogene.

L'acido eicosapentaenoico (EPA), detto anche acido icosapentaenoico, è un acido grasso omega-3. Il suo nome in letteratura è 20:5(n-3), mentre il suo nome comune è acido timnodonico. Secondo il GHS, il sistema mondiale armonizzato di classificazione ed etichettatura delle sostanze chimiche, l'EPA non è una sostanza pericolosa.

L'acido docosaesaenoico (DHA), o acido cervonico, è un acido grasso omega-3 o PUFA n-3. Nella struttura chimica, il DHA è un acido carbossilico con una catena



di 22 atomi di carbonio. Non sono reperibili classificazioni di pericolosità per tale sostanza.

I sistemi di coltivazione delle microalghe sono responsabili, come già evidenziato, delle emissioni di ammoniaca (NH<sub>3</sub>) del cui profilo tossicologico si è già detto. I rischi professionali associati a tale agente chimico ed in particolare il rischio di esplosione o quello di intossicazione per inalazione sono generalmente bassi in strutture di estensioni contenute e collocate all'aperto.

#### *Trattamenti della biomassa e impiego di solventi di estrazione*

La produzione di biodiesel da microalghe è molto promettente nella ricerca di un combustibile alternativo a quelli di origine fossile per i motori diesel. La ragione è nell'alto contenuto di lipidi nelle cellule di microalghe variabile dal 25-75% del loro peso secco (Mubarak et al., 2015). I processi chiave della produzione di biodiesel dalle microalghe sono la coltivazione, la raccolta, la lavorazione della biomassa, l'estrazione dei lipidi e la relativa transesterificazione. Tra tutti, l'estrazione dei lipidi può essere considerato il processo chiave, particolarmente rilevante e costoso. L'avvio di una produzione su vasta scala di biodiesel a partire da microalghe dipende principalmente dall'energia utilizzata per la lavorazione della biomassa e dal tipo di processo di estrazione dei lipidi impiegato.

L'estrazione dei lipidi o dell'olio dalle cellule delle microalghe è una procedura ad alto dispendio energetico e costosa perché l'uso di solventi di estrazione richiede energia extra per il relativo recupero dai lipidi dopo l'estrazione. Inoltre, il metodo utilizzato dovrebbe essere veloce al fine di non danneggiare i lipidi estratti. Si illustrano nel proseguo i principali metodi chimici di estrazione dei lipidi da microalghe.

#### *Estrazione con solvente*

Per l'estrazione di lipidi da biomassa algale si possono impiegare solventi non polari come esano, benzene, toluene, etere dietilico, cloroformio e solventi polari come metanolo, acetone, acetato di etile ed etanolo. I solventi non polari interrompono le interazioni idrofobiche tra i lipidi non polari e neutri disponibili nella biomassa delle alghe. I solventi usati maggiormente impiegati sono: n-esano, etanolo, 1-butanolo, DBU (1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-ene), etere dimetilico e miscele di cloroformio/metanolo, n-esano/etanolo, n-esano isopropanolo, n-esano/2-propanolo, metanolo/1-etil-3-metilimidazolio metilsolfato, DBU/etanolo, DBU/ottanolo, cloruro di metilene/metanolo, dicloroetano/metanolo, dicloroetano/etanolo e acetone/diclorometano. Tra questi, il cloroformio/metanolo (1/2 v/v) è la miscela di solventi organici più usata per estrarre i lipidi da biomassa e da tessuti animali, poiché il tempo di estrazione è ridotto e nel contempo si registra una maggiore resa (Lee et al., 2010). D'altra parte è segnalato l'effetto che l'uso combinato di questi due solventi ha sulla qualità del prodotto finale

in quanto è in grado di dissolvere, durante il processo di estrazione, prodotti indesiderati quali la clorofilla (Archanaa et al., 2012). Una rassegna di diversi metodi utilizzati per estrarre oli o lipidi dalla biomassa di microalghe per la produzione di biodiesel (Mubarak et al., 2015) attesta che l'uso di solventi tossici come l'esano e il cloroformio causa, come conclamati in altri ambiti, rischi per la salute e per l'ambiente e costituisce il principale svantaggio del metodo di estrazione con solvente dell'olio di alga (Aresta et al., 2005). Su scala di laboratorio in genere si utilizzano processi a lotti (per batch) per estrarre l'olio dalle alghe con solventi organici: il contenuto di lipidi trasferiti dalla biomassa al solvente raggiunge uno stato di equilibrio con una concentrazione di lipidi nel solvente che limita il proseguimento del processo di estrazione. L'applicazione di un metodo continuo di estrazione con solvente consente di superare questa limitazione, ma è costoso poiché richiede una grande quantità di solventi organici. Numerosi studi attestano che, su scala di laboratorio, solventi quali cloruro di metilene, sistemi di solventi a base di metanolo e miscele di cloroformio/metanolo producono alte rese di lipidi da microalghe (Guckert et al., 1988; D'Oca et al., 2011).

Anche se le tecniche di estrazione con solvente sono più economiche e facili da applicare, l'uso di agenti tossici e tempi di esecuzione più lunghi costituiscono criticità molto rilevanti che occorre superare.

Nella ricerca di sistemi di solventi alternativi a quelli tossici, alcuni studi (Jeevan Kumar et al., 2017) hanno dimostrato che l'estrazione dei lipidi può essere fatta con solventi a base biologica che sono efficienti, convenienti ed ecologici. I terpeni sono estratti da piante e specie di agrumi e possiedono eccellenti proprietà chimiche e tecniche. Terpeni come il D-limonene, il p-cimene e la gomma trementina derivano rispettivamente da bucce di agrumi, pini e oli di foglie d'albero. Tra i solventi terpenici ad esempio, il D-limonene è stato utilizzato per l'estrazione dei lipidi di *Chlorella vulgaris* ed è stato osservato che la qualità e la resa ottenuta sono simili a quelle conseguite impiegando l'esano (Tanzi et al., 2012).

Parellelamente è emerso un nuovo tipo di solventi *green* denominati solventi bio-derivati, originati da materie prime agricole o bio-based. L'introduzione di questi solventi in sostituzione di quelli organici convenzionali non solo fornisce benefici ambientali ma evita anche il costoso percorso di produzione basato sul petrolio. Recentemente, i solventi bio-based commercializzati includono il lattato di etile e il metilsoiato, prodotti da risorse rinnovabili come mais, agrumi e soia. Nonostante l'impiego dei solventi bio-based sia promettente, ai fini dell'impiego su larga scala, risultano ancora da esaminare attentamente sia la performance cinetica dei solventi che gli aspetti termodinamici dei processi di estrazione.

Interessanti sono anche i risultati ottenuti impiegando solventi commutabili le cui prestazioni possono risultare superiori rispetto a quelle ottenute con i tradizionali solventi organici nell'estrazione dei lipidi dalle microalghe (Samorì et al., 2013; Jessop et al., 2011). Si tratta di solventi a idrofilia commutabile che non solo cambiano la loro polarità alla commutazione, ma passano anche da miscibilità scarsa a miscibilità eccellente.

Per ridurre al minimo gli inconvenienti connessi ai lunghi tempi di esecuzione, è stata introdotta una nuova tecnica di estrazione con solvente definita accelerata, che utilizza solventi a temperature tra 50 e 200°C e pressioni tra 10 e 15 MPa. L'alta pressione assicura che il solvente rimanga sempre allo stato liquido per un'estrazione rapida e sicura mentre le temperature elevate aumentano la solubilità del solvente nella biomassa e la maggiore pressione mantiene il solvente allo stato liquido ad alte temperature al di sopra del punto di ebollizione.

#### *Estrazione supercritica di CO<sub>2</sub>*

Il potere solvente di un fluido supercritico, essendo una funzione della densità, può essere variato modificando la pressione e la temperatura di estrazione, ed è in grado di produrre lipidi grezzi privi di solvente (Santana et al., 2012). La CO<sub>2</sub> supercritica (SCCO<sub>2</sub>) è il solvente primario comunemente usato per la maggior parte delle estrazioni di fluidi supercritici grazie alla sua moderata pressione critica (7,4 MPa) e la sua bassa temperatura critica (31,1°C). Le variabili operative che influenzano le prestazioni dell'estrazione SCCO<sub>2</sub> di lipidi delle microalghe sono la pressione, la temperatura, la portata del fluido e l'aggiunta eventuale di un modificatore. Le condizioni ottimali delle variabili operative sono importanti per ridurre il fabbisogno energetico e massimizzare la resa lipidica nell'estrazione. La letteratura riporta i risultati di molti studi dedicati al confronto tra i differenti metodi di estrazione applicati a diverse specie di alghe, e fondati sull'impiego di più solventi e condizioni operative modulati per massimizzare la resa in lipidi (Tang et al., 2011; Liao B.-C. et al., 2010; Sheng et al., 2011).

#### *Estrazione tramite liquidi ionici*

I liquidi ionici sono adatti per l'estrazione di lipidi dalle alghe grazie alla loro non volatilità, stabilità termica e flessibilità sintetica. Miscele di liquidi ionici quali 1-butil-3-metilimidazolo trifluorometansolfonato ed etanolo o 1-butil-3-metilimidazolo metilesolfato + [MeSO<sub>4</sub>] sono state impiegate per estrazioni da alghe del tipo *C. vulgaris* (Kim et al., 2012; Kim et al., 2013).

#### *Estrazione dell'olio dalla biomassa algale umida*

L'essiccazione e l'estrazione dell'olio dalle microalghe rappresentano il 90% dell'energia totale del processo di estrazione a secco dei lipidi per la produzione di biodiesel algale (Lardon et al., 2009). Una riduzione del 25% dell'energia richiesta per

L'essiccazione della biomassa algale può essere ottenuta utilizzando la biomassa algale umida ossia che non abbia subito il processo di essiccazione. Alcuni autori hanno documentato l'estrazione di olio da microalghe umide tramite l'impiego di etere dimetilico liquido (DME) come solvente per estrarre idrocarburi e lipidi da *B. braunii* umida con alte rese attraverso un processo in grado di risparmiare l'energia necessaria per l'essiccazione e la distruzione delle cellule della biomassa algale (Kanda et al., 2012). A ciò va aggiunto anche che dal confronto tra i due solventi, in termini di classificazione di pericolosità, sembra preferibile l'utilizzo del DME in quanto oltre alle caratteristiche di infiammabilità, il n-esano presenta anche una serie di rischi per la salute tra cui la possibilità di indurre irritazione cutanea e l'azione tossica verso specifici organi bersaglio.

Finora, gli studi basati sull'estrazione dell'olio dalle alghe sono limitati alla scala di laboratorio e ulteriori indagini sono necessarie per condurre i processi di estrazione a partire da grandi quantità di alghe e a costi contenuti. È evidente che la scalabilità dei metodi di estrazione sia di cruciale importanza per ottenere grandi quantità di olio d'alga destinato alla produzione di biodiesel.

La maggior parte dei test sperimentali ad oggi condotti ha impiegato solventi organici (n-esano, cloroformio, metanolo, etanolo, etere di petrolio, diclorometano, isopropanolo) per l'estrazione dell'olio dalla biomassa per il minore investimento iniziale di capitale richiesto per l'apparecchiatura. Come già detto, molti di questi solventi potrebbero costituire, se impiegati su larga scala, un rischio rilevante per la salute e per la sicurezza in ambito professionale.

Per ottenere la massima resa di lipidi dalle alghe, l'adozione di un unico metodo di estrazione si è rivelato implementabile facendo ricorso a pretrattamenti fondati sull'uso di ultrasuoni e metodi assistiti da microonde combinati con estrazione con solvente e pressa meccanica finale. La tecnica di estrazione con fluido supercritico impiega solventi meno tossici per estrarre i lipidi, ma l'investimento di capitale iniziale è certamente molto alto.

Accanto allo studio delle possibilità di impiego di solventi green sono di attuale interesse anche i metodi e le tecniche utili allo sviluppo delle seguenti tecnologie di estrazione alternative ed eco-sostenibili:

- estrazione assistita da microonde (MAE: Microwave assisted extraction) (Balasubramanian et al., 2010; Virost et al., 2008; Benov et al., 2002);
- estrazione assistita da enzimi (EAE: Enzyme-assisted extraction);
- estrazione assistita da tensioattivi (SAE: surfactant-assisted extraction) (Zeng et al, 2007; Bergero et al., 2013; Nasirpour et al., 2014; Cheng et al., 2014);
- estrazione dei lipidi dalla biomassa umida delle alghe.

Per gli approfondimenti su tali tecniche si rimanda alla letteratura di merito richiamata nella bibliografia.

### *Sistemi di trattamento di acque reflue con microalghe*

Negli impianti di trattamento di acque reflue tramite l'impiego di microalghe, costituiscono fonti di rischio professionale sia gli inquinanti presenti nelle acque o che si formano nelle fasi di processo che quelli impiegati per i trattamenti di depurazione, costituiti in buona parte da miscele inorganiche, spesso in soluzione acquosa. I profili di esposizione per chi lavora in tali impianti sono pertanto paragonabili a quelli individuabili per gli operatori degli impianti di trattamento di acque reflue con tecnologie tradizionali.

In generale, le acque reflue possono contenere un gran numero di sostanze chimiche potenzialmente pericolose: in funzione della relativa provenienza, dei processi di trattamento dell'acqua potabile e dei tipi di industrie che scaricano le acque in fogna, possono includere solventi organici clorurati e pesticidi, policlorobifenili (PCB), idrocarburi aromatici policiclici, idrocarburi del petrolio, ritardanti di fiamma, nitrosammine, metalli pesanti, amianto, diossine e materiali radioattivi.

Inoltre, gli operatori degli impianti di trattamento possono essere esposti a solfuro di idrogeno, metano, monossido di carbonio, cloroformio e altre sostanze generate nelle fasi di trattamento.

Le modalità di esposizione prevalenti sono di tipo cutaneo ed inalatorio mentre più improbabile anche se non impossibile risulta essere l'ingestione.

Le principali fasi dei processi cui è associata una potenziale esposizione ad agenti chimici sono: lo scaricamento da mezzi di trasporto, il rifornimento di serbatoi e cisterne e il campionamento di rifiuti liquidi. L'inalazione può assumere aspetti di particolare disagio o pericolo per la presenza sia di composti volatili di natura organica (quali metano, composti solforati, composti organici volatili, peracidi organici) sia di composti inorganici (quali composti clorurati, polielettroliti) ed anche di polveri (solfato di alluminio, flocculanti). L'inalazione può avvenire anche qualora siano presenti sostanze chimiche pericolose negli aerosol prodotti per azione meccanica ad esempio da aeratori, coclee, pompe e centrifughe.

In associazione a tali impianti sono rilevabili condizioni di:

- esposizione cronica per inalazione o ingestione di sostanze chimiche utilizzate nel trattamento delle acque reflue (agenti ossidanti quali cloro, biossido di cloro, ipoclorito, ozono, acidi e alcali forti, coadiuvanti di sedimentazione o flottazione);
- dermatosi causate dall'esposizione della pelle ad acque di scarico, a formulazioni detergenti, a soluzioni acide e alcaline, ecc.;

- irritazione delle membrane mucose (in particolare del tratto respiratorio) da vapori o aerosol acidi o alcalini, da solfuro di idrogeno e altre sostanze (ILO; 2020).

Infortuni di tipo chimico possono verificarsi per avvelenamento acuto causato da varie sostanze chimiche presenti nei rifiuti, usate come reagenti (per esempio, cloro gassoso) o rilasciati durante il trattamento; un pericolo particolare è causato dal possibile rilascio di una serie di gas velenosi, per esempio acido cianidrico (dalla placcatura dei metalli o dal trattamento dei rifiuti per acidificazione), idrogeno solforato, ecc. Tra i possibili infortuni vanno segnalate anche le ustioni chimiche causate da liquidi corrosivi.

Gli impianti di trattamento delle acque reflue sono stati ampiamente studiati tramite l'impiego delle tecniche dell'analisi di rischio. Il metodo semiquantitativo HIRA (Hazard Identification and Risk Assessment) è stato applicato a tali impianti con la finalità di individuarne i pericoli e la probabilità, frequenza e gravità associate al fine di valutarne le conseguenze avverse (comprese le potenziali perdite e lesioni) e stabilire una scala di priorità degli interventi di gestione del rischio da mettere in campo. Uno studio condotto raccogliendo dati primari (osservazioni dirette e interviste) e secondari (descrizione generale di aziende di trattamento, procedure di lavoro, numero di lavoratori, strumenti e materiali pericolosi di processo, sistemi di controllo aziendali degli incidenti) in impianti di trattamento di acque reflue ha condotto alla identificazione di 22 rischi potenziali dei processi in essi condotti. Secondo tale approccio metodologico costituiscono condizioni di rischio estreme, oltre ai corto circuiti elettrici, solo le perdite di cloro e gli incendi cui possono essere imputati veri disastri industriali con gravi impatti sulla vita umana e sull'ambiente. Condizioni di rischio elevato si riscontrano anche nell'esposizione ad  $H_2SO_4$  per effetto di anomalie di funzionamento dei relativi sistemi di stoccaggio e di dosaggio (Falakh e Setiani, 2018).

In anni più recenti, l'applicazione dello stesso metodo HIRA ad un impianto di trattamento di acque reflue di Di An City in Vietnam ha condotto alla conclusione che tra i rischi prioritari dell'impianto vi è il rilascio di agenti chimici e il rischio di incendio ed esplosione cui è associato un forte impatto sulla salute dei lavoratori e sull'efficienza dell'impianto stesso. In particolare, il sistema di trattamento degli effluenti gassosi non rappresenta solo una criticità ai fini ambientali nel caso in cui la concentrazione di gas di scarico non soddisfi gli standard prescritti dalle normative di riferimento, ma può costituire anche causa di avvelenamento degli operatori di impianto in caso di perdite incontrollate di sostanze quali acido solforico (impiegato per rimuovere  $NH_3$ ) e di NaOH e NaOCl (impiegati per rimuovere  $H_2S$  e  $CH_3SH$ ) (Tong Tron et al., 2017).

Ancora, una procedura generale di gestione dei rischi ispirata allo standard ISO 31000 (ISO 31000, 2018), applicata ad un impianto di trattamento di acque reflue di un piccolo comune della Repubblica Slovacca, ha evidenziato che, tra i rischi per la salute umana, quello di intossicazione è associato alle seguenti attività/fasi lavorative identificate nell'impianto oggetto di studio:

- stazione di pompaggio: cestello, pompe sommergibili per fanghi, attrezzatura di sollevamento (puleggia);
- gestione dei fanghi: serbatoio di ispessimento dei fanghi, pompa dei fanghi, disidratatore dei fanghi (Tušer et al., 2021).

La prevenzione dei rischi connessi all'impiego di sostanze chimiche negli impianti di trattamento delle acque reflue richiede, in via preliminare, un inventario delle sostanze pericolose impiegate e la valutazione degli impatti sulla salute e sulla sicurezza degli operatori, cui segue necessariamente lo sviluppo e l'implementazione di un programma di monitoraggio (Dejan et al., 2018).

Tra le misure di prevenzione più efficaci al fine del contenimento dell'esposizione professionale ad agenti chimici nel settore del trattamento delle acque reflue vi sono: la predisposizione e la manutenzione dei sistemi di controllo della ventilazione, l'etichettatura delle tubazioni, l'assicurazione che i lavoratori e la direzione (e i supervisori) comprendano i rischi attraverso l'educazione sui pericoli, l'importanza di seguire pratiche di lavoro sicure e misure igieniche appropriate, la predisposizione di procedure scritte di lavoro per eliminare o ridurre al minimo il rischio di esposizione e per affrontare le procedure di emergenza e di pulizia in caso di fuoriuscita o rilascio accidentale di un agente chimico, l'utilizzo di idonei dispositivi di protezione individuale comprendenti tute e guanti repellenti ai liquidi, stivali, occhiali, respiratori e schermi per occhi/viso a prova di schizzi. Nel caso si rendano necessari i respiratori, un programma completo di addestramento all'uso deve includere test di adattamento del respiratore.

Ulteriori misure comprendono: la captazione, aspirazione, depurazione e ricambio adeguato dell'aria inquinata, l'aspirazione da posizione sicura o filtrazione dell'aria immessa nei locali di riposo, la compartimentazione delle aree polverose e la separazione degli uffici amministrativi, l'utilizzo di sistemi di segregazione e contenimento nelle zone di stoccaggio dei prodotti chimici impiegati nelle fasi del processo, la pulizia degli ambienti "ad umido" e/o con aspirazione (Inail-Contarp, 2009).

### **6.3 Il biohazard ambientale ed occupazionale negli impianti di microalghe**

Come già anticipato, tra i principali pericoli per la salute umana derivanti dalla coltivazione delle microalghe, siano essi individuati e/o percepiti dai gestori, vi è la possibile presenza di biohazard durante l'esercizio degli impianti.

Il controllo dei predatori e dei patogeni nelle coltivazioni microalgali è fondamentale, anche se mantenere una monocoltura su larga scala risulta praticamente impossibile (Becker, 1994). Tale controllo è necessario soprattutto per ridurre al minimo il fallimento di una coltivazione, dovuto alla contaminazione microbiologica. Ad esempio, l'ubicazione del sito di produzione influisce sulla probabilità di contaminazione: dovrebbe essere ridotto al minimo il potenziale di contaminazione da parte di corpi idrici vicini, impianti di trattamento di reflui e/o rifiuti e altre fonti simili. Nella scelta dell'ubicazione del sito, dovrebbero essere presi in considerazione i venti prevalenti, le rotte degli uccelli acquatici migratori, la probabilità di inondazioni, la vicinanza a foreste, paludi e altri habitat di specie acquatiche (Molina Grima et al., 2022).

Pratiche rigorose per escludere o ridurre al minimo la contaminazione da microrganismi indesiderati sono ben consolidate nella trasformazione commerciale di alimenti e prodotti farmaceutici. Tali pratiche includono protocolli e metodi validati per la sanificazione, sterilizzazione e le operazioni di pulizia delle apparecchiature di processo e le norme igienico-sanitarie per la prevenzione della contaminazione (Chisti, 2014). Le buone pratiche includono la sterilizzazione delle acque, attraverso filtri a membrana sterili (dimensione nominale dei pori di 0,20–0,45 µm), dei terreni di coltura e dei gas di aerazione. La filtrazione su membrana permette la rimozione di tutti i contaminanti vitali tranne i virus (Chisti, 2007). Il mantenimento della coltura e la produzione degli inoculi devono avvenire nel rispetto delle buone pratiche di laboratorio e di microbiologia. Le operazioni di pulizia e sanificazione devono essere convalidate e documentate e rigorosamente adottate per tutte le attrezzature di produzione, anche quando si utilizzano gli open pond (stagni aperti) (Becker, 1994). La comprensione delle interazioni tra batteri e microalghe è di fondamentale importanza, mentre le conoscenze sono ancora limitate, così come l'effetto della crescita congiunta di microalghe e batteri sui microrganismi patogeni (Slompo et al., 2020), derivanti, per esempio, dal materiale fecale contenuto nelle acque reflue (Cai e Zang, 2013).

Non esistono indicatori universali per valutare la rimozione degli agenti patogeni, poiché attualmente viene utilizzata principalmente la ricerca di microrganismi, quali gli indicatori fecali, senza avere certezza della effettiva rimozione dei molti patogeni presenti (Chambonniere et al., 2021).

Nel caso di utilizzo raceway (RW) che trattano acque reflue, la rimozione dei patogeni è principalmente studiata in termini di assenza di coliformi e di *Escherichia coli*; i patogeni virali sono studiati attraverso la ricerca di adenovirus, mentre per i patogeni eucariotici sono ricercati *Cryptosporidium spp.* e *Giardia intestinalis* (Buchanan et al., 2018; Abd-Elmaksoud et al., 2021).



Sono stati condotti pochi studi con l'obiettivo di caratterizzare gli agenti patogeni negli impianti di trattamento delle acque reflue (Cai e Zhang, 2013; Oluseyi Osunmakinde et al., 2019), così come sono scarsi gli studi di caratterizzazione degli stessi negli impianti microalgali (Delanka-Pedige et al., 2019). Ciò evidenzia la necessità di incrementare i dati sperimentali in questo campo per valutare l'efficienza di rimozione degli agenti patogeni nei RW (Chambonniere et al., 2021).

Tali evidenze sperimentali possono, altresì, dare importanti informazioni sulla necessità di una fase finale di disinfezione delle acque per eliminare la carica batterica residua e destinare l'effluente al riutilizzo agricolo (Mulbry et al., 2005).

In ambienti di ricerca per la coltivazione delle microalghe sono generalmente impiegati impianti dimostrativi (raceways o thin layers) che lavorano su reflui primari o secondari. Di solito sono allestiti all'aperto o sotto serre in un'unica unità. Nel caso in cui si utilizzino acque reflue per la coltivazione delle microalghe, devono essere considerati anche i pericoli biologici per la salute pubblica derivanti dagli usi successivi della biomassa algale e delle acque reflue trattate, impiegati ad esempio come fertilizzante o biostimolante in agricoltura. A tali pericoli possono risultare esposti i lavoratori agricoli e le popolazioni che vivono nelle vicinanze degli impianti di coltivazione delle microalghe (Sarker, 2021).

Al fine di identificare i microrganismi fonte di biohazard, sono state identificate una serie di tecniche per la caratterizzazione delle comunità eucariotiche e procariotiche presenti negli impianti di coltivazione e, nello specifico, nelle acque in ingresso nel reattore, nella biomassa microalgale e nell'effluente in uscita dall'impianto.

Sulla base di una review della letteratura di merito, sono state individuate quattro tecniche di analisi, riportate in Figura 6, al fine di:

- analizzare la struttura e la diversità delle comunità microbiche attraverso l'analisi dell'rRNA 16S (batterico) e 18 S (algale);
- effettuare lo screening dei microrganismi patogeni attraverso array commerciale qPCR (presenza/assenza di 45 patogeni noti o microrganismi indicatori di contaminazione);
- verificare la vitalità dei microrganismi, dal momento che le metodologie molecolari basate su Polymerase Chain Reaction (PCR) non distinguono microrganismi vitali da quelli dormienti, morti e DNA extracellulare;
- analizzare l'intera comunità microbica, attraverso Whole Genome Sequencing (WGS), mediante l'analisi delle sequenze geniche dell'rRNA e la presenza di geni codificanti per enzimi specifici.

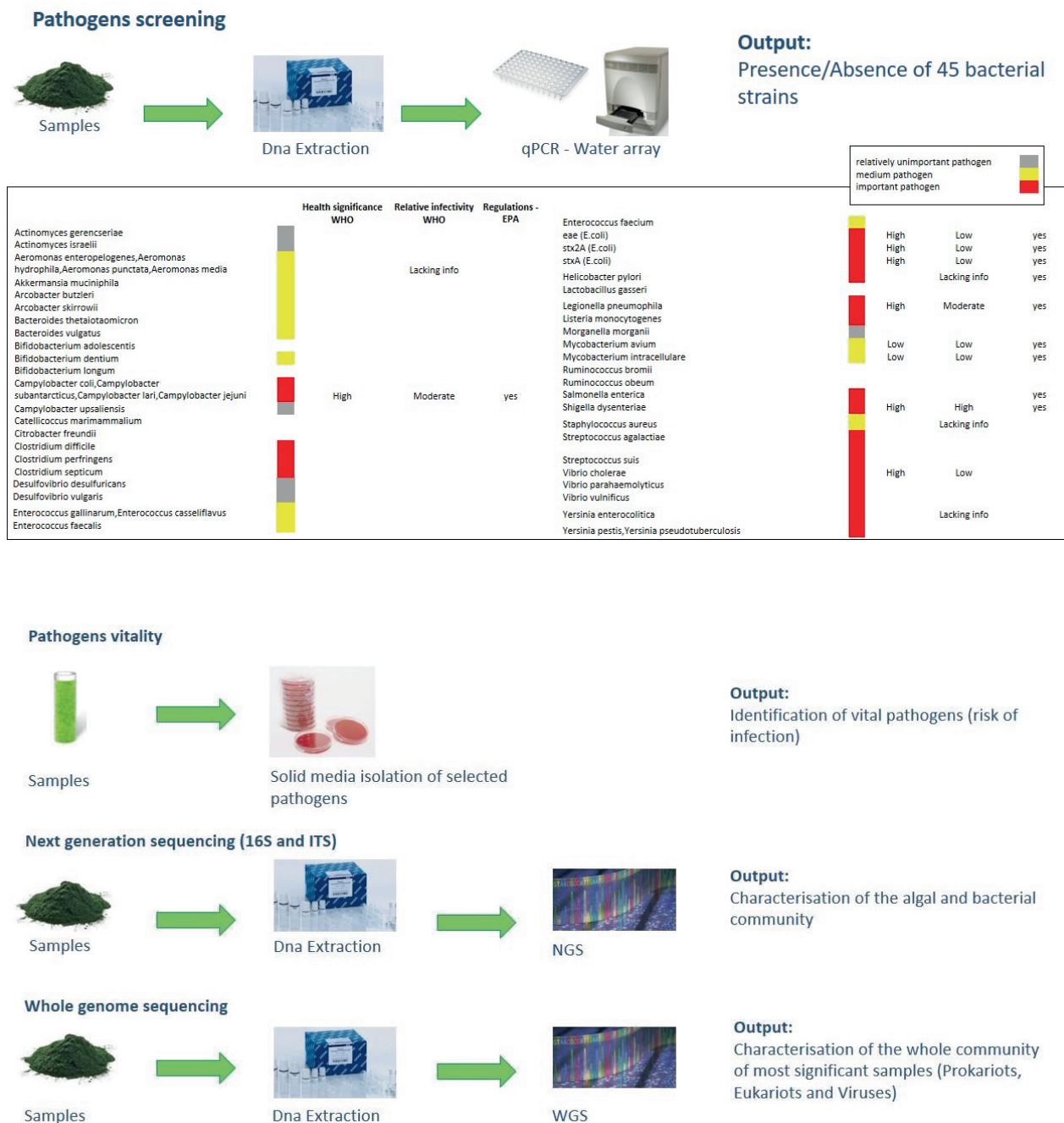


Figura 6. Tecniche selezionate e workflow generale

Tali tecniche sono state impiegate al fine di valutarne l'efficacia nell'identificazione e caratterizzazione dei microrganismi, dapprima su due impianti di coltivazione algale su scala dimostrativa e, successivamente, su due impianti full scale: uno per la produzione alimentare di Spirulina, con sede in Italia, ed uno per il trattamento delle acque reflue in funzione in Spagna.

## 7. Casi studio

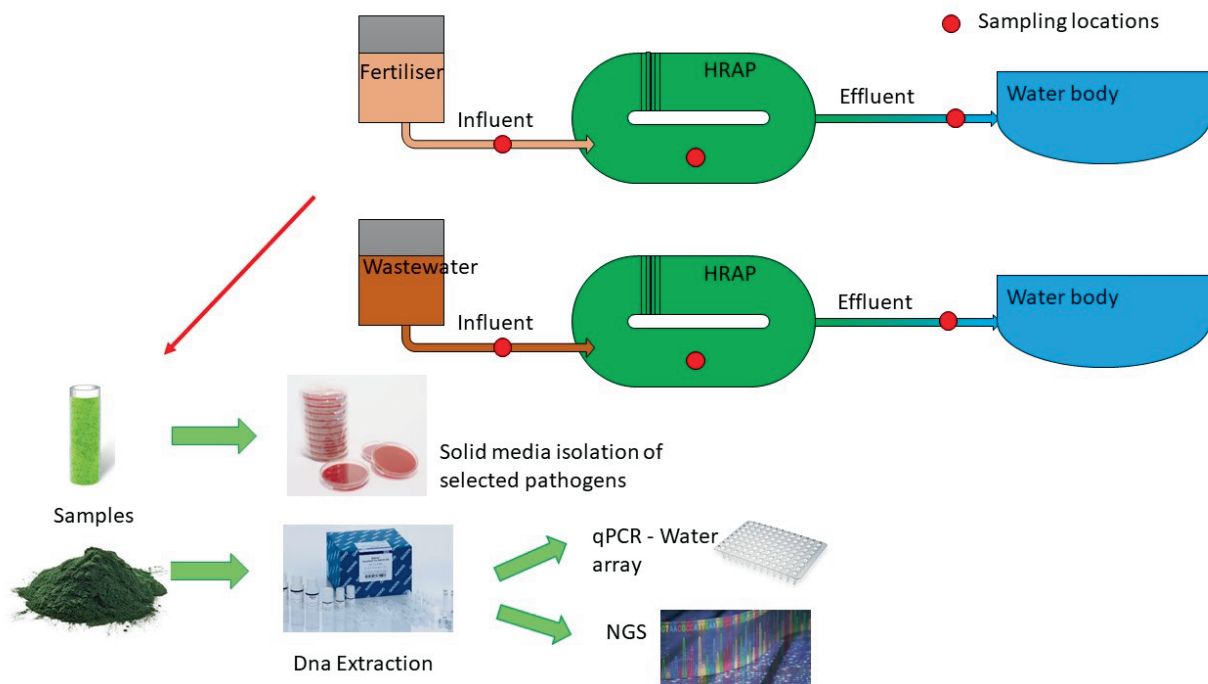
### 7.1 Impianti su scala dimostrativa

Con l'obiettivo di identificare i pericoli biologici connessi alla coltivazione microalgale è stata condotta un'analisi comparativa tra due impianti raceway (RW) sperimentali inoculati con lo stesso ceppo microalgale, *Scenedesmus almeriensis*.

La biomassa di *S. almeriensis* è descritta come fonte potenziale di biomolecole ad alto valore come la luteina, la zeaxantina; può essere inoltre impiegata in acquacoltura, nel trattamento di acque reflue, in agricoltura come fonte di biofertilizzanti e/o biostimolanti e, grazie alla sua alta produttività in lipidi (144 mg/L·day), come promettente feedstock per la produzione di biodiesel (Bani et al., 2021).

Il primo RW è stato alimentato con acque e fertilizzante (F-RW), mentre il secondo con acque reflue civili (WW-RW), in modo da avere due condizioni sperimentali caratterizzate rispettivamente da un basso (F-RW) e da un alto carico batterico (WW-RW).

Lo studio del F-RW ha permesso di analizzare lo sviluppo delle comunità batteriche ed eucariotiche in condizioni "pulite" al fine di investigare il possibile apporto di microrganismi dall'ambiente esterno. Come sopra riportato, infatti, i reattori aperti sono facilmente contaminati dall'ambiente circostante e da altre specie di alghe, batteri o predatori che potrebbero competere con le specie bersaglio di interesse. Il monitoraggio del sistema è stato effettuato a tre diversi tempi di campionamento: T1 al raggiungimento dello stato stazionario della coltura (marzo 2021), T2 a metà del periodo sperimentale (maggio 2021) e T3 alla fine della sperimentazione (giugno 2021). Sono state monitorate tre diverse postazioni e, nello specifico, le acque in ingresso al RW, la biomassa nella vasca di coltivazione e l'acqua in uscita dal RW (Figura 7).



**Figura 7.** Design sperimentale per gli impianti RW a scala dimostrativa

Le performance di crescita sono risultate simili tra i due RWs, comparabili o leggermente inferiori rispetto a quelli osservati in altri studi (Morillas Espana et al., 2020; Morales-Amaral et al., 2015).

Le comunità batterica ed eucariotica e la loro dinamica di sviluppo sono state dapprima caratterizzate con un'analisi Next Generation Sequencing (NGS) dei geni 16S e 18S rRNA. È stato quindi utilizzato un array qPCR commerciale per valutare la potenziale presenza di specifici agenti patogeni comunemente rilevabili nelle acque reflue. Infine, la vitalità degli agenti biologici identificati è stata valutata attraverso il metodo delle conte su piastra. Questi metodi hanno dato prova di essere complementari per una completa caratterizzazione della struttura delle comunità e per l'identificazione dei microrganismi fonte di biohazard, ambientale ed occupazionale, negli impianti di coltivazione microalgale a partire da acque reflue o acqua e fertilizzante.

I materiali e i metodi della sperimentazione condotta sui due RW sono riportati in Clagnan et al., 2022.

### Risultati

Per garantire una crescita ottimale di *Scenedesmus almeriensis*, il livello dell'acqua nei RW è stato mantenuto ad una media di 15 cm, mentre l'ossigeno disciolto al 131% e il pH a 7,8 (Morillas-Espana et al., 2020). Durante l'intero periodo sperimentale, i RW hanno registrato una temperatura media di 25°C. Poiché i tassi di crescita delle

microalghe dipendono dalla concentrazione intracellulare di nutrienti, il fertilizzante per il reattore (F-RW) e le acque reflue per il reattore (FR- WW) sono stati forniti in condizioni non limitanti sia di N (N-NO<sup>3-</sup> nel F-RW: tra 74 e 118 mg L<sup>-1</sup>; sia di N-NH<sup>4+</sup> nella WW-RW: tra 21 e 140 mg L<sup>-1</sup>) e P (P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> tra 4 e 25 mg L<sup>-1</sup>).

È stato dimostrato che la concentrazione di N totale nell'intervallo tra 50-100 mg L<sup>-1</sup> e di P totale di 6-12 mg L<sup>-1</sup> fornisce nutrienti sufficienti per massimizzare il tasso di crescita per un'elevata produzione di biomassa di *Scenedesmus* (Abu Hajar et al., 2017).

A causa delle condizioni nutritive non limitanti, le prestazioni di crescita non sono state ostacolate, pertanto non sono state osservate differenze significative tra i due RW nel tempo e sono risultate paragonabili o leggermente inferiori ai risultati di altri studi.

La produttività ha raggiunto valori medi di 15,5 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> e 17 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup>, rispettivamente per WW-RW e F-RW. In uno studio precedente, *Scenedesmus* ha raggiunto la massima produttività a 24 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> in RW (32 m<sup>2</sup>), con un picco durante i mesi estivi (luglio - settembre), mentre variava tra 10 e 20 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> da marzo a maggio (Morillas-Espana et al., 2020).

#### *Composizione della comunità eucariotica*

Come sopra riportato, il sequenziamento DNA di nuova generazione (NGS) può essere utilizzato a più livelli, da quello di screening (per esempio, NGS-16S del gene 16SrRNA, in cui si mira ad una indagine preliminare della diversità microbica), ad analisi più avanzate, in cui si possono indagare interi genomi microbici (WGS) o intere comunità microbiche tramite la metagenomica shotgun, applicata per la caratterizzazione molecolare di genomi microbici. Tali tecniche sono state applicate allo studio della composizione delle comunità eucariotica e batterica degli impianti RW a scala dimostrativa.

I risultati mostrano che, sebbene entrambi i reattori siano stati inoculati con lo stesso ceppo microalgale (*Scenedesmus almeriensis*), si è sviluppato ed alternato nel tempo nei RW un mix di più generi di microalghe. In generale, le comunità eucariotiche hanno mostrato una maggiore ricchezza e diversità in F-RW (p <0,05), specie nell'acqua in ingresso (Tabella 4 e Figura 8).

Sia l'indice di Shannon, che indica quanto sono diverse le specie in una data comunità, che l'indice di Evenness, che esprime il grado di omogeneità col quale gli individui sono distribuiti nelle varie specie che compongono una comunità, erano simili tra i RW e ai diversi tempi. Tuttavia una maggiore diversità è stata nuovamente osservata nei

campioni dell'acqua in ingresso, in particolare nel sistema sperimentale F-RW ( $p < 0,05$ ).

Sono state osservate numerose microalghe verdi presenti in alta abbondanza e rappresentate dai generi *Ochromonas*, *Picochlorum*, *Oocystis*, *Dictyosphaerium*, *Poteriospumella* e *Micractinium*) (Figura 8).

**Tabella 4.** Indici di diversità di Shannon e Evenness osservati per le comunità batteriche (a sinistra) ed eucariotiche (a destra). Le lettere indicano le differenze statisticamente significative

	<b>Bacteria</b>		<b>Shannon</b>		<b>Evenness</b>		<b>Eukarya</b>		<b>Shannon</b>		<b>Evenness</b>	
	<b>Observed</b>						<b>Observed</b>					
<b>F-RW</b>												
<b>T2</b>												
Inlet	560 ( $\pm 97$ )	a,b	5.14 ( $\pm 0.05$ )	b,c	0.81 ( $\pm 0.01$ )	a,b,c,d	132 ( $\pm 5$ )	a,b	3.29 ( $\pm 0.03$ )	b	0.67 ( $\pm 0.00$ )	a,b
Biomass	447 ( $\pm 85$ )	a,b,c	4.88 ( $\pm 0.05$ )	c,d	0.80 ( $\pm 0.01$ )	b,c,d	82 ( $\pm 3$ )	a,b	2.55 ( $\pm 0.02$ )	e	0.58 ( $\pm 0.00$ )	d
Outlet	473 ( $\pm 87$ )	a,b,c	4.89 ( $\pm 0.05$ )	c,d	0.80 ( $\pm 0.01$ )	c,d	99 ( $\pm 7$ )	a,b	3.16 ( $\pm 0.00$ )	b,c	0.69 ( $\pm 0.01$ )	a
<b>T3</b>												
Inlet	351 ( $\pm 10$ )	a,b,c	4.58 ( $\pm 0.02$ )	e,f	0.78 ( $\pm 0.00$ )	c,d	168 ( $\pm 51$ )	a	3.64 ( $\pm 0.05$ )	a	0.72 ( $\pm 0.03$ )	a
Biomass	205 ( $\pm 5$ )	c	3.88 ( $\pm 0.00$ )	g	0.73 ( $\pm 0.00$ )	e	87 ( $\pm 13$ )	a,b	3.04 ( $\pm 0$ )	c,d	0.68 ( $\pm 0.02$ )	a,b
Outlet	272 ( $\pm 20$ )	b,c	4.34 ( $\pm 0.05$ )	f	0.78 ( $\pm 0.00$ )	d	70 ( $\pm 3$ )	b	2.58 ( $\pm 0.05$ )	e	0.61 ( $\pm 0.02$ )	b,c,d
<b>WW-RW</b>												
<b>T2</b>												
Inlet	522 ( $\pm 30$ )	a,b,c	5.31 ( $\pm 0.06$ )	a,b	0.85 ( $\pm 0.00$ )	a	67 ( $\pm 1$ )	b	2.90 ( $\pm 0.01$ )	d	0.69 ( $\pm 0.00$ )	a
Biomass	357 ( $\pm 5$ )	a,b,c	4.79 ( $\pm 0.00$ )	c,d	0.82 ( $\pm 0.00$ )	a,b,c,d	79 ( $\pm 1$ )	b	2.90 ( $\pm 0.00$ )	d	0.66 ( $\pm 0.00$ )	a,b,c
Outlet	434 ( $\pm 15$ )	a,b,c	4.98 ( $\pm 0.03$ )	c,d	0.82 ( $\pm 0.00$ )	c,d	75 ( $\pm 1$ )	b	2.62 ( $\pm 0.01$ )	e	0.61 ( $\pm 0.00$ )	b,c,d
<b>T3</b>												
Inlet	698 ( $\pm 146$ )	a	5.49 ( $\pm 0.12$ )	a	0.84 ( $\pm 0.01$ )	a,b	71 ( $\pm 4$ )	b	3.15 ( $\pm 0.00$ )	c	0.74 ( $\pm 0.01$ )	a
Biomass	255 ( $\pm 1$ )	b,c	4.32 ( $\pm 0.01$ )	f	0.78 ( $\pm 0.00$ )	c,d	49 ( $\pm 2$ )	b	2.21 ( $\pm 0.01$ )	f	0.57 ( $\pm 0.00$ )	d
Outlet	377 ( $\pm 11$ )	a,b,c	4.87 ( $\pm 0.03$ )	c,d	0.82 ( $\pm 0.00$ )	a,b,c	85 ( $\pm 11$ )	b	2.64 ( $\pm 0.03$ )	e	0.60 ( $\pm 0.01$ )	c,d



### Composizione della comunità batterica

Contemporaneamente è stata effettuata una analisi NGS per avere una “fotografia” della comunità batterica nel suo complesso e acquisire un primo screening dei generi che potrebbero rappresentare un rischio per la salute, per l’eventuale presenza di specie patogene e/o opportuniste. La comunità batterica ha mostrato un numero maggiore di specie batteriche di origine enterica nel WW-RW. Sono stati osservati in tutti i campioni generi batterici appartenenti ai phyla Bacteriodata e Proteobacteria, con un range dei valori massimi e minimi pari a 18,2–35,5% e 7,0–53,6% rispettivamente. Essi sono noti per essere ampiamente distribuiti e, insieme ai Planctomiceti (1,5–16,6%), rivestono un ruolo ecologico importante, essendo coinvolti nei cicli del carbonio, dello zolfo e dell’azoto.

Le acque reflue in ingresso a WW-RW, a differenza di quelle del F-RW, sono state caratterizzate dalla presenza del phylum Campylobacterota (4,7% e 11,7%) che presentano, insieme a Firmicutes (15,8% e 18,7%), un elevato numero di generi presenti nel tratto intestinale principalmente come simbionti, ma che possono avere un ruolo come patogeni opportunisti. I cianobatteri risultano presenti al di sotto del 3% nelle acque in uscita di entrambi i RW al tempo T3.

A livello di genere, le comunità batteriche si presentavano molto variabili, con un’alta percentuale di generi presenti in bassa abbondanza (Figura 8).

Le acque in ingresso ad entrambi i RW erano caratterizzati dalla presenza di generi batterici degradatori, e generi indicatori di contaminazione fecale, osservati nel WW-RW. L’ingresso in F-RW al tempo T2 era caratterizzato da generi batterici quali *Schlesneria* (5,4%) e *Nitrospira* (4,4%), entrambi coinvolti nel ciclo dell’azoto. *Schlesneria* è inoltre in grado di degradare i biopolimeri (Kulichevskaya et al., 2007).

Le acque reflue in ingresso al WW-RW erano caratterizzati dai generi *Arcobacter* e *Bacteroides*, *Thiovirga* e *Anaerovorax*. Le relative abbondanze sono mostrate in Figura 8.

Il genere *Arcobacter* contiene enteropatogeni emergenti e potenziali agenti zoonotici, spesso associati a epidemie di origine idrica (Collado e Figueras, 2011), mentre i *Bacteroides*, sebbene, si trovino comunemente nella microflora intestinale, possono essere anche patogeni clinici significativi (Wexler, 2007). Il genere *Thiovirga* contribuisce alla rimozione del solfuro (Lan et al., 2019) e *Anaerovorax* alla degradazione delle molecole proteiche (Kong et al., 2022).

I generi batterici osservati in entrambi i RW indicano che l’ambiente esterno influenza l’insediamento delle comunità microbiche all’interno del reattore (Bani et al., 2021). Questo effetto, indesiderato ma inevitabile, perché riconducibile al fatto che i raceway sono allestiti all’aperto, potrebbe comportare la presenza anche di possibili



agenti patogeni (Molina-Grima et al., 2022). All'interno dei campioni di biomassa e nelle acque in uscita dai RW si sono effettivamente osservati generi batterici che possono presentare specie patogene (ad esempio *Chryseobacterium*, *Aeromonas*, *Brevundimonas*, *Roseomonas* ed *Elizabethkingia*). Inoltre, come previsto, sono presenti anche molti generi batterici che svolgono un ruolo nei processi di biodegradazione e biorisanamento (ad esempio, *Arenimonas*, *Phenylibacterium*, *Porphyrobacter*, *Gemmatimonas*, *Leptothrix* e *Polymorphobacter*).

Secondo l'elenco di riferimento tassonomico delle microalghe nocive del CIO-UNESCO (Lundholm et al., 2009) nei due RW non sono state rilevati ceppi di microalghe eucariotiche tossiche, ad eccezione di tracce del ceppo di *Fibrocapsa japonica*, una microalga marina flagellata, che appartiene alla classe delle Raphidophyceae, in grado di produrre tossine, quali le emolisine (de Boer et al., 2012). D'altronde la sostituzione con microalghe spontanee, del ceppo di *Scenedesmus almeriensis* impiegato come inoculo dei due RW, indica che possono svilupparsi ceppi di microalghe produttrici di tossine.

L'analisi NGS ha evidenziato, in bassa abbondanza (<3%), la presenza di parassiti umani, quali *Acanthamoeba* sp., *Balamuthia mandrillaris*, *Basidiobolus microspores*, *Blastocystis* sp., *Cryptosporidium parvum*, *Iodamoeba* spp., *Naegleria neojejuensis*, *Paralagenidium karlingii*, *Rhynchomonas nasuta*, *Tetratrichomonas*, *Trepomonas* e *Vermamoeba vermiformis*) o carriers di patogeni, tra i quali *Echinamoeba exundans*, *Vannella* spp., *Paramecium* spp. e *Tetrahymena*. Questi microrganismi rappresentano lo 0,1-3,3% della comunità totale, con i picchi più alti nell'influenza di WW-RW costituito da acque reflue.

Anche per la comunità batterica, la ricchezza osservata era simile tra i tempi T2 e T3 e tra F-RW e WW-RW, mentre i campioni di ingresso mostravano generalmente una ricchezza di specie maggiore rispetto ai campioni di biomassa ( $p < 0,01$ ) (Tabella 4). La tendenza ad una maggiore ricchezza e diversità nei campioni in ingresso indica la presenza di una maggiore varietà di generi e specie batteriche da tenere in considerazione per la valutazione del rischio biologico occupazionale durante le operazioni di gestione dell'acqua in ingresso agli impianti.

In termini di cianobatteri tossici, sono stati rilevati tre generi: *Cyanobium* (0,03-0,90%), *Limnothrix* (0,03-0,05%) e *Synechocystis* (0,01-0,03%). Sono poche le specie di questi generi che producono microcistine epatotossiche (Kubickova et al., 2019), così come, solo pochi ceppi di *Cyanobium* sono in grado di produrre la neurotossina saxitossina (Testai et al., 2016).

In relazione alle comunità batteriche, un'ampia sezione dei generi rilevati, soprattutto nei campioni prelevati dal WW-RW, presenta specie patogene opportuniste come *Aeromonas*, *Brevundimonas*, *Elizabethkingia*, *Chryseobacterium*, *Roseomonas*, *Flavobacterium* (Ryan e Pembroke, 2018; Lin et al., 2019; Mwanza EP et al., 2022; Ioannou et al., 2020; Waskiewicz e Irzykowska, 2014).

Sebbene la relazione tra batteri e microalghe non sia ancora completamente conosciuta (Cooper e Smith, 2015), poiché queste comunità si sviluppano all'interno degli stessi reattori, lo studio delle loro interazioni fornisce importanti informazioni di interesse gestionale/applicativo.

Le microalghe instaurano una vasta gamma di interazioni mutualistiche con i batteri. Attualmente vengono impiegati approcci trascrittomici, metagenomici e metabolomici combinati con analisi microbiologiche e biochimiche per migliorare le conoscenze delle interazioni algali-batteriche (Cooper e Smith, 2015). L'identificazione delle principali specie batteriche associate alle alghe indica che gruppi batterici specifici, in particolare gli alfa-proteobatteri, rilevati in maggiore abbondanza, sono particolarmente adatti ad instaurare e mantenere relazioni simbiotiche. Lo scambio di nutrienti è spesso alla base del mutualismo algale-batterico e, man mano che i composti coinvolti vengono caratterizzati, si accumulano prove che si tratta di molecole complesse e specifiche, che offrono opportunità per i processi di segnalazione e regolazione piuttosto che per la semplice diffusione passiva. Allo stesso tempo, è chiaro che le interazioni non sono statiche, ma possono essere avviate e interrotte in risposta a segnali ambientali e di sviluppo.

Anche le co-occorrenze tra microalghe e presunti parassiti eucarioti e patogeni batterici sono state analizzate. Il parassita eucariotico che ha mostrato il maggior numero di interazioni è stato *Echinamoeba exundans* (10 positivi e 4 negativi), noto come carrier di *L. pneumophila*, seguito da *Cryptosporidium parvum* (10 positivi e 4 negativi). Un risultato interessante è che entrambi i parassiti eucarioti risultano fortemente correlati negativamente con le principali microalghe di questi sistemi, come *Micractinium* e *Dictyosphaerium*. Tra i generi batterici che presentano specie patogene, il maggior numero di interazioni positive è stato mostrato dai generi *Bacillus* (12; positivi: 9), *Legionella* e *Leptospira* (entrambi 11; positivi 8). Sebbene il genere *Bacillus* possa contenere agenti patogeni, diverse specie di bacillaceae possono migliorare la crescita di microalghe, migliorando la fissazione dell'azoto atmosferico o producendo fitormoni. Questo può spiegare il maggior numero di correlazioni positive del genere *Bacillus* (Hernandez et al., 2009). D'altra parte, il maggior numero di interazioni negative è stato rilevato per i generi batterici *Enterobacter*, *Leptothrix* e *Roseomonas* (4 negativi).

Il crescente interesse nello sfruttamento delle microalghe come piattaforme biotecnologiche ha determinato un grande sviluppo degli studi sulle interazioni algali-batteriche. L'utilizzo di interazioni mutualistiche durante la coltivazione di biomassa algale è stato proposto come un modo per migliorare le rese e ridurre i costi e, in effetti, un aumento della produttività lipidica delle microalghe è stato notato in almeno un sistema di co-coltivazione (Cooper e Smith, 2015).

#### *Screening delle specie potenzialmente patogene*

Oltre all'analisi della struttura di popolazione a livello di genere condotta con tecniche NGS, è stato effettuato uno screening delle specie batteriche potenzialmente patogene, e dei marcatori di virulenza mediante qPCR. Tale tecnica risulta particolarmente utile per effettuare monitoraggi di routine per il rilevamento di un numero elevato di specie batteriche in breve tempo. In tale array commerciale sono comprese le specie maggiormente presenti nelle acque reflue (Cai & Zhang, 2013). Come previsto, WW-RW ha mostrato una carica microbica più elevata delle acque reflue in entrata al WW-RW. L'attività di sanificazione, derivante dalla co-coltivazione, determina una riduzione della carica osservata, evidenziabile nella minore carica rilevata sia nella biomassa che nell'effluente in uscita e, in particolare, una maggiore riduzione è osservabile nella biomassa rispetto all'effluente.

Al contrario, F-RW ha mostrato una tendenza all'aumento del carico microbico, probabilmente dovuto alla contaminazione esterna successiva all'inoculo del reattore. In tale sistema, la maggior parte dei ceppi potenzialmente patogeni identificati nelle acque in ingresso sono risultati vitali con il metodo delle conte su piastra, ma risultavano assenti sia nella biomassa che nell'effluente in uscita. Specie batteriche di derivazione enterica e patogeni opportunisti e marker di virulenza sono stati rilevati in 17 dei 18 campioni prelevati dal WW-RW, che mostra una carica maggiore di patogeni rispetto al F-RW (Figura 9).

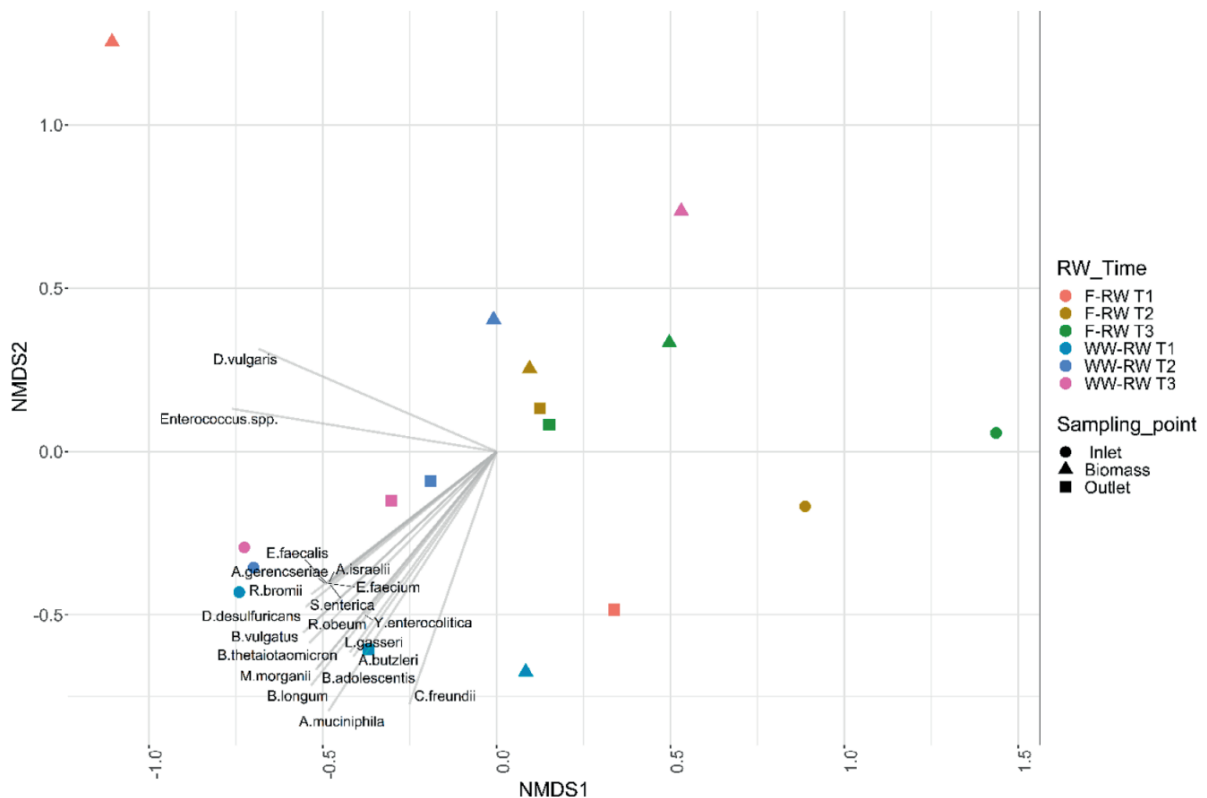


- a) Agenti patogeni emergenti nell'acqua potabile. *Aeromonas spp.* comprende le specie *A. enteropelogenes*, *A. hydrophila*, *A. punctata*, *A. media*; *Campylobacter spp.* comprende *C. coli*, *C. subantarcticus*, *C. lari*, *C. jejuni*; *Enterococcus spp.* comprende *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*; *Yersinia spp.* include *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*.
- b) Ceppi testati con conta su piastra al T3. Gli enterococchi sono stati testati come enterococchi intestinali.

Le specie batteriche, potenzialmente patogene, presenti in maggiore abbondanza sono stati: *Aeromonas spp.* (15 positivi) seguiti da *Desulfovibrio desulfuricans* e *Desulfovibrio vulgaris* (9 positivi per entrambi), *Arcobacter butzleri* (8 positivi) e *Clostridium freundii* (7 positivi).

*Aeromonas* è un genere noto per causare un'ampia gamma di infezioni e malattie gastrointestinali. *Desulfovibrio desulfuricans* e *Desulfovibrio vulgaris* sono considerati patogeni opportunistici ubiquitari implicati in una varietà di infezioni umane (Goldstein et al., 2003). *Arcobacter butzleri* è un patogeno opportunistica associato prevalentemente ad enteriti (Soelberg et al., 2020), mentre *Citrobacter freundii* è un importante patogeno umano emergente.

Altre specie risultate positive che comportano rischi significativi per la salute pubblica (EPA, 2021) sono: *Escherichia coli* enteroemorragico (con fattore di virulenza eae, 1 positivo), *Legionella pneumophila* (1 positivo), *Salmonella enterica* (1 positivo) e *Vibrio cholerae* (5 positivi), come riportato in Figura 10.



**Figura 10.** Analisi multivariata basata sul rilevamento semiquantitativo di specie batteriche enteriche e patogene e marcatori di virulenza con specie significative che guidano la distribuzione ( $p < 0,05$ )

Il conteggio delle specie batteriche patogene positive ha mostrato andamenti diversi all'interno dei due sistemi: l'F-RW ha mostrato una media di 1,5 target positivi in ingresso, 2,3 nella biomassa e 3,0 in uscita, mostrando quindi un aumento del 56% della presenza di specie patogene dall'ingresso alla biomassa, mentre del 100% dall'ingresso all'uscita del reattore, riconducibile, probabilmente, alla contaminazione esterna.

D'altra parte, il WW-RW ha mostrato un conteggio di 18 specie positive nelle acque in ingresso, 3 nella biomassa e 9 nelle acque in uscita, con una diminuzione dell'81% di presenza di specie patogene dall'ingresso alla biomassa e del 51% all'uscita del sistema. Pertanto, il sistema sperimentale RW ha dato dimostrazione di essere un efficace metodo di biotattamento delle acque reflue.

Degli agenti patogeni evidenziati come positivi dall'array qPCR al tempo T3, gli otto target più comuni sono stati selezionati per la coltivazione su piastra, al fine di verificare la vitalità di queste specie e il loro potenziale infettivo. Tre target (*Aeromonas spp.*, *C. freundii* e *Vibrio spp.*) non sono stati rilevati e sono stati classificati come negativi, mentre *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, coliformi fecali ed enterococchi intestinali sono stati rilevati nella forma vitale (Fig. 9).

Coliformi fecali, come il genere *Escherichia* (e i fattori di virulenza: eae, stx A, stx2A), erano presenti in tutti i campioni del WW-RW, tranne che in quelli della biomassa.

Le analisi NGS hanno permesso l'identificazione di generi batterici, quali *Aeromonas*, *Akkermansia*, *Arcobacter*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Escherichia*, *Shigella*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Ruminococcus*, *Streptococcus* e *Vibrio*, distinguibili anche attraverso l'array commerciale qPCR (presenza/assenza di 45 patogeni noti o microrganismi indicatori di contaminazione). Oltre a questi però, le analisi NGS hanno permesso il rilevamento di altri generi batterici che possono contenere specie patogene, quali *Elizabethkingia*, *Roseomonas*, *Chryseobacterium*, mettendo in evidenza ulteriori pericoli biologici che possono essere altrimenti sottovalutati.

Sebbene le tecniche NGS risultano non semplici e costose, forniscono una descrizione ad ampio raggio delle comunità presenti e permettono di comprendere le interazioni tra i membri della comunità. Naturalmente tanto più numerosi saranno i primer da poter impiegare, soprattutto per le microalghe, e tanto maggiore sarà la potenza di queste tecniche basate sulla PCR (Khaw et al., 2020).

## 7.2 Impianti su scala reale

Sono stati studiati due impianti su scala reale che operano con un sistema di produzione in reattori aperti, uno per la produzione alimentare di *Spirulina*, l'altro per il trattamento di acque reflue civili. Sono stati prodotti gli schemi di processo dell'impianto, opportunamente verificati con gli operatori e confrontati con lo stato dell'arte delle tecnologie individuate.

### *Impianto su scala reale per la produzione di Spirulina*

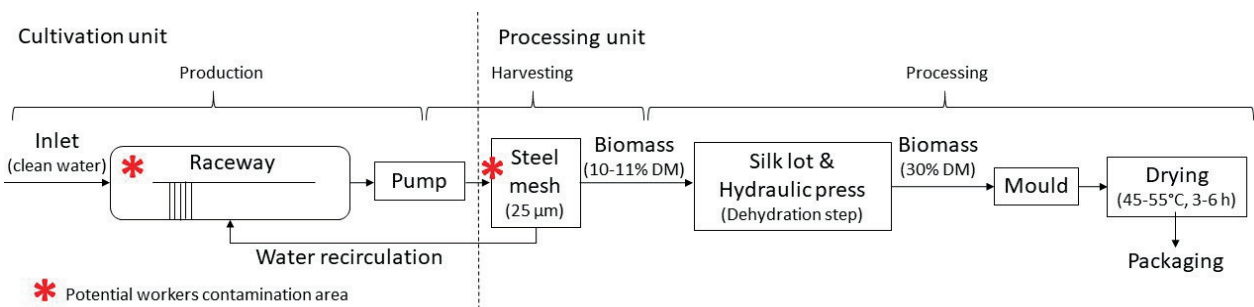
Nell'ambito del progetto, il primo impianto oggetto di campionamenti utilizza acqua dolce per la produzione della microalga *Spirulina*. Si tratta di un sito di produzione a fini alimentari installato in Italia. L'impianto è diviso in due siti distinti, di cui uno di coltivazione e l'altro di trasformazione. Il sito di coltivazione è situato sotto una serra di 5000 m<sup>2</sup>, dove sono presenti sei raceway (RWs) caratterizzati, ciascuno, da 100 m di lunghezza e 10 m di larghezza. La miscelazione della coltura è ottenuta da una ruota a pale, controllata da un inverter, che permette di regolare la velocità del flusso in base al livello di saturazione di ossigeno all'interno della coltura. Ogni RW è riscaldato da un sistema radiante sotto una copertura di plastica. L'energia per il riscaldamento deriva da un impianto di biogas presente nel sito stesso.

Ogni coppia di vasche è dotata di una pompa a girante flessibile per la fase di raccolta. Dopo la raccolta, la coltura viene indirizzata al sito di trasformazione. Qui la coltura proveniente dagli stagni viene setacciata da una rete d'acciaio di 25 µm, l'acqua viene

quindi ripompata allo stagno, mentre la biomassa, con sostanza secca (DM) pari al 10-11%, viene raccolta per la successiva fase di disidratazione. La biomassa è ulteriormente disidratata (fino al 30% DM) in una pressa idraulica, dotata di inverter che applica un gradiente di pressione e riduce al minimo le sollecitazioni meccaniche sulla biomassa. Si produce una pasta densa, modellata a forma di spaghetti che viene essiccata a 45-55 °C per 3-6 h.

L'acqua in ingresso consiste in acqua dolce additivata con una miscela di sali: bicarbonato di sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), nitrato di potassio ( $\text{KNO}_3$ ), pirofosfato di tetrapotassio ( $\text{K}_4\text{O}_7\text{P}_2$ ), solfato di potassio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ), solfato di magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) e ferro chelato (Fe-EDDHA) (6%), ad una concentrazione rispettivamente di 15, 2.5, 0.5, 0.5, 0.1 e 0.025 kg di sali  $\text{m}^{-3}$  di coltura, mentre, per la dose di ricarica, la concentrazione è rispettivamente di 5000, 800, 70, 40, 20 e 17 g di sale  $\text{kg}^{-1}$  di prodotto.

Sulla base dello schema del processo dell'impianto, sono stati identificati una serie di operazioni che possono comportare esposizione ad agenti biologici, come rappresentato nella Figura 11.



**Figura 11.** Schema semplificato del processo e operazioni a potenziale rischio espositivo ad agenti biologici

I campioni sono stati raccolti durante la fase di crescita (primavera), in piena produzione (estate e autunno). Sono stati raccolti più campioni da diverse fasi della produzione: ingresso (acqua e fertilizzante), biomassa, acque di recupero dal processo (riciclate in impianto), biomassa disidratata e prodotto finale.

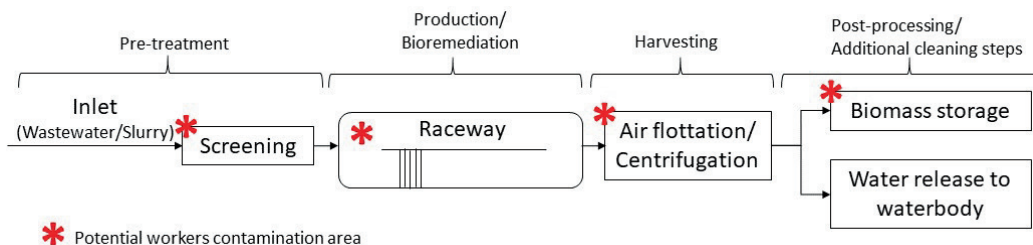
#### *Impianto per il trattamento di acque reflue urbane*

Il secondo impianto che tratta acque reflue urbane è situato in Spagna ed è costituito da due raceway (RWs). Il primo RW (RW1) ha una superficie di 10.000  $\text{m}^2$ , mentre il secondo (RW2) di 5.000  $\text{m}^2$  e sono entrambi agitati da un sistema di ruote a pale.

La biomassa algale deriva da un bloom spontaneo, senza utilizzo di inoculo. Il processo di crescita è condotto a una velocità di diluizione di 0,20,25  $\text{d}^{-1}$ , con una concentrazione di biomassa nel pond, nell'intervallo compreso tra 0,26 e 0,44 g/L.



La biomassa viene raccolta mediante flottazione con aria disciolta, mentre la separazione della biomassa si basa su flottazione/sedimentazione e la disidratazione dei fanghi viene ottenuta mediante centrifugazione, come mostrato nello schema di processo in Figura 12.



**Figura 12.** Schema semplificato del processo e operazioni a potenziale rischio espositivo ad agenti biologici

Ad ogni campionamento sono stati registrati i parametri chimici e ambientali. I campioni sono stati raccolti in tre tempi diversi: durante la primavera, l'estate e l'autunno 2021 e in tre diversi punti di ciascun sistema: inlet, biomassa e outlet. La biomassa è stata raccolta mediante centrifugazione della coltura e l'acqua rimanente dopo la centrifugazione costituiva l'outlet.

Le analisi molecolari sono state condotte secondo lo schema già adottato per la scala dimostrativa (impiego array commerciale e conta su piastra), mentre le analisi di NGS sono state sostituite da un'analisi di sequenziamento shotgun.

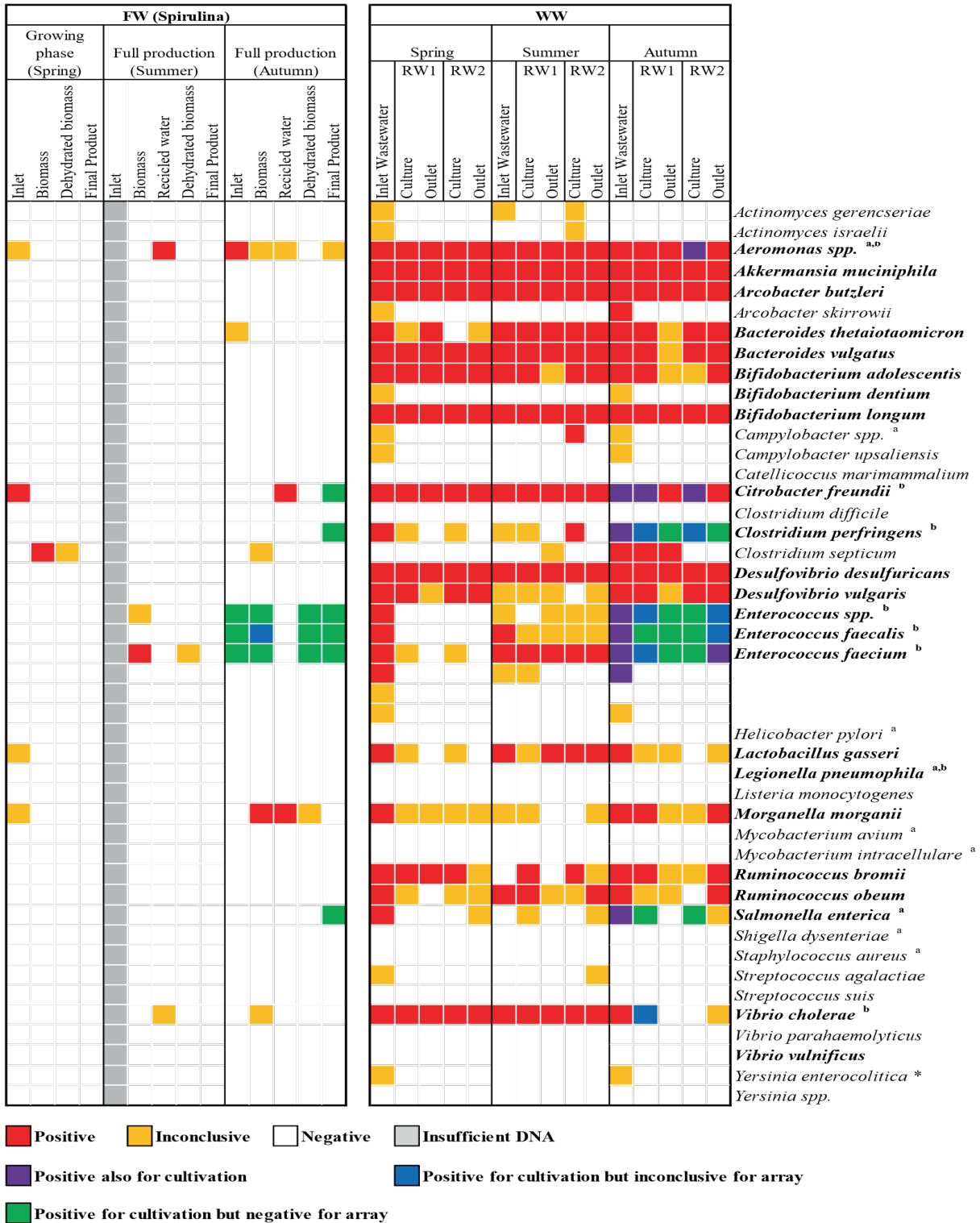
### Risultati

Per quanto riguarda il reattore per la coltivazione di *Spirulina*, i risultati dell'array commerciale rilevano un limitato numero di specie batteriche enteriche, specie potenzialmente patogene e marcatori di virulenza (Figura 13). Nello specifico, nell'impianto di coltivazione di *Spirulina* (FW) tra gli agenti che possono presentare rischi significativi per la salute umana sono stati rilevati (FW) *Aeromonas spp.* (2 positivi), *Citrobacter freundii* (2 positivi), *Clostridium septicum* (1 positivo), *Enterococcus faecium* (1 positivo) e *Morganella morganii* (2 positivi).

Al contrario, come atteso, l'impianto alimentato con acque reflue (WW), ha mostrato un elevato numero di target positivi. Tra le specie che possono presentare rischi significativi per la salute dell'uomo sono stati rilevati: *Aeromonas spp.*, presente in tutti i campioni analizzati (15 positivi), seguito da *Vibrio cholerae* (11 positivi), *Escherichia coli* (2 positivi), *Salmonella enterica* (2 positivi) e *Campylobacter spp.* (1 positivo). In questo impianto sono state rilevate, in alta abbondanza, le specie: *Akkermansia muciniphila*, *Arcobacter butzleri*, *Bifidobacterium longum*, *Citrobacter freundii* e *Desulfovibrio desulfuricans* (15 positivi) seguiti da *Bacteroides vulgatus* (14 positivi),

*Bifidobacterium adolescentis* (12 positivi), *Bacteroides thetaiotaomicron* (11 positivi) e altri ceppi presenti in abbondanze inferiori.

Marcatori di virulenza: eae<sup>a</sup>; stx2A<sup>a</sup>; stxA<sup>a</sup>



**Figura 13.** Specie batteriche enteriche, potenzialmente patogene e marcatori di virulenza rilevati negli impianti full scale. Gli indicatori positivi, in almeno un campione, sono indicati in grassetto

## Nota

- a) Agenti patogeni emergenti nelle acque potabili.
- b) Ceppi testati con conta su piastra al tempo T3. Gli enterococchi sono stati testati come enterococchi intestinali. *Aeromonas spp.* comprende le specie *A. enteropelogenes*, *A. hydrophila*, *A. punctata*, *A. media*. *Campylobacter spp.* comprende le specie *C. coli*, *C. subantarcticus*, *C. lari*, *C. jejuni*. *Enterococcus spp.* comprende le specie *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*. *Yersinia spp.* include *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*.

In sintesi, l'impianto per la coltivazione di *Spirulina* presenta un limitato numero di specie batteriche, mentre l'impianto alimentato con acque reflue civili ha mostrato una elevata carica di microrganismi potenzialmente patogeni, sia nell'effluente in ingresso, come atteso trattandosi di acque reflue, che nei prodotti finali, pur con un evidente abbattimento delle cariche. Il trattamento depurativo con microalghe permette una buona riduzione della carica microbica del refluo, come dimostrano le analisi condotte sull'effluente in uscita dall'impianto. Tali osservazioni concordano con altre evidenze sperimentali che dimostrano che il trattamento di reflui secondari con microalghe è una efficace alternativa ai trattamenti di depurazione delle acque reflue convenzionali, ma più ecologico, sostenibile e meno costoso (Delanka-Pedige et al., 2020).

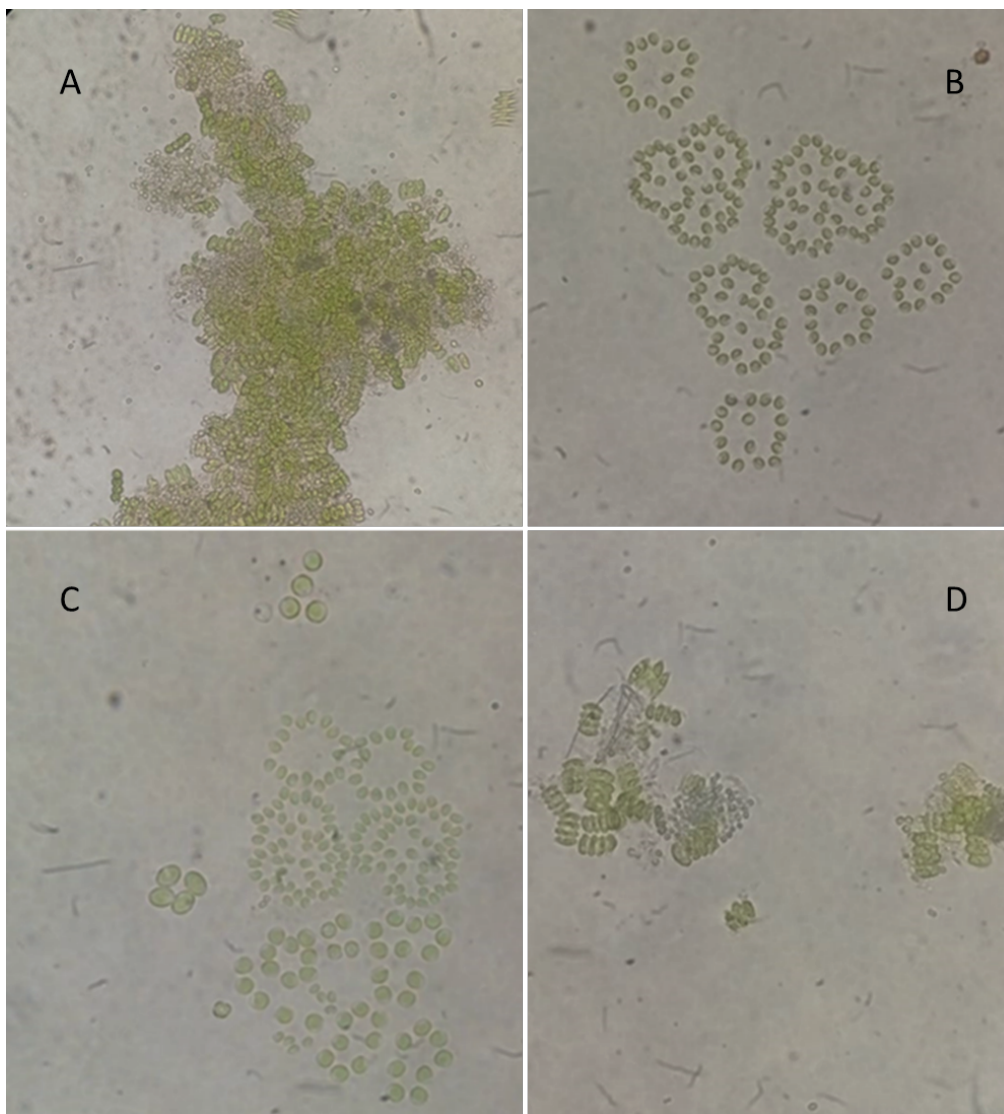
I sistemi algali hanno una capacità di inattivare batteri e virus nelle acque reflue municipali. Rispetto ai classici sistemi di trattamento delle acque reflue algali fototrofiche, il sistema mixotrofico può fornire un'inattivazione simile o migliore, ma con tempi di permanenza idraulica più brevi. Esso offre una maggiore rimozione logaritmica di indicatori batterici e virali rispetto ai sistemi a fanghi attivi. Una maggiore inattivazione di batteri e virus nel sistema di trattamento delle acque reflue mixotrofiche si traduce in una minore richiesta di disinfezione e riduce quindi al minimo il potenziale di formazione di sottoprodotti della disinfezione, notoriamente tossici (Delanka-Pedige et al., 2020).

Tuttavia, come risulta dalle evidenze sperimentali del progetto, la biomassa prodotta a partire dalle acque reflue è caratterizzata da un carico microbico maggiore rispetto a quando coltivata impiegando solo fertilizzante, quindi è compatibile solo con usi non alimentari, come la produzione di biofertilizzanti, biostimolanti per uso agricolo o altri usi che riducano al minimo qualsiasi rischio per la salute pubblica.

### 7.2.1 Studio della citotossicità delle microalghe coltivate nei RW oggetto dello studio

Molte specie di microalghe possono essere potenzialmente tossiche, in quanto capaci di produrre cianotossine, metaboliti che possono avere effetti di diverso tipo sulla salute umana (Buratti et al., 2017; Manganelli et al., 2012; Manganelli et al., 2023; Testai et al., 2016).

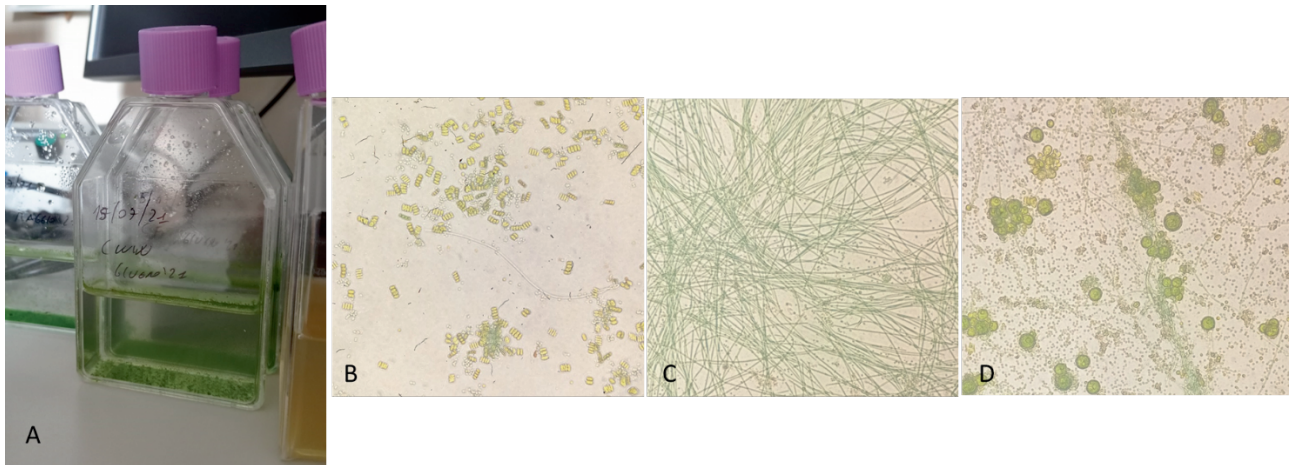
I campioni provenienti dai RW oggetto della sperimentazione sono stati analizzati al microscopio ottico invertito (Olympus IX50) al fine di poter effettuare un'analisi morfologica delle microalghe e dei cianobatteri presenti. Le specie riscontrate sono riportate nella Figura 14.



**Figura 14.** Analisi dei campioni al microscopio: Coltura microalgale mista (A), *Snowella* sp. (B), *Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp. (C) e *Scenedesmus* sp. (D)

L'analisi microscopica è stata ripetuta dopo la messa in coltura dei campioni in un terreno universale (Blue Green Medium), che viene normalmente utilizzato per la crescita, l'isolamento ed il mantenimento dei cianobatteri (Allen e Stanier, 1968).

I ceppi rilevati e osservati al microscopio dopo la coltivazione sono riportati nella Figura 15.



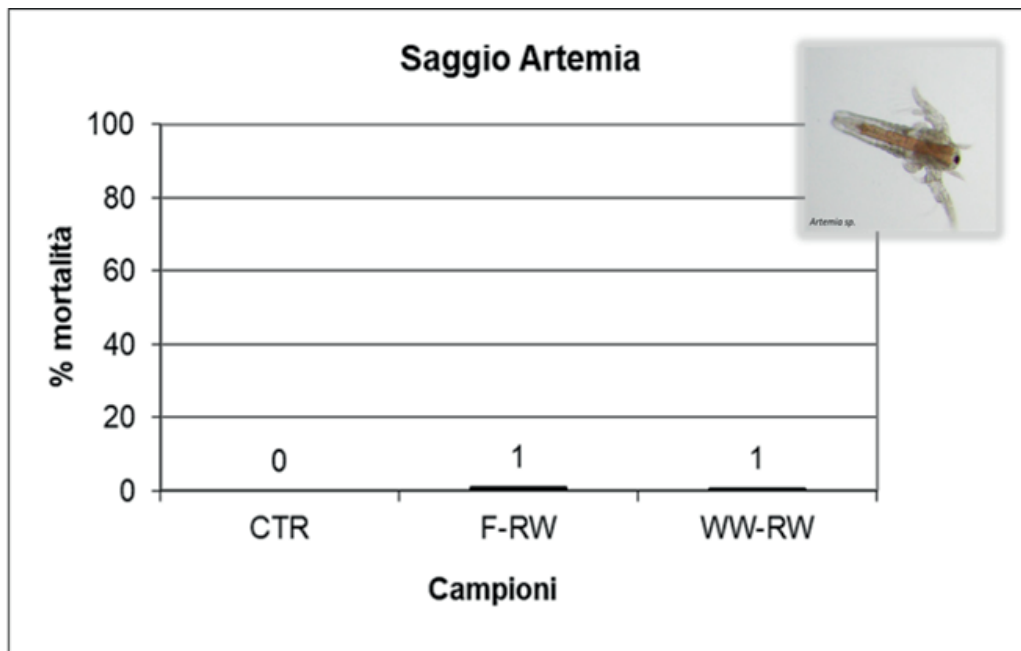
**Figura 15.** Cultura in laboratorio (A), *Scenedesmus sp.* (B), *Limnothrix sp.* (C) e *Chlorella sp.* (D)

Oltre ai ceppi di *Scenedesmus sp.* (B) e *Chlorella sp.* (D), già riscontrati nella prima analisi preliminare, è stata rilevata la presenza del cianobatterio *Limnothrix sp.* (C). *Limnothrix sp.* è un cianobatterio filamentoso, ampiamente presente in tutto il mondo, che forma comunemente fioriture (Humpage et al., 2012; Yang, et al., 2020). Può dominare la comunità cianobatterica in laghi eutrofici poco profondi, spesso insieme ad altre forme filamentose. Inoltre, alcuni ceppi di *Limnothrix sp.* sono stati identificati come tossici (Daniels et al., 2014; Rose et al., 2018).

#### *Saggio biologico di tossicità algale in vivo*

Al fine di valutare la tossicità in vivo delle specie di microalghe presenti nei RW oggetto della sperimentazione, è stato utilizzato il metodo di riferimento che utilizza il ceppo del crostaceo anostraco *Artemia salina* (APAT IRSA-CNR). Il test si basa sulla capacità di composti bioattivi di essere letali per i microcrostacei nel loro stadio larvale (naupli).

Per il test di tossicità acuta dei campioni di microalghe è stato utilizzato il kit ARTOXKIT M, Ecotest, ed è stata determinata la LC50 (Lethal Concentration) a 24 ore. I campioni analizzati hanno mostrato uno scarso effetto di mortalità nei confronti delle artemie (inferiore al 20%), come riportato nella Figura 16.



**Figura 16.** Percentuale di mortalità relativa ai campioni analizzati (CTR: controllo; F-RW: raceway alimentato con acque e fertilizzante; WW-RW: raceway alimentato con acque reflue). Nel riquadro in alto a dx *Artemia sp.*

#### *Saggio di citotossicità algale in vitro*

I test di citotossicità in vitro rappresentano un metodo di valutazione dei danni biologici provocati dalle sostanze alle cellule, come ad esempio la riduzione del tasso di proliferazione cellulare o il rilascio di enzimi o proteine da parte delle cellule stesse. Per testare la citotossicità delle microalghe coltivate nei RW analizzati, sono stati effettuati due differenti test: il saggio del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Bossù et al., 2021) ed il saggio della lattico deidrogenasi (LDH) (Priti et al., 2018). Il saggio MTT è stato eseguito secondo il metodo di Mossmann T (1983). Questo saggio colorimetrico consente di misurare l'attività metabolica delle cellule, che è un indicatore della proliferazione e della vitalità cellulare e della citotossicità. Nello specifico viene utilizzato per misurare l'attività degli enzimi che riducono l'MTT a formazano, conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo. Ciò accade prevalentemente nei mitocondri; può essere utilizzato per determinare la citotossicità di farmaci o altri tipi di sostanze chimicamente attive e potenzialmente tossiche. L'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, è attivo infatti soltanto nelle cellule vive, e la sua funzione consiste nel tagliare l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo) con la formazione, di conseguenza, di formazano (un sale blu). Tale reazione è valutata e misurata mediante la lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 570 nm.

Il saggio LDH (Lattico deidrogenasi) è stato eseguito utilizzando il Cytotoxicity Detection Kit plus (Roche Diagnostics GmbH, Germany) e seguendo il protocollo della

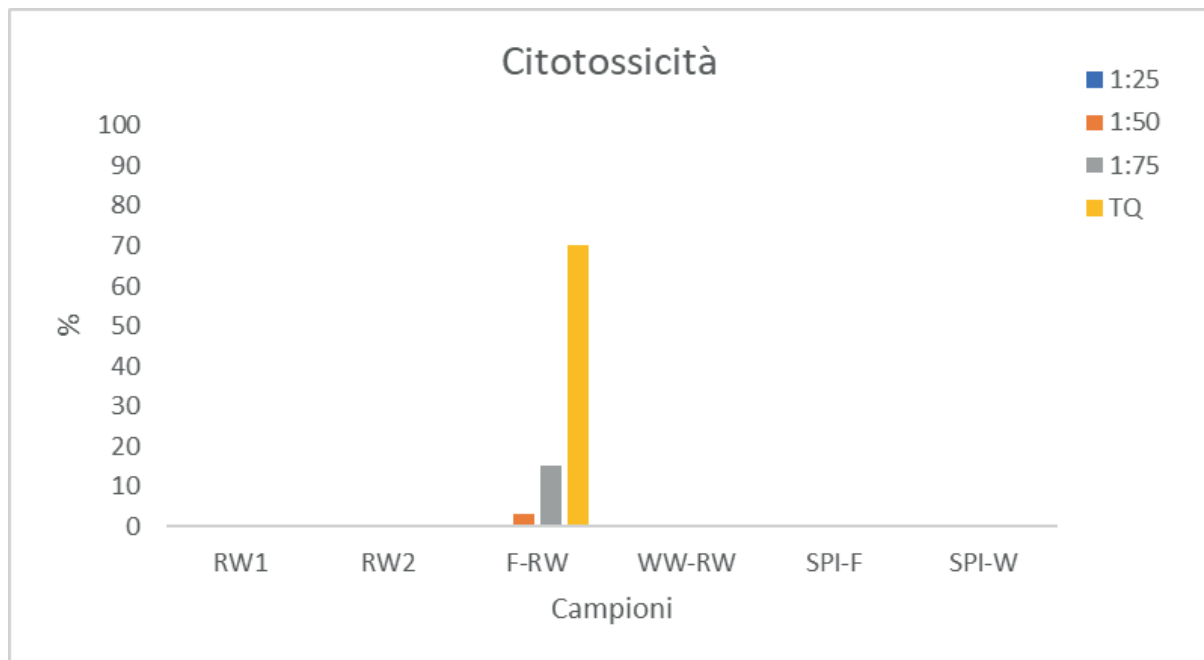
ditta fornitrice. Questo saggio colorimetrico consente di valutare gli effetti citotossici di alcune sostanze sulle cellule, misurando l'attività dell'enzima LDH rilasciato dalle cellule danneggiate, che pertanto viene utilizzato come indicatore di danno cellulare o tissutale. L'enzima LDH si trova nel citoplasma della maggior parte delle cellule dell'organismo, catalizza la conversione del lattato in acido piruvico, riducendo il NAD<sup>+</sup> in NADH, che riduce a sua volta il tetrazolio in formazano; quest'ultimo determina lo sviluppo di una colorazione rosso-arancio, la cui intensità è direttamente proporzionale alla quantità di LDH rilasciato dalle cellule danneggiate. Dunque maggiore è la quantità di enzima LDH rilasciato dal citoplasma della cellula, maggiore è la quantità di formazano presente e maggiore sarà il danno cellulare.

Gli esperimenti sono stati condotti su due differenti linee cellulari umane, selezionate sulla base della potenziale esposizione lavorativa alle microalghe attraverso la via cutanea (cheratinociti) e/o inalatoria (cellule epiteliali alveolari):

- HaCaT: linea cellulare immortalizzata di cheratinociti, ampiamente utilizzate nella ricerca scientifica per la loro elevata capacità di differenziarsi e proliferare in vitro (Schoop et al., 1999).
- A549: linea cellulare epiteliale alveolare umana adenocarcinomica (Foster et al., 1998).

Per le due linee cellulari utilizzate per le prove sperimentali, i risultati ottenuti dai saggi svolti con MTT, hanno mostrato una forte variabilità sia tra i diversi campioni che tra le singole repliche sperimentali, e questo ha reso impossibile effettuare dei test significativi, anche da un punto di vista statistico. Mentre in relazione ai test svolti con il metodo LDH, la citotossicità è stata valutata a diverse concentrazioni (1:25; 1:50; 1:75; TQ) per esposizioni a 2,4,6 ore.

Gli esperimenti condotti con la linea cellulare HaCaT non hanno presentato nessun risultato rilevante. Per quel che riguarda gli esperimenti condotti della linea cellulare A549, relativamente ai campioni analizzati (RW1: raceway Bioreattore 1; RW2: raceway Bioreattore 2; F-RW: raceway alimentato con acque e fertilizzante; SPI-F: impianto di Spirulina alimentata da acqua e fertilizzante; SPI-W: impianto di Spirulina alimentata con acqua), l'unico campione nel quale è stato evidenziato un effetto potenzialmente citotossico è relativo al F-RW (Figura 17). Infatti il test con LDH ha mostrato che, al di sotto della concentrazione di 1:50 dopo 6h di esposizione, non c'è nessun effetto citotossico, mentre per concentrazioni superiori la citotossicità sembra aumentare proporzionalmente all'aumentare della concentrazione. Questo effetto potrebbe essere correlato ad un aumento della pressione osmotica in relazione alla composizione della miscela sintetica (fertilizzante), contenente sali, utilizzata per la crescita delle microalghe. Tale ipotesi deriva da esperimenti indipendenti con terreni contenenti le stesse tipologie di sali (dati non mostrati).



**Figura 17.** Saggio LDH. Percentuale di rilascio di LDH da parte delle cellule A549 trattate con concentrazioni crescenti di campione per 6 ore (RW1: raceway Bioreattore 1; RW2: raceway Bioreattore 2; F-RW: raceway alimentato con acque e fertilizzante; SPI-F: impianto di Spirulina alimentata da acqua e fertilizzante; SPI-W: impianto di Spirulina alimentata con acqua di fonte)

In conclusione, dall'analisi dei risultati di tossicità in vivo ed in vitro ottenuti, nei RW oggetto di studio, non si osservano effetti citotossici da parte delle cellule microalgali coltivate.



## 8. Il controllo del biohazard negli impianti di coltivazione delle microalghe

Come emerge dal censimento effettuato nell'ambito del progetto, la possibile presenza di biohazard durante l'esercizio degli impianti di microalghe è individuata e/o percepita dai gestori quale importante pericolo per la salute umana. Anche le prove sperimentali condotte hanno evidenziato l'effettiva presenza di generi microbici potenzialmente patogeni, riconducibile al fatto che le vasche di coltivazione delle microalghe sono spesso allestite all'aperto e, quindi soggette a contaminazioni dall'ambiente esterno, così come nel caso in cui negli impianti si impieghino reflui primari o secondari. Inoltre, la tendenza ad una maggiore ricchezza e diversità nei campioni in ingresso negli impianti dimostrativi studiati che trattano acque reflue, indica la presenza di una maggiore varietà di generi e specie batteriche da tenere in considerazione per la valutazione del rischio biologico occupazionale durante le operazioni di gestione delle acque in ingresso agli impianti.

Secondo i principi della Direttiva 2000/54/CE (European Union, 2020), il primo step della valutazione del rischio biologico è l'identificazione del pericolo, ossia la presenza della fonte di potenziale danno. Il rischio dipende dalla interazione tra la fonte di pericolo ed il lavoratore, ossia la probabilità che nella interazione uomo-fonte di pericolo si possa verificare una condizione incidentale che provoca un danno e l'entità del danno stesso.

Analizzare le condizioni di rischio significa tener conto di tutti quegli elementi, di tipo tecnico, organizzativo, procedurale, comportamentale, che concorrono a delineare le possibili interazioni tra la fonte di pericolo e il lavoratore. Seguendo un approccio qualitativo o semiquantitativo, è il giudizio dell'esperto che permette di valutare la probabilità della condizione incidentale e la gravità del danno, con una scala delle probabilità da bassissima ad elevata ed una scala della gravità del danno da trascurabile a notevole.

Le vie di esposizione agli agenti biologici durante le attività lavorative negli impianti di coltivazione delle microalghe oggetto dello studio includono:

- la via inalatoria attraverso polveri, particelle liquide o altro particolato, contenenti microrganismi e/o loro parti e prodotti (bioaerosol);
- la via orale attraverso mani, indumenti, strumenti, prodotti alimentari contaminati;
- la via cutanea e mucosa attraverso lesioni della pelle o attraverso schizzi di materiale infetto nelle mucose di naso/occhi/bocca;
- la penetrazione nei tessuti profondi nel caso di lesioni dovute, ad esempio, a ferite da taglio con dispositivi contaminati.

I livelli di esposizione dei lavoratori agli agenti biologici dipendono fortemente dalle attività svolte nell'impianto, dalle frequenze espositive, dalle misure di prevenzione e protezione adottate durante il ciclo produttivo e dal livello di informazione, formazione e addestramento dei lavoratori.

Gli effetti dell'esposizione a agenti biologici possono essere distinti in infettivi, sensibilizzanti e tossici. Mentre nel caso degli effetti infettivi predomina l'assunzione attraverso la via orale, per gli effetti sensibilizzanti e tossici la principale via espositiva è quella inalatoria.

Nell'impianto di coltivazione di *Spirulina*, le operazioni a potenziale rischio espositivo risultano essere:

- preparazione del mezzo di coltura. In questa fase l'operatore manipola acqua e fertilizzanti. Qualora l'acqua sia ricircolata (recuperata dopo la raccolta della biomassa), l'operatore entra in contatto con materiale biologico (microrganismi e microalghe);
- monitoraggio dei raceway attraverso il campionamento delle colture. In questa fase l'operatore preleva del materiale dalle vasche in produzione, per controllare i parametri di vitalità e crescita delle microalghe;
- setacciatura della biomassa. In questa fase è possibile la formazione di bioaerosol, presumibilmente in quantità molto piccole.
- raccolta della biomassa dopo filtrazione. In questa fase l'operatore sorveglia il processo e interviene manualmente per agevolare le operazioni in caso di eventuali malfunzionamenti;
- essiccaamento della biomassa. La biomassa raccolta viene lavorata a formare spaghetti e posta in termostato a 40°C. In questa fase, l'operatore entra in contatto con biomassa algale sia fresca che secca, con possibili problematiche relative ad eventuali intolleranze/allergie.

Nelle Figure 18, 19 e 20 sono riportate alcune delle operazioni sopraindicate.



**Figura 18.** Fase di campionamento per il monitoraggio dei parametri del raceway



**Figura 19.** Fase di raccolta della biomassa algale



**Figura 20.** Fase di pressatura della biomassa

Dall'esame delle operazioni eseguite, i lavoratori risultano esposti prevalentemente attraverso la via cutanea, specie se in presenza di lesioni della pelle, o attraverso schizzi di materiale infetto nelle mucose di naso/occhi/bocca, durante le attività di campionamento, raccolta e pressatura della biomassa algale. Nel corso delle operazioni di setacciatura della biomassa l'esposizione prevalente è quella inalatoria. Nello specifico, tra gli agenti che possono presentare rischi per la salute umana sono stati rilevati *Aeromonas spp.*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium septicum*, *Enterococcus*

*faecium* e *Morganella morganii*, presenti in basse concentrazioni. Non è stata altresì evidenziata la presenza di ceppi algali, autoselezionatesi nell'impianto, potenzialmente tossici.

Andando a considerare la probabilità di esposizione e la gravità del danno, è possibile stabilire una bassa probabilità espositiva dei lavoratori, in ragione delle quantità di materiale biologico manipolate, con una bassa gravità del danno. In base all'Allegato III della Direttiva 2000/54/CE (European Union, 2020) i microrganismi rilevati appartengono al gruppo di rischio 2, ossia a bassa patogenicità, da considerare patogeni opportunisti, ossia in grado di dare luogo ad infezioni, sempre che esista la giusta concorrenza tra carica microbica, via espositiva efficace e condizioni predisponenti dell'individuo esposto.

Nell'impianto che tratta acque reflue urbane, tra gli agenti che possono presentare rischi per la salute sono stati rilevati: *Aeromonas spp.*, presente in tutti i campioni analizzati (15 positivi), seguito da *Vibrio cholerae* (11 positivi), *Escherichia coli* (2 positivi), *Salmonella enterica* (2 positivi) e *Campylobacter spp.*

Le principali operazioni a potenziale rischio espositivo risultano essere:

- le lavorazioni sulla linea di ingresso delle acque reflue;
- la fase di monitoraggio dei raceway durante le operazioni di gestione sonde, campionamento, ispezione visuale etc.;
- la fase di raccolta e stoccaggio della biomassa: il materiale, dopo il passaggio nel DAF (Dissolved Air Flottation), viene scaricato su platea (raccolta discontinua in batch) e caricato con un mezzo (pala gommata) per il trasporto alla sezione di stoccaggio.

In funzione delle operazioni, le vie espositive identificate sono: la via orale attraverso le mani, indumenti, strumenti contaminati, la via cutanea e quella inalatoria. Per attività che coinvolgono matrici che contengono agenti biologici, il rilascio degli stessi nell'aria respirabile ed una maggiore esposizione del lavoratore è prevedibile, a meno che tale rilascio non possa venire escluso a priori (BAUA, 2018). La formazione di bioaerosol avviene durante le operazioni di pretrattamento delle acque reflue in ingresso, per esempio durante il processo di vagliatura delle acque o per l'azione meccanica di organi in movimento, nell'ambito di vortici e salti di livello dei reflui, nelle fasi di pompaggio, in tutti i casi di formazione di spruzzi e durante le fasi di raccolta della biomassa. Anche le attività di pulizia sono riconosciute ad alta potenzialità espositiva, così come le operazioni di manutenzione di pompe, essiccatori e nastri trasportatori, che richiedono l'apertura di apparecchiature con conseguente maggiore esposizione del personale a bioaerosol.

Andando a considerare la probabilità di esposizione e la gravità del danno, è possibile stabilire una medio/alta probabilità espositiva dei lavoratori, in ragione delle quantità di materiale biologico manipolate e della maggiore presenza di operazioni a rischio espositivo rispetto all'impianto di produzione di Spirulina, con una bassa gravità del danno (in relazione alla classe di rischio dei microrganismi rilevati).

Le principali misure di prevenzione e protezione per interrompere le vie espositive identificate, consistono in:

- riduzione dei tempi di permanenza degli operatori nelle vicinanze delle vasche, se non per le operazioni strettamente necessarie di manutenzione, gestione e controllo;
- adozione di procedure automatizzate per le fasi che attualmente prevedono l'intervento di operatori;
- adozione di dispositivi di protezione individuali (DPI) (guanti, occhiali protettivi, visiera, tuta resistente all'acqua) o dispositivi per la protezione delle vie aeree (RPE) da parte del personale in funzione della mansione svolta e del rischio specifico identificato per area ed attività svolta;
- adozione di buone pratiche igieniche, divieto di mangiare, bere e fumare nei luoghi in cui sono svolte le lavorazioni, e la fornitura da parte del datore di lavoro di adeguate strutture assistenziali (acqua pulita, sapone, spazzole per unghie, asciugamani di carta usa e getta e attrezzature di pronto soccorso per la pulizia delle ferite);
- attività di informazione, formazione sui rischi specifici ed addestramento nell'impiego delle attrezzature di impianto;
- adeguata sorveglianza sanitaria dei lavoratori per garantire che eventuali esiti sanitari correlati all'esposizione agli agenti biologici siano segnalati. Alcune sintomatologie da agenti biologici possono essere poco specifiche ed è estremamente importante che il medico competente effettui un'adeguata sorveglianza dei sintomi anche lievi, quali crampi allo stomaco, diarrea, vomito, sintomi di dispnea, arrossamento e dolore agli occhi, eruzione cutanea.

## 9. Strumento di calcolo per la valutazione degli impatti ambientali degli impianti di microalghe

Quale ultimo obiettivo del progetto Bric è stato elaborato uno strumento semplificato per il calcolo degli impatti ambientali degli impianti di microalghe. Il tool fonda sulla raccolta di parametri che misurano bilanci di massa e di energia di un impianto di produzione di microalghe in sistemi open ponds e, pur non sostituendo in alcun modo un'analisi del ciclo di vita (LCA - Life Cycle Assessment) del processo, ha l'obiettivo di fornire un primo screening degli impatti ambientali, considerando i main driver di impatto nella produzione di microalghe ed i layout di impianto più comuni.

Le informazioni in input allo strumento di calcolo comprendono:

- dati di produzione (dimensione dell'impianto, produzione di biomassa e contenuto di azoto nella biomassa);
- dati di beni consumabili comprendenti energia assorbita e agenti chimici (fertilizzanti azotato, nitrico e fosforico, bicarbonato di sodio ecc) impiegati per la conduzione dell'impianto;
- dati relativi al layout dell'impianto (profondità del medium nelle vasche) e alla conduzione dello stesso (concentrazioni medie di N e P nel refluo).

Il tool permette di calcolare impronta carbonica, acidificazione e potenziale di eutrofizzazione. Il foglio di calcolo è stato applicato ai casi-studio illustrati nel capitolo 7. A tal fine sono stati raccolti i dati di inventario dei 2 impianti full scale oggetto dello studio (impianto di produzione di Spirulina-impianto 1 e impianto di depurazione acque reflue-impianto 2), tra loro molto diversi per finalità, al fine di identificare i principali processi che contribuiscono all'impatto ambientale di cui sono responsabili. In Tabella 5 sono indicati i principali parametri studiati.

**Tabella 5.** Inventario dei principali input nei due impianti di coltivazione di microalghe

Parametro	Unità di misura	Impianto 1 (0.7 ha)	Impianto 2 (2 ha)
Produttività	ton/y	15	210
Trattamento reflui	m <sup>3</sup> /y	0	205000
Consumo di acqua	m <sup>3</sup> /y	8000	0
Elettricità consumata	kwh/y	38000	49052
Impiego di flocculanti	kg/y	0	1033
Superficie occupata	m <sup>2</sup>	7.740	20.000
Fertilizzante azotato (come N equivalenti)	Kg/anno	2000	
Fertilizzante base P (come P equivalenti)	Kg/anno	180	
Altri fertilizzanti (microelementi)		30	
Altri chemicals	kg/anno	60.000	0
Emissioni in corpo idrico			
COD	ton/y	0	14.6
N	ton/y	0	1.17
P	ton/y	0	0.29
Emissioni nel comparto aria			
Acqua evaporata	m <sup>3</sup> /y	1000	28000
Ammoniaca	ton/y	0	2.69
Protossido di azoto	kg/y	0.6-1	50
Metano	kg/anno	0.6	1

Per quanto riguarda gli impatti relativi alla costruzione della struttura degli impianti, è stata calcolata una media per ettaro di superficie sulla base dei dati di diverse strutture di impianto del tipo open raceway.

I consumi medi elaborati per un ettaro di superficie sono riportati nella Tabella 6.

**Tabella 6.** Inventario medio per un ettaro di superficie per la costruzione della struttura di un impianto di microalghe di tipo raceway

<b>Materiale</b>	<b>Unità di misura</b>	<b>Valore</b>
<b>Cemento</b>	ton/ha	127
<b>Acciaio</b>	ton/ha	1.4
<b>PVC</b>	ton/ha	4
<b>Gasolio</b>	l/ha	502

Per tutti gli input viene calcolata una distanza più probabile di approvvigionamento e smaltimento (fine vita della struttura e smaltimento dei rifiuti), in modo da poter stimare il calcolo complessivo degli impatti, considerando alcune voci aggregate. I processi che contribuiscono maggiormente a tutte le categorie di impatto sono risultati: consumo di elettricità, consumo di fertilizzanti di sintesi, consumo di bicarbonato di sodio (per la coltivazione di Spirulina) ed emissioni dirette.



## 10. Conclusioni del progetto

Le bioraffinerie da microalghe rappresentano una promettente area di ricerca e sviluppo nel settore delle energie rinnovabili e della produzione di biocarburanti e biomateriali. Le microalghe svolgono un ruolo chiave nell'economia circolare per il riutilizzo e il riciclo delle risorse naturali. Possono essere utilizzate per rimuovere microrganismi e inquinanti ambientali, come metalli pesanti, dai corpi d'acqua, contribuendo così al biorisanamento ambientale ed al riciclo delle acque. Le microalghe possono essere coltivate in modo sostenibile utilizzando acqua e sostanze nutritive recuperate dai rifiuti agroindustriali, riducendone l'impatto ambientale e valorizzandoli come fonte di biomassa. La biomassa delle microalghe può essere trasformata in diversi prodotti, quali fertilizzanti organici, mangimi, cosmetici e biocarburanti. Inoltre, le microalghe contribuiscono alla mitigazione dei cambiamenti climatici, poiché assorbono anidride carbonica durante la fotosintesi e producono ossigeno. Esse rappresentano quindi una risorsa preziosa per l'innovazione e la sostenibilità in diversi settori produttivi. La tecnologia per la coltivazione di microalghe è in costante sviluppo. Ciò include miglioramenti nella genetica delle alghe, nelle tecniche di coltivazione, nel controllo delle condizioni ambientali e nell'ottimizzazione dei fotobioreattori per aumentare la produzione di biomassa. Allo stato attuale anche i processi di estrazione dalle microalghe degli oli e di composti di interesse commerciale sono in fase di ottimizzazione allo scopo di aumentarne efficienza e resa. Il progetto Inail Bric ID 53 "Monitoraggio e valutazione degli impatti di bioraffinerie microalgali", ha avuto l'obiettivo primario di fornire un quadro dei sistemi di coltivazione delle microalghe e dei relativi impatti ambientali ed occupazionali, con particolare riguardo alla identificazione e gestione del biohazard. A tal fine il progetto ha previsto l'allestimento di due sistemi di coltivazione microalgale su scala dimostrativa e lo studio di due impianti full scale.

## Bibliografia

Abd-Elmaksoud S, Abdo SM, Gad M, Hu A, El-Liethy MA, Rizk N, Marouf MA, Hamza IA, Doma HS (2021). Pathogens removal in a sustainable and economic high-rate algal pond wastewater treatment system. *Sustainability* 13:13232.

Abu Hajar HA, Riefler RG, Stuart BJ (2017). Cultivation of *Scenedesmus dimorphus* using anaerobic digestate as a nutrient medium. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 40 (8):1197–1207.

Acién FG, Fernández JM, Magán JJ, Molina E (2012). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances* 30:1344 –1353

Ahmad A, Baht AH, Buang A (2017). Photobioreactor engineering for integrated algal biofuel production, carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) mitigation, and wastewater treatment. In *Photobioreactors: Advancements, Applications and Research*. Y.F. Tsang Ed. Chapter 4. ISBN: 978-1-53612-354-8.

Alías CB, García-Malea López MC, Acién Fernández FG, Fernández Sevilla JM, García Sánchez JL, Molina Grima E, Brindley C, Garcia-Malea MC, Acién FG, Fernández JM, García JL, Molina E (2004). Influence of Power Supply in the Feasibility of *Phaeodactylum tricornutum* coltures. *Biotechnology & Bioengineering* 87: 723–733.

Allen MM and Stanier RY (1968). Growth and Division of Some Unicellular Blue-green Algae. *Journal of General Microbiology* 51(2): 199–202.

Amicarelli V, Paiano A, Lobefaro L (2012). Le microalghe nel settore dei biocombustibili. Sviluppo e sostenibilità. *EAI Energia, Ambiente e Innovazione* 2: 69-77.

Ampofo J, Abbey L (2022). Microalgae: Bioactive Composition, Health Benefits, Safety and Prospects as Potential High-Value Ingredients for the Functional Food Industry. *Foods* 11(12): 1744.

APAT – IRSA/CNR (2003). Metodi analitici per le acque. Manuali e linee guida. 29/2003. APAT, 2003. ISBN: 88-448-0083-7.

Araújo R, Vázquez Calderón F, Sánchez López J, Azevedo IC, Bruhn A, Fluch S, Garcia Tasende M, Ghaderiardakani F, Ilmjärv T, Laurans M, Mac Monagail M, Mangini S, Peteiro C, Rebours C, Stefansson T, Ullmann J (2021). Current Status of the Algae

Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy. *Frontiers in Marine Science* 7: 1–24.

Archanaa S, Moise S, Suraishkumar GK (2012). Chlorophyll interference in microalgal lipid quantification through the Bligh and Dyer method. *Biomass Bioenergy* 46: 805–808.

Aresta M, Dibenedetto A, Carone M, Colonna T, Fragale C (2005). Production of biodiesel from macroalgae by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and thermochemical liquefaction. *Environmental Chemical Letters* 3: 136–139.

Balasubramanian S, Allen JD, Kanitkar A, Boldor D (2010). Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system-design, optimization, and quality characterization. *Bioresource Technology* 102: 3396–3403.

Ballschmiter K (2003). Pattern and sources of naturally produced organohalogenes in the marine environment: biogenic formation of organohalogenes. *Chemosphere* 52(2): 313–324.

Bani A, Fernandez FGA, D'Imporzano G, Parati K, Adani F (2021). Influence of photobioreactor set-up on the survival of microalgae inoculum. *Bioresource Technology* 320: 124408.

Barceló-Villalobos M, Olmo PF, Guzmán JL, Fernández-Sevilla JM, Fernández FGA (2019a). Evaluation of photosynthetic light integration by microalgae in a pilot-scale raceway reactor. *Bioresource Technology* 280: 404–411.

Barceló-Villalobos M, Serrano CG, Zurano AS, García LA, Maldonado SE, Peña J, Fernández FGA (2019b). Variations of culture parameters in a pilot-scale thin-layer reactor and their influence on the performance of *Scenedesmus almeriensis* culture. *Bioresource Technology Reports* 6: 190–197.

Bare WFR, Jones NB, Middlebrooks EJ (1975). Algae removal using dissolved air flotation. *Journal of Water Pollution Control Federation* 47(1):153-69.

BAUA. TRBA 400 “Guideline for Risk Assessment and for the Instruction of Employees regarding Activities involving Biological Agents” Edition: March 2017. GMBI 2017, No. 10/11 of 31 March 2017. Amended on 3 July 2018.

Bazaes J, Sepulveda C, Acien FG, Morales J, Gonzales L, Rivas M, Riquelme C (2012). Outdoor pilotscale production of *Botryococcus braunii* in panel reactors. *Journal of Applied Phycology* 24: 1353–1360.

Becker EW (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, 1994. ISBN 0521350204.

Béchet Q, Plouviez M, Chambonnière P, Guieysse B (2017). Environmental impacts of full-scale algae cultivation. *Microalgae Based Biofuels and Bioproducts*, eds C. Gonzalez-Fernandez and R. Muñoz. Amsterdam, Elsevier Ltd.; Woodhead Publishing Series in Energy, pp.505–525.

Belarbi H, Molina E, Chisti Y (2000). A process for high and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. *Enzyme Microbiology Technology* 26:516-29.

Benemann J (2013). Microalgae for biofuels and animal feeds. *Energies* 6: 5869-5886

Benemann JR (2008). Opportunities & challenges in algae biofuels production. *Algae World 2008*, Singapore.

Benov L, Al-Abraheem J (2002). Disrupting *Escherichia coli*: a comparison of methods. *Journal Biochemical and Molecular Biology* 35 (4): 428–431.

Bergero MF, Lucchesi GI (2013). Degradation of cationic surfactants using *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 immobilized in calcium alginate beads. *Biodegradation* 24: 353–364.

Bhattacharya M, Goswami S (2020). Microalgae – A green multi - product biorefinery for future industrial prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 25:101580.

Borowitzka MA (2005). Culturing microalgae in outdoor ponds. In: *Algal Culturing Techniques*. R.A. Andersen Ed., pp. 205–218. Elsevier Academic Press, Burlington. ISBN: 0-12-088426-7.

Borowitzka MA, Moheimani NR (2013). *Algae for Biofuels and Energy Developments in Applied Phycology 5*. In: Borowitzka, M.A., Ed., *Algae for Biofuels and Energy*, Preface, Springer Dordrecht Heidelberg New York London. ISBN-13978-9401781374.

Bossù M, Mancini P, Bruni E, Uccelletti D, Preziosi A, Rulli M, Relucenti M, Donfrancesco O, Iaculli F, Di Giorgio G, Matassa R, Salucci A, Polimeni A (2021). Biocompatibility and antibiofilm properties of calcium silicate-based cements: An In Vitro Evaluation and Report of Two Clinical Cases. *Biology* 10: 470.

Brindley C, Jiménez-Ruíz N, Acién FG, Fernández-Sevilla JM (2016). Light regime optimization in photobioreactors using a dynamic photosynthesis model. *Algal Resources* 16: 399–408.

Buratti FM, Manganelli M, Vichi S, Stefanelli M, Scardala S, Testai E, Funari E (2017). Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. *Archives of Toxicology* 91: 1049–1130.

Buchanan NA, Young P, Cromar NJ, Fallowfield HJ (2018). Performance of a high rate algal pond treating septic tank effluent from a community wastewater management scheme in rural South Australia. *Algal Resources* 35:325–333.

Cai L, Zhang T (2013). Detecting human bacterial pathogens in wastewater treatment plants by a high-throughput shotgun sequencing technique. *Environmental Science and Technology* 47 (10): 5433–5441.

Camacho-Rubio F, Acién FG, Sánchez-Pérez JA, García-Camacho F, Molina-Grima E (1999). Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. *Biotechnology and Bioengineering* 62: 71–86.

Carney LT, Reinsch SS, Lane PD, Solberg OD, Jansen LS, Williams KP, Trent JD, Lane TW (2014). Microbiome analysis of a microalgal mass culture growing in municipal wastewater in a prototype OMEGA photobioreactor. *Algal Research* 4:52–61.

Carvalho APA, Meireles LA, Malcata FX (2006). Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress* 22: 1490–1506.

Chambonniere P, Bronlund J, Guieysse B (2021). Pathogen removal in high-rate algae pond: state of the art and opportunities. *Journal of Applied Phycology* 33 (3): 1501–1511.

Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ, Chang JS (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource Technology* 102: 71–81.

Cheng J, Yu Y, Zhu M (2014). Enhanced biodegradation of sugarcane bagasse by *Clostridium thermocellum* with surfactant addition. *Green Chemistry* 16: 2689–2695.

Chevalier P, de la Noüe J (1985). Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and orthophosphate removal from wastewaters. *Biotechnology Letters* 7: 395–400.

Chiaramonti D, Prussi M, Casini D, Tredici MR, Rodolfi L, Bassi N, Zittelli GC, Bondioli P (2013). Review of energy balance in raceway ponds for microalgae cultivation: Rethinking a traditional system is possible. *Applied Energy* 102: 101–111.

Chini Zittelli G, Rodolfi L, Biondi N, Tredici MR (2006). Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture* 261(3): 932–943.

Chini Zittelli G, Rodolfi L, Bassi N, Biondi N, Tredici MR, Borowitzka MA, Moheimani NR (2013). Photobioreactors for Microalgal Biofuel Production. In: Borowitzka, M.A., Ed., *Algae for Biofuels and Energy*, Preface, Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 115-131. ISBN 978-94-0075479-9.

Chisti Y (2007). Principles of membrane separation processes. In G. Subramanian (Ed.), *Bioseparation and Bioprocessing: A Handbook (Second ed.)*, vol. 1, Wiley-VCH, New York (2007), pp. 289-322. ISBN 978-3-527-31585-7.

Chisti Y (2012). Raceways-based production of algal crude oil. In: Clemens, P, Christian, W, editors. Göttingen: DeGruyter. *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*. pp.113–146. ISBN 978-3-11-022501-3

Chisti Y (2014). Process hygiene: Modern systems of plant cleaning. In *Encyclopedia of Food Microbiology (Second ed.)* vol 3. Batt CA, Tortorello ML (Eds.). Academic Press, London, pp. 190-199.

Clagnan E, D'Imporzano G, Dell'Orto M, Sanchez-Zurano A, Acién-Fernandez FG, Pietrangeli B, Adani F (2022). Profiling microalgal cultures growing on municipal wastewater and fertilizer media in raceway photobioreactors. *Bioresource Technology* 360: 127619.

Collado L, Figueras MJ (2011). Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Review* 24 (1): 174–192.

Cooper MB, Smith AG (2015). Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Current Opinion Plant Biology* 26: 147-53

Craggs R, Sutherland D, Campbell H (2012). Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production. *Journal of Applied Phycology* 24: 329–337.

Craggs RJ (2005). Advanced integrated wastewater ponds. In: Shilton A, editor. Pond treatment technology, IWA scientific and technical report series. London: IWA; 282–310.

Craggs RJ, Heubeck S, Lundquist TJ, Benemann JR (2011). Algal biofuels from wastewater treatment high rate algal ponds. *Water Science and Technology* 63: 660–665.

Daniels O, Fabbro L, Makiela S (2014). The effects of the toxic cyanobacterium *Limnothrix* (strain AC0243) on *Bufo marinus* larvae. *Toxins* 6: 1021–1035.

Day JG, Gong Y, Hu Q (2017). Microzooplanktonic grazers - A potentially devastating threat to the commercial success of microalgal mass culture. *Algal Research* 27: 356–365.

De Boer MK, Boeree C, Sjollema SB, de Vries T, Rijnsdorp AD, Buma AGJ (2012). The toxic effect of the marine raphidophyte *Fibrocapsa japonica* on larvae of the common flatfish sole (*Solea solea*). *Harmful Algae* 17: 92–101.

De Carvalho JC, Magalhães Jr A.I, de Melo Pereira GV, Pedroni Medeiros AB, Bittencourt Sydney E, Rodrigues C, Molina Aulestia DT, Porto de Souza Vandenberghe L, Soccol VT, Soccolet CR (2020). Microalgal biomass pretreatment for integrated processing into biofuels, food, and feed. *Bioresource Technology* 300: 122719.

Decreto Legislativo 13 agosto 2010, n. 155. Attuazione della direttiva 2008/50/CE relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa. GU Serie Generale n.216 del 15-09-2010 - Suppl. Ordinario n. 217.

De Godos I, Mendoza JLL, Ación FGG, Molina E, Banks CJJ, Heaven S, Rogalla F (2014). Evaluation of carbon dioxide mass transfer in raceway reactors for microalgae culture using flue gases. *Bioresource Technology* 153: 307–314.

Delanka-Pedige HMK, Munasinghe-Arachchige SP, Cornelius J, Henkanatte-Gedera SM, Tchinda D, Zhang Y, Nirmalakhandan N (2019). Pathogen reduction in an algal-based wastewater treatment system employing *Galdieria sulphuraria*. *Algal Resources* 39: 101423.

Delanka-Pedige HMK, Munasinghe-Arachchige SP, Zhang Y, Nirmalakhandan N (2020). Bacteria and virus reduction in secondary treatment: Potential for minimizing post disinfectant demand. *Water Research* 177: 115802.

Demuez M, González-Fernández C, Ballesteros M (2015). Algicidal microorganisms and secreted algicides: New tools to induce microalgal cell disruption. *Biotechnology Advances* 33: 1615–162.

De-Bashan LE, Bashan Y (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource Technology* 101 (6): 1611–1627.

Dejan V, Sandra S, Žarko V (2019). Working conditions at the water treatment plants: activities, hazards and protective measures. *Safety Engineering*, June 2018. UDC 628.32:628.336.8

De Vree JH, Bosma R, Janssen M, Barbosa MJ, Wijffels RH (2015). Comparison of four outdoor pilotscale photobioreactors. *Biotechnology Biofuels* 8: 215.

Doucha J, Lívanský K (2015). Erratum to: Outdoor open thin-layer microalgal photobioreactor: potential productivity. *Journal of Applied Phycology* 27: 1043.

Doucha J, Lívanský K (2006) Productivity, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella sp.*) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. *Journal of Applied Phycology* 18: 811–826.

D'Oca MGM, Viêgas CV, Lemões JS, Miyasaki EK, Morón-Villarreyes JA, Primel EG, Abreu PC (2011). Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass & Bioenergy* 35:1533–1538.

EPA (United States Environmental Protection Agency), 2021. National Primary Drinking Water Regulations. Available at: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinkingwater/national-primary-drinking-water-regulations>.

Eriksen NT, Riisgard FK, Gunther W, Iversen JLL (2007). On-line estimation of O<sub>2</sub> production, CO<sub>2</sub> uptake, and growth kinetics of microalgal cultures in a gas tight photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 19: 161–174.

European Directive 2284 (2016) of the European Parliament and of the Council of 14 December 2016 (National Emission Ceilings -NEC Directive). Reduction of national emissions of certain atmospheric pollutants, amending Directive 2003/35/EC and repealing Directive 2001/81/EC. Official Journal of the European Communities L 344/1 of 17.12.2016.

European Commission Implementing Decision 2016/902 of 30 May 2016 establishing best available techniques (BAT) conclusions, under Directive 2010/75/EU of the



European Parliament and of the Council, for common waste water and waste gas treatment/ management systems in the chemical sector. Official Journal of the European Communities L 152/23 of 9.6.2016.

European Environment Agency (EEA) (2022). Beyond water quality - Sewage treatment in a circular economy. EEA Report No 05/2022. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2022. ISBN 978-92-9480-478-5.

European Union. Directive 2000/54/EC of the European parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. Official Journal of the European Communities L 262/21 of 17.10.2000.

Falakh F, Setiani O (2018). Hazard Identification and Risk Assessment in Water Treatment Plant considering Environmental Health and Safety Practice. E3S Web of Conferences 31, 06011, ICENIS 2017.

Fernández I, Guzmán JLL, Berenguel M, Ación FGG (2017). Dynamic modeling of microalgal production in photobioreactors. In: Prospects and Challenges in Algal Biotechnology. Tripathi BN & Kumar D (eds). Springer Nature Singapore Pte Ltd., pp 49–87. ISBN 978-981-10-1949-4.

Fernández I, Peña J, Guzman JL, Berenguel M, Ación FG (2010). Modelling and control issues of pH in tubular photobioreactors. IFAC Proceedings Volume 43 (6):186-191.

Fernández-Del Olmo P, Fernández-Sevilla JM, Ación FG, González-Céspedes A, López-Hernández JC, Magán JJ (2017). Modeling of biomass productivity in dense microalgal culture using computational fluid dynamics. Acta Horticulturae 1170: 111–118.

Fernández FGA, Gómez-Serrano C, Fernández-Sevilla JM (2018). Recovery of nutrients from wastewaters using microalgae. Front. Sustain. Food Syst., 20 September 2018

Sec. Waste Management in Agroecosystems. Volume 2 – 2018.

Ferron S, Ho DT, Johnson ZI, Huntley ME (2012). Air-water fluxes of N<sub>2</sub>O and CH<sub>4</sub> during microalgae (*Staurisira* sp.) cultivation in an open raceway pond. Environmental Science & Technology 46(19): 10842–10848.

Forehead HI, O'Kelly CJ (2013). Small doses, big troubles: Modeling growth dynamics of organisms affecting microalgal production cultures in closed photobioreactors. Bioresource Technology 129: 329–334.

Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL (1998). Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research* 243: 359–366.

Fujii K (2012) Process integration of supercritical carbon dioxide extraction and acid treatment for astaxanthin extraction from a vegetative microalga. *Food Bioproducts Process* 90:762–766.

Fulks W, Main KL (1991). *Rotifer and Microalgae Culture Systems*. The Oceanic Institute, eds, Honolulu.

Gao Y, Lai Z, Wang C, Li H, Mai Y (2021). Population characteristics of *Brachionus calyciflorus* and their potential application for evaluating river health in the Pearl River Delta, China. *Water* 13: 749.

Goldstein EJ, Citron DM, Peraino VA, Cross SA (2003). *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia and review of human *Desulfovibrio* infections. *Journal of Clinical Microbiology* 41 (6): 2752–2754.

Griffiths MJ (2013). *Microalgal Cultivation Reactor Systems*. In: Faizal B. (ed). CRC Press. *Biotechnological Applications of Microalgae*. pp. 55–76. ISBN 9780429087110.

Grima EM, Belarbi EH, Fernández FA, Medina AR, Chisti Y (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* 20 (7): 491-515.

Guckert JB, Cooksey KE, Jackson LL (1988). Liquid solvents systems are not equivalent for analysis of lipid classes in the microeukaryotic green algae *Chlorella*. *Journal of Microbiology Methods* 8:139–149.

Hase R, Oikawa H, Sasao C, Morita M, Watanabe Y (2000). Photosynthetic production of microalgal biomass in a raceway system under greenhouse conditions in Sendai City. *Journal Bioscience and Bioengineering* 89: 157–163.

Hedenskog G, Enebo L, Vendlova´ J, Prokes BTI. (1969). Investigation of some methods for increasing the digestibility in vitro of microalgae. *Biotechnology & Bioengineering* 11: 37-51.

Hernandez J-P, de-Bashan LE, Rodriguez DJ, Rodriguez Y, Bashan Y (2009). Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *European Journal of Soil Biology* 45 (1): 88–93.

- Herrera A, D'Imporzano G, Ación Fernandez FG, Adani F (2021). Sustainable production of microalgae in raceways: Nutrients and water management as key factors influencing environmental impacts. *Journal of Cleaner Production* 287: 50316546.
- Hu Q, Guterman H, Richmond A (1996). A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. *Biotechnology & Bioengineering* 51: 51–60.
- Huang Q, Jiang F, Wang L, Yang C (2017). Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms. *Engineering* 3(3): 318–329.
- Humpage A, Falconer I, Bernard C, Suzanne F, Larelle F (2012). Toxicity of the cyanobacterium *Limnothrix AC0243* to male Balb/c mice. *Water Research* 46: 1576–1583.
- Huntley ME, Nonomura AM, de la Noye J (1989). Algal culture systems. In: Huntley ME, (ed.), *Biotreatment of Agricultural Wastewater*. CRC Press, Boca Raton, Florida pp.111–130.
- Hussain J, Wang X, Sousa L, Ali R, Rittmann B, Liao W (2020). Using non-metric multi-dimensional scaling analysis and multi-objective optimization to evaluate green algae for production of proteins, carbohydrates, lipids, and simultaneously fix carbon dioxide. *Biomass & Bioenergy* 141: 105711.
- ILO-International Labour Organization (2000). *International Hazard Datasheets on Occupation: Wastewater Treatment Plant Operator*.
- INAIL-Contarp (2009). *La sicurezza per gli operatori degli impianti di depurazione delle acque reflue civili*. ISBN 978-88-7484-148-6. INAIL ed. Milano, 2009.
- Ippoliti D, González A, Martín I, Sevilla JMF, Pistocchi R, Ación FG (2016). Outdoor production of *Tisochrysis lutea* in pilot-scale tubular photobioreactors. *Journal of Applied Phycology* 28: 3159–3166.
- ISO-International Organization for Standardization 31000:2018. *Risk Management-Guidelines*, 2nd ed. Geneva, Switzerland.
- Jacobi A, Ivanova D, Posten C (2010). Photobioreactors: Hydrodynamics and mass transfer. *IFAC Proceedings* 11: 162–167.

Jerney J, Spilling K (2020). Large Scale Cultivation of Microalgae: Open and Closed Systems. In: Biofuels from Algae Methods and Protocols. Ed K. Spilling. Finnish Environment Institute, Helsinki, Finland. pp1-8. ISBN 978-1-4939-9415-1.

Jeevan Kumar SP, Kumar Garlapati V, Dash A, Scholz P, Banerjee R (2017). Sustainable green solvents and techniques for lipid extraction from microalgae: a review. *Algal Research* 21: 138–147.

Jessop PG, Kozycz L, Rahami ZG, Schoenmakers D, Boyd AR, Wechsler D, Holland AM (2011). Tertiary amine solvents having switchable hydrophilicity, *Green Chemistry* 13: 619–623.

Jiménez C, Cossío BR, Labella D, Niell FX (2003). The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain. *Aquaculture* 217: 179–190.

Johnson TJ, Katuwal S, Anderson GA, Gu L, Zhou R, Gibbons WR (2018). Photobioreactor cultivation strategies for microalgae and cyanobacteria. *Biotechnology Progress* 34 (4):811-827.

Kadir WNA, Lam MK, Uemura Y, Lim JW, Lee KT (2018). Harvesting and pre-treatment of microalgae cultivated in wastewater for biodiesel production: A review. *Energy Conversion and Management* 171: 1416–1429.

Kanazawa T, Yuhara T, Sasa T (1958). Mass culture of unicellular algae using the “open circulation method”. *Journal of General Applied Microbiology* 4: 135–152

Kanda H, Li P, Ikehara T, Yasumoto-Hirose M (2012). Lipids extracted from several species of natural blue–green microalgae by dimethyl ether: extraction yield and properties. *Fuel* 95: 88–92.

Khan MI, Shin JH, KIM JD The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products (2018) *Microbial Cell Factories* 17: 36.

Khaw YS, Khong NMH, Shaharuddin NA, Yusoff FM (2020). A simple 18S rDNA approach for the identification of cultured eukaryotic microalgae with an emphasis on primers. *Journal of Microbiology Methods* 172: 105890.

Kim Y-H, Choi YK, Park J, Lee S, Yang YH, Kim HJ, Park TJ, Hwan Kim Y, Lee SH (2012). Ionic liquid-mediated extraction of lipids from algal biomass, *Bioresource Technology* 109: 312–315.

Kim Y-H, Park S, Kim MH, Choi Y-K, Yang Y-H, Kim HJ, Kim H, Kim H-S, Song K-G, Lee SH (2013). Ultrasound-assisted extraction of lipids from *Chlorella vulgaris* using [Bmim][MeSO<sub>4</sub>]. *Biomass & Bioenergy* 56: 99–103.

Kong Z, Li L, Wu J, Rong C, Wang T, Chen R, Sano D, Li Y-Y (2022). Unveiling the characterization and development of prokaryotic community during the start-up and long-term operation of a pilot-scale anaerobic membrane bioreactor for the treatment of real municipal wastewater. *Science of Total Environment* 813: 152643.

Kubickova B, Babica P, Hilscherova K, Sindlerova L (2019). Effects of cyanobacterial toxins on the human gastrointestinal tract and the mucosal innate immune system. *Environmental Science Europe* 31: 31.

Kulichevskaya IS, Ivanova AO, Belova SE, Baulina OI, Bodelier PLE, Rijpstra WIC, Sinninghe Damste JS, Zavarzin GA, Dedysh SN (2007). *Schlesneria paludicola* gen. nov., sp. nov., the first acidophilic member of the order Planctomycetales, from Sphagnum-dominated boreal wetlands. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 57 (11): 2680-2687.

Kumar N, Sharma G, Chandel H, Shyam K, Thakur S, Vaswani P, Saxena G (2022). Microalgae in Wastewater Treatment and Biofuel Production: Recent Advances, Challenges, and Future Prospects. In: *Omics Insights in Environmental Bioremediation*. V. Kumar, I. S. Thakur (eds.), Chapter 11. Springer Nature Singapore, pp. 237-271. ISBN-13:978-9811943195.

Lan L, Zhao J, Wang S, Li X, Qiu L, Liu S, Bin Nasry AAN (2019). NO and N<sub>2</sub>O accumulation during nitrite-based sulfide-oxidizing autotrophic denitrification. *Bioresource Technology*. Rep. 7, 100190.

Lardon L, Hélias A, Sialve B, Steyer J-P, Bernard O (2009). Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environmental Science & Technology* 43: 6475–6481.

Lee YK (2001). Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology* 13 (4): 307–315.

Lee JY, Yoo C, Jun S., Ahn CY, Oh HM (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae, *Bioresource Technology* 101 (Suppl. 1): S75–S77.

Li J, Shou N, Su WW (2003). Online estimation of stirred-tank microalgal photobioreactor cultures based on dissolved oxygen measurements. *Biochemical Engineering Journal* 14: 51–65.

Li T, Strous M, Melkonian M (2017). Biofilm-based photobioreactors: Their design and improving Produttività through efficient supply of dissolved inorganic carbon. *FEMS Microbiology Letters* 364 (24): 1–9.

Li K, Liu Q, Fang F, Luo R, Lu Q, Zhou W, Huo S, Cheng P, Liu J, Addy M, Chen P, Chen D, Ruan R (2019). Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresource Technology* 291: 121934.

Liau B-C, Shen C-T, Liang F-P, Hong S-E, Hsu S-L, Jong T-T, Chang C-MJ (2010). Supercritical fluids extraction and anti-solvent purification of carotenoids from microalgae and associated bioactivity. *Journal of Supercritical Fluids* 55: 169–175.

Lin YX, Ye GP, Kuzyakov Y, Liu DY, Fan JB, Ding WX (2019). Long-term manure application increases soil organic matter and aggregation, and alters microbial community structure and keystone taxa. *Soil Biology Biochemistry* 134: 187-196.

Little AD (1953). Pilot plant studies in the production of *Chlorella*. In: Burlew, JS, editor. *Algal Culture From Laboratory to Pilot Plant*. Carnegie Institution of Washington Publication 600. Washington DC, pp. 253–273. ISBN 0-87279-611-6.

Lösing MB (2011). Modelling & simulating microalgae production in an open pond reactor. Thesis project Systems and Control. Number: YBT-80324.

Lundholm N, Churro C, Fraga S, Hoppenrath M, Iwataki M, Larsen J, Mertens K, Moestrup Ø, Zingone A. (Eds) (2009 onwards). IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Accessed at <https://www.marinespecies.org/hab> on 2022-01-25.

Lundquist TJ, Woertz I, Benemann JR (2010). Microalgae for wastewater treatment and biofuels production. ACS National Meeting Abstracts (Boston, MA).

Mallick N, Rai LC (1993). Influence of culture density, pH, organic acids and divalent cations on the removal of nutrients and metals by immobilized *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9: 196–201.

Manganelli M, Scardala S, Stefanelli M, Palazzo F, Funari E, Vichi S, Buratti FM, Testai E (2012). Emerging health issues of cyanobacterial blooms. *Annali Istituto Superiore di Sanita* 48(4): 415-28.

Manganelli M, Testai E, Tazart Z, Scardala S, Codd GA (2023). Co-occurrence of taste and odor compounds and cyanotoxins in cyanobacterial blooms: Emerging Risks to Human Health? *Microorganisms* 11(4): 872.

Marquez FJ, Sasaki K, Nishio N, Nagai S (1995). Inhibitory effect of oxygen accumulation on the growth of *Spirulina platensis*. *Biotechnology Letters* 17: 225–228.

Masojídek J, Kopecký J, Giannelli L, Torzillo G (2011). Productivity correlated to photobiochemical performance of *Chlorella* mass cultures grown outdoors in thin-layer cascades. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38: 307–317.

Masojídek J, Prášil O (2010). The development of microalgal biotechnology in the Czech Republic. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37: 1307–1317.

Mathimani T, Mallick N (2018). A comprehensive review on harvesting of microalgae for biodiesel - Key challenges and future directions. *Renewable and Sustainable Energy Review* 91: 1103–1120.

Milledge JJ, Heaven S (2011). Disc stack centrifugation separation and cell disruption of microalgae: a technical note. *Environmental and Natural Resources Research* 1 (1): 17-24.

Mohsenpour SF, Hennige S, Willoughby N, Adeloye AJ, Gutierrez T (2021). Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review'. *Science of the Total Environment* 752: 142168.

Molina-Grima E, García-Camacho F, Ación-Fernández FG, Sánchez-Mirón A, Plouviez M, Shene C, Chisti Y (2022). Pathogens and predators impacting commercial production of microalgae and cyanobacteria. *Biotechnology Advances* 55: 107884.

Molina E, Fernández J, Ación FG, Chisti Y (2001). Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of Biotechnology* 92: 113–131.

Molina Grima E, Belarbi EH, Ación Fernandez FG, Robles Medina A, Chisti Y (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* 20: 491-515.

Molina Grima E, Sánchez Pérez JA, García Camacho F, Ación Fernández FG, López Alonso D, Segura del Castillo CI (1994). Preservation of the marine microalga, *Isochrysis galbana*: influence on the fatty acid profile. *Aquaculture* 123: 377-385.

Moraes CC, Sala L, Cerveira GP, Kalil SJ (2011). C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 28: 45–49.

Morais MG, Vaz BS, Morais EG, Costa JAV (2014). Biological effects of *Spirulina (Arthrospira)* biopolymers and biomass in the development of nanostructured scaffolds. Special Issue “ECM-Like Scaffolds: Nature Drives Research”. Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International* 2014: 762705.

Morales-Amaral MM, Gómez-Serrano C, Acien FG, Fernández-Sevilla JM, Molina-Grima E (2015). Outdoor production of *Scenedesmus sp.* in thin-layer and raceway reactors using centrate from anaerobic digestion as the sole nutrient source. *Algal Resources* 12: 99–108.

Morillas-Espana A, Lafarga T, Gomez-Serrano C, Acien-Fernandez FG, Gonzalez-Lopez CV (2020). Year-long production of *Scenedesmus almeriensis* in pilot-scale raceway and thin-layer cascade photobioreactors. *Algal Resources* 51:102069.

Mossmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods* 65(1-2): 55-63.

Mubarak M, Shaija A, Suchithra TV (2015). A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Research* 7: 117-123.

Mulbry W, Westhead EK, Pizarro C, Sikora L (2005). Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer. *Bioresource Technology* 96 (4): 451–458.

Muñoz R, Köllner C, Guieysse B (2009). Biofilm photobioreactors for the treatment of industrial wastewaters. *Journal of Hazardous Materials* 161 (1): 29-34.

Mwanza EP, Hugo A, Charimba G, Hugo CJ (2022). Pathogenic Potential and Control of *Chryseobacterium* Species from Clinical, Fish, Food and Environmental Sources. *Microorganisms* 10: 895.

Nasirpour N, Mousavi SM, Shojaosadati SA (2014). A novel surfactant-assisted ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology* 169: 33–37.

Norsker NH, Barbosa MJ, Vermuë MH, Wijffels RH (2011). Microalgal production - A close look at the economics. *Biotechnology Advances* 29: 24–27.



Nuez VJ, Voltolina D, Nieves M, Pia P, Medina A, Guerrero M (2001). Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. *Bioresource Technology* 78: 161–164.

Olabi AG, Shehata N, Sayed ET, Rodriguez C, Anyanwu RC, Russell C, Abdelkareem MA. (2023). Role of microalgae in achieving sustainable development goals and circular economy. *Science of The Total Environment* 854: 158689.

Olguin EJ, Sanchez-Galvan G, Arias-Olguin I, Melo FJ, Gonzalez-Portela RE, Cruz L, De Philippis R, Adessi A. (2022). Microalgae-Based Biorefineries: Challenges and Future Trends to Produce Carbohydrate Enriched Biomass, High-Added Value Products and Bioactive Compounds. *Biology* 11(8): 1146.

Oluseyi Osunmakinde C, Selvarajan R, Mamba BB, Msagati T (2019). Profiling Bacterial Diversity and Potential Pathogens in Wastewater Treatment Plants Using High-Throughput Sequencing Analysis. *Microorganisms* 7 (11): 506.

Oostlander PC, van Houcke J, Wijffels RH, Barbosa MJ (2020). Microalgae production cost in aquaculture hatcheries. *Aquaculture* 525: 735310.

Oswald WJ, Golueke CG (1968). Large scale production of microalgae. In: Mateles RI and Tannenbaum, SR, eds. MIT Press Cambridge. *Single-Cell Protein*, pp. 271–305. ISBN 9780262130417.

Pawlowski A, Fernández I, Guzmán JLL, Berenguel M, Ación FGG, Normey-Rico JEE (2014). Event based predictive control of pH in tubular photobioreactors. *Computational & Chemical Engineering* 65: 28–39.

Piek A, (2012). Case study: biomass from open ponds. C. Posten, C. Walter (Eds.), *Microalgal Biotechnology*, Walter de Gruyter GmbH, Berlin, pp. 247-252.

Pires JCM, Gonçalves AL, Martins FG, Alvim-Ferraz MCM, Simões M (2013). Effect of light supply on CO<sub>2</sub> capture from atmosphere by *Chlorella vulgaris* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 19:1109–1117.

Priti K, Arvindhan N, Pradeep DU (2018). Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 1 (6).

Rawat I, Ranjith Kumar R, Mutanda T, Bux F (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy* 103: 444–467.

Rempel A, de Souza Sossella F, Margarites AC, Astolfi AL, Steinmetz RLR, Kunz A, Treichel H, Colla LM (2019). Bioethanol from *Spirulina platensis* biomass and the use of residuals to produce biomethane: an energy efficient approach. *Bioresource Technology* 288:121588.

Renard JJ, Calidonna SE, Henley MV (2004). Fate of ammonia in the atmosphere – a review for applicability to hazardous releases. *Journal of Hazardous Materials* 108 (1-2): 29–60.

Richmond A, Boussiba S, Vonshak A, Kopel R (1993). A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. *Journal Applied of Phycology* 5: 327–332.

Robinson LF, Morrison AW, Bamforth MR (1988). Improvements relating to biosynthesis. *Eur. Pat.*

Robinson PK, Mak AL, Trevan MD (1986). Immobilized algae: A review. *Process Biochemistry* 21(8): 122-127.

Rodolfi L, Zittelli GC, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology & Bioengineering* 102: 100–112.

Rose AK, Fabbro L, Kinnear S (2018). Cyanobacteria breakthrough: effects of *Limnothrix redekei* contamination in an artificial bank filtration on a regional water supply. *Harmful Algae* 76: 1–10.

Ruiz J, Álvarez-Díaz PD, Arbib Z, Garrido-Pérez C, Barragán J, Perales JA (2013). Performance of a flat panel reactor in the continuous culture of microalgae in urban wastewater: Prediction from a batch experiment. *Bioresource Technology* 127: 456–463.

Ryan MP, Pembroke JT (2018). *Brevundimonas* spp: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence* 9(1): 480-493.

Sabana Horizon 2020 project. Sustainable Algae Biorefinery for Agriculture and Aquaculture. WP2-Sustainability analysis. Task 2.2. Environmental impacts. Mitigation guideline

Samorì C, Barreiro DL, Vet R, Pezzolesi L, Brillman DWF, Galletti P, Tagliavini E (2013). Effective lipid extraction from algae cultures using switchable solvents, *Green Chemistry* 15: 353–356.

- Santana A, Jesus S, Larrayoz MA, Filho RM (2012). Supercritical carbon dioxide extraction of algal lipids for the biodiesel production, *Procedia Engineering* 42: 1755–1761.
- Sarker NK (2021). Exploring the potential of WW reclamation by means of outdoor cultivation of microalgae in photobioreactors. *Energ. Ecol. Environ.* 1–16.
- Schoop VM, Fusenig NE, Mirancea N (1999). Epidermal Organization and Differentiation of HaCaT Keratinocytes in Organotypic Coculture with Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* 112 (3): 343–353.
- Šetlík I, Šust V, Málek I (1970). Dual purpose open circulation units for large scale culture of algae in temperate zones. In: Basic design considerations and scheme of a pilot plant. *Algological Studies* 1: 111– 164.
- Shen Y, Yuan W, Pei ZJ, Wu Q, Mao E (2009). Microalge mass production methods. *Transactions of the American Society of Agricultural and Biological Engineers (ASABE)* 52 (4):1275-1287.
- Sheng J, Vannela R, Rittmann BE (2011). Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803. *Bioresource Technology* 102:1697–1703.
- Show PL, Tang MS, Nagarajan D, Ling TC, Ooi CW, Chang JS (2017). A Holistic Approach to Managing Microalgae for Biofuel Applications. *International Journal of Molecular Science* 18 (1): 215.
- Sierra E, Acién FG, Fernández JM, García JL, González C, Molina E (2008). Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal* 138: 136–147.
- Silva Benavides AM, Torzillo G, Kopecký J, Masojídek J (2013). Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass & Bioenergy* 54: 115–122.
- Singh DP, Singh N, Verma K (1995). Photooxidative damage to the cyanobacterium *Spirulina platensis* mediated by singlet oxygen. *Current Microbiology* 31: 44–48.
- Slegers PM, Wijffels RH, van Straten G, van Boxtel AJB (2011). Design scenarios for flat panel photobioreactors. *Applied Energy* 88: 3342–3353.

Slompo NDM, Quartaroli L, Vasconcelos Fernandes T, Ribeiro da Silva GH, Daniel LA (2020). Nutrient and pathogen removal from anaerobically treated black water by microalgae. *Journal of Environmental Management* 268: 110693.

Sloth JK, Wiebe MG, Eriksen NT (2006). Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme and Microbiology Technology* 38: 168–175.

Sistema Nazionale per la Protezione dell’Ambiente (SNPA) (2018). Metodologie per la valutazione delle emissioni odorigene. Documento di sintesi elaborato a cura del Gruppo di Lavoro 13 nell’ambito dei lavori del Programma Triennale 2014-2016 del SNPA.

Soelberg KK, Danielsen TKL, Martin-Iguacel R, Justesen US (2020). *Arcobacter butzleri* is an opportunistic pathogen: recurrent bacteraemia in an immunocompromised patient without diarrhoea. *Access Microbiology* 2 (20).

Straessner R, Silve A, Eing C, Rocke S, Wuestner R, Leber K, Mueller G, Frey W (2016). Microalgae precipitation in treatment chambers during pulsed electric field (PEF) processing. *Innovations Food Science Emerging Technology* 37: 391–399.

Taher H, Al-Zuhair S, Al-Marzouqi AH, Haik Y, Farid M, Tariq S (2014). Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipid: Process optimization and laboratory scale-up. *Journal of Supercritical fluids* 86: 57-66.

Tan J, Lee SY, Chew KW, Lam MK, Lim JW, Ho SH, Show PL (2020). A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered* 11(1): 116–129.

Tang S, Qin C, Wang H, Li S, Tian S (2011). Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae. *Journal of Supercritical Fluids* 57: 44–49.

Tanzi D, Vian MA, Ginies C, Elmaataoui M, Chemat F (2012). Terpenes as green solvents for extraction of oil from microalgae. *Molecules* 17: 8196–8205,

Testai E, Scardala S, Vichi S, Buratti MF, Funari E (2016). Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. *Critical Review Toxicology* 46(5):385-419.

Tong Tron H, Hien Than N (2021). Hazard Identification and Risk Assessment in Wastewater Treatment Plant of Di An City. Thu Dau Mot University Journal of Science - Volume 3 - Issue 1.

Torzillo G, Zittelli GC (2015). Tubular Photobioreactors. In: Prokop A Bajpai RK, ZME, editor. Switzerland: Springer International Publishing. Algal Biorefineries Volume 2: Products and Refinery Design, 187–212. ISBN 978-3-319-36667-8.

Tredici MR (2004). Mass production of microalgae: photobioreactors. In: Handbook of Microalgal Cultures, Biotechnology and Applied Phycology. Richmond A Ed., pp. 178–214. Blackwell, Oxford. ISBN 0–632–05953–2.

Tredici MR, Bassi N, Prussi M, Biondi N, Rodolfi L, Chini Zittelli G, Sampietro G (2015 a). Energy balance of algal biomass production in a 1-ha “Green Wall Panel” plant: How to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high Net Energy Ratio. Applied Energy 154: 1103–1111.

Tredici MR, Carlozzi P, Chini Zittelli G, Materassi R (1991). A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. Bioresource Technology 38: 153–159.

Tredici MR, Chini Zittelli, G Rodolfi L, 2010. Photobioreactors. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology. Vol 6 (eds M.C. Flickinger & S. Anderson), 3821–3838. John Wiley & Sons, Hoboken.

Tredici MR, Zittelli GC, 1998. Efficiency of sunlight utilization: Tubular versus flat photobioreactors. Biotechnology & Bioengineering 57: 187–197.

Tsukuda O, Kawahara T, Miyachi S (1977). Mass culture of *Chlorella* in Asian countries. In: Mitsui A, Miyachi S, San Pietro A, Tamura S (eds) Biological solar energy conversion. Academic, New York, pp.363–365.

Tušer I, Oulehlová A (2021). Risk Assessment and Sustainability of Wastewater Treatment Plant Operation. Sustainability 13: 5120.

UNI 11761 (2019). Emissions and air quality - Odour determination using IOMS (Instrumental Odour Monitoring Systems) and their qualification.

UNI EN 13725 (2004). Air quality - Determination of odour concentration by dynamic olfactometry.

UNI EN 16841-1 (2017). Ambient air - Determination of odour in ambient air by using field inspection - Part 1: Grid method.

UNI EN 16841-2 (2017). Ambient air - Determination of odour in ambient air by using field inspection - Part 2: Plume method.

United States Environmental Protection Agency (EPA) (2021). National Primary Drinking Water Regulations. Available at: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>.

Usher PK, Ross AB, Miller ACV, Alison ST, & William FG (2014). An overview of the potential environmental impacts of large-scale microalgae cultivation. *Biofuels*, 5 (3): 331-349.

Van Bergeijk SA, Salas-Leiton E, Cañavate JP (2010). Low and variable productivity and low efficiency of mass cultures of the haptophyte *Isochrysis aff. galbana* (T-iso) in outdoor tubular photobioreactors. *Aquacultural Engineering* 43: 14-23.

Vieira Costa JA, Bastos Freitas BC, Duarte Santos T, Mitchell BG, Greque Morais M, 2019. Chapter 9 - Open pond systems for microalgal culture. In *Biofuels from Algae* Spilling K (ed). Springer Nature ISBN 9780444595584 pp.199-223.

Virost M, Tomao V, Ginies C, Visinoni F, Chemat F (2008). Microwave-integrated extraction of total fats and oils. *Journal of Chromatography A* 1196-97: 57-64.

Biochemicals, Editor(s): A. Pandey, J.-S. Chang, C.R. Soccol, D.-J. Lee, Y. Chisti. *Biofuels from Algae* (Second Edition), Elsevier, 199-223.

Vonshak A (1997). *Spirulina: growth, physiology and biochemistry*. In: Vonshak, A, editor. London: Taylor and Francis. *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology, Taylor & Francis Ltd, 1 Gunpowder Square, London EC4A 3DE, pp.43-65. ISBN 0-7484-0674-3.

Vonshak A, Guy R (1992). Photoadaptation, photoinhibition and productivity in the blue-green alga *Spirulina platensis* grown outdoors. *Plant, Cell Environment* 13: 613-616.

Wang B, Lan CQ, Horsman M (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advances* 30: 904-912.

Waśkiewicz A, Irzykowska L (2014). *Flavobacterium* spp. - characteristics, occurrence, and toxicity. *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition), pp. 938-942.

Weissman JC, Goebel RP (1987). Design and analysis of microalgal open pond systems for the purpose of producing fuels: A subcontract report.

Wen Z, Johnson MB (2009). Microalgae as a feedstock for biofuel production. Virginia Cooperative Extension, Publication 442-886.

Wexler HM (2007). Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical Microbiology Review* 20 (4): 593–621.

Woertz I, Fulton L, Lundquist T (2009). Nutrient removal & green- house gas abatement with CO<sub>2</sub> supplemented algal high rate ponds. *Proceedings Water Environmental Federation* pp. 7924–7936.

Yang Y, Zheng X, Tang Q (2020). Species diversity and seasonal dynamics of filamentous cyanobacteria in urban reservoirs for drinking water supply in tropical China. *Ecotoxicology* 29: 780–789.

Zeng G, Fu H, Zhong H, Yuan X, Fu M, Wan W, Huang G (2007). Co-degradation with glucose of four surfactants, CTAB, Triton X-100, SDS, and rhamnolipid, in liquid culture media and compost matrix. *Biodegradation* 18 (3): 303–310.

Zimmo OR, Al Saed R, Gijzen H (2000). Comparison between algae-based and duckweed-based wastewater treatment: Differences in environmental conditions and nitrogen transformations. *Water Science & Technology* 42: 215–222.

Zou N, Richmond A (1999). Effect of light-path length in outdoor fiat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis sp.* *Progress in Industrial Microbiology* 35: 351–356.

# ALLEGATO 1

## Lista dei principali impianti produttivi di microalghe europee ed extraeuropee

Company	Country	Algae	Products		Reactor			Harvesting	Post harvesting process			
			Food- Cosmetics	Feed- Fertilizer	Wastewater treatment	Unclear	Open			Closed	Other/Unclar	
Agriturismo Santele Società Agricola	Italy	Spirulina	1				1		Sieves	Drying		
Alga Spring	Netherlands	Phytoplankton, Nannochloropsis gaditana	1				1					
AlgaeCycles	UK	N/A	1					1				
Algae Factory and Alga Tarifa	Spain-Italy- Netherlands	Spirulina	1				1			Sieves	Drying	
Algaeenergy	Spain	Spirulina, Cyanobacteria, Nannochloropsis gaditana, others		1			1	1			Sieves	Drying
Algalif	Iceland	Haematococcus pluvialis	1							1		
Algamo	Czech republic	Haematococcus pluvialis	1	1				1				
Algamundi	Italy	Haematococcus pluvialis, Spirulina, Chlorella	1	1						1	Sieves	Drying
Algaeol (Algaeol Bangladesh Ltd and Alga Biomass Bangladesh Ltd.)	Spain	N/A	1							1		
Algatrec	Portugal	Spirulina, Chlorella sp., Dunaliella sp., Nannochloropsis sp., Haematococcus sp.	1	1	1		1	1			Sieves	Drying
algatech	USA- Israel	Haematococcus pluvialis, Phaeodactylum tricornutum, Porphyridium coelestem, Nannochloropsis	1				1					
Alghitaly	Italy	Spirulina, Haematococcus pluvialis	1							1	Sieves	Drying
Alghemid	Germany	Chlorella	1				1					
Algosource	France	Chlorella, Scenedesmus, Tetraselmis, Isochrysis, others	1				1				Sieves	Co-extraction/lysis, centrifugation and membrane filtration and sterilization
Algreen	Netherlands	Spirulina	1				1				Sieves	Drying
Alga	Denmark	Chlorella	1							1		
Al microalgae	Portugal	Chlorella vulgaris, Nannochloropsis oceanica, Phaeodactylum tricornutum, Tetraselmis chuii, Scenedesmus sp.	1				1					
Apogee Spirulina	USA (MN)	Spirulina	1				1				Sieves	Drying
Australian Spirulina	Australia	Spirulina	1				1				Sieves	Drying
Azienda Agricola Salera/Azienda Agricola Prato della Voga/Azienda Agricola Reggiani Giuseppe/Azienda Agricola Bosello/Azienda Agricola Mauro Comascio s.a.s. r Spa	Italy	Spirulina	1				1				Sieves	Drying
Bioresa	France	Various	1	1								
Biorizon Biotech	Spain	Spirulina	1				1	1			Centrifugation	
Blue Biotech	Germany	Nannochloropsis, Haematococcus, others on request			1			1				
Buggypower	Portugal- Spain	Chlorella, brown algae	1	1								
Cellana	USA (HI)	N/A	1	1			1	1				
CyanoTech	USA (HI)	Haematococcus pluvialis, Spirulina	1								Sieves	Drying
DCU Herac	Japan	Spirulina	1				1				Sieves	Drying
Donggal City Spirulina Bio-engineering Co.	China	Spirulina, Chlorella, Haematococcus pluvialis	1				1	1			Sieves	Drying
Earthrise Nutritional	USA (Ca)	Spirulina	1				1	1			Sieves	Drying
Easy algae - Fropiancon Marino	Spain	Various			1					1		

continua





## Fonti delle immagini

Immagine	Fonte
copertina	Autori
pag. 12	Bhattacharya e Goswami,2020 (mod.)
pag. 14	Olguin EJ et al., 2022 (mod.)
da pag. 16 a pag. 17	Autori
pag. 18	Araújo et al., 2021 (mod.)
pag. 20	Lösing, 2011 (mod.)
pag. 32	de Carvalho et al., 2020 (mod.)
pag. 43	Autori
pag. 56	Autori
pag. 58	Autori
da pag. 60 a pag. 61	Autori
pag. 66	Autori
pag. 68	Autori
da pag. 70 a pag. 71	Autori
pag. 72	Autori
da pag. 74 a pag. 76	Autori
pag. 78	Autori
da pag. 80 a pag. 81	Autori
da pag. 85 a pag. 86	Autori
da pag. 110 a pag. 111	Autori

