



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

INGEGNERIA INDUSTRIALE

Ciclo XXIX

TITOLO TESI

IMPLEMENTAZIONE DI TECNICHE DI BIOREMEDIATION

PER L'AMBIENTE

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

ING-IND/26

Presentata da: Ing. Giuliano Saiu

Coordinatore Dottorato Prof. Francesco Aymerich

Tutor Prof. Massimiliano Grosso

Esame finale anno accademico 2015 – 2016

Tesi discussa nella sessione d'esame marzo – aprile 2017

IMPLEMENTAZIONE DI TECNICHE DI *BIOREMEDIATION* PER L'AMBIENTE

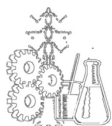


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

Ing. Giuliano Saiu

SUPERVISORE

Prof. Massimiliano Grosso



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

DOTTORATO DI RICERCA IN INGEGNERIA INDUSTRIALE

XXIX CICLO

Questa tesi può essere utilizzata, nei limiti stabiliti dalla normativa vigente sul Diritto d'Autore (Legge 22 aprile 1941 n.633 e succ. modificazioni e articoli da 2575 a 2583 del Codice civile) ed esclusivamente per scopi didattici e di ricerca; è vietato qualsiasi utilizzo per fini commerciali. In ogni caso tutti gli utilizzi devono riportare la corretta citazione delle fonti. La traduzione, l'adattamento totale e parziale, sono riservati per tutti i Paesi. I documenti depositati sono sottoposti alla legislazione italiana in vigore nel rispetto del Diritto di Autore, da qualunque luogo essi siano fruiti.

A Roberta

"for in the sciences the authority of thousands of opinions is not worth as much as one tiny spark of reason in an individual man. Besides, the modern observations deprive all former writers of any authority, since if they had seen what we see, they would have judged as we judge."

"sì perché l'autorità dell'opinione di mille nelle scienze non val per una scintilla di ragione di un solo, sì perché le presenti osservazioni spogliano d'autorità i decreti de' passati scrittori, i quali se vedute l'avessero, avrebbero diversamente determinato."

Galileo Galilei

Third letter on sunspots (December 1612) to Mark Wesler (1558 - 1614)

ABSTRACT

The work undertaken during the PhD was aimed at evaluating alternative bioremediation methods, trying to focus on biological and low environmental impact techniques. At first, the main purpose was to create a robust and replicable method, capable to break-down priority pollutants for the environment, using natural microorganisms or their consortia. Was decided to study the degradation of a particular class of priority micro-pollutants, the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), and evaluate the bioremediation capabilities of a white-rot fungus, the *Pleurotus sajor caju*, and a selected bacteria consortium (BULAB 5738). PAHs are organic compounds, composed of multiple aromatic rings, that persist in the environment because they are very stable due to their molecular structure and therefore are difficult to be attacked by microorganisms present in nature. The study of PAHs and their bio-degradation is also motivated by the difficulties encountered in the scientific literature, as appears from the current state of the art. As far as this study is concerned, the use of 'white rot' fungi and selected bacterial consortia is a valid and real opportunity for the degradation of many toxic molecules, including PAHs.

Another part of the PhD work was dedicated to the study of microalgae's degradation capabilities, with particular regard to the potential of these microorganisms to remove nutrients from waste water. The microalgae are often studied for energy purposes and for high added-value molecules production; in this work the focus was on their capabilities on nitrogen and phosphorus removal. These compounds are present on wastewater and on aquaculture processes that can be treated by microalgae. This alternative was considered feasible in the short term, in terms of applicability and practical results. Furthermore, the capacity of *Nannochloropsis oculata* to use high loads of nitrogen and phosphorus as a source of nourishment, has been explored, in order to remove these pollutants from the wastewater. The *Nannochloropsis oculata* was chosen for its ability to survive in adverse conditions and for its relatively fast growth velocity, if compared to other photosynthetic microorganisms.

Design of Experimental approach was used for all the experimental campaigns, to maximize the obtained information and minimize the number of experiments. Thanks to the statistical analysis it was possible to obtain significant information about single and multiple effect, that influence the studied process.

Both experiments with the *Pleurotus s.c.* and the bacterial consortium showed how they tolerate and break-down the selected PAHs. The main differences lay on the dynamics of growth and on the timing of the two different kind of microorganism, as well as the different pathways of degradation process. In particular, the fungi growth is slower than the one of bacterial consortium, but both are able to degrade the selected pollutants. As far as the selected microalgal species are concerned, the *Nannochloropsis o.* showed a good removal capacity for nitrogen, evaluated as nitrates and urea, obtaining the complete degradation, even on high loads up to concentrations of 1000 mg/l of nitrogen, as a nitrate.



Le poche copie cartacee di questa tesi di dottorato sono state stampate su carta riciclata e prodotta con il 100% di cellulosa E.C.F. (*Elemental Chlorine Free*), certificata F.S.C. (© 1996 *Forest Stewardship Council A.C.*) proveniente da foreste gestite secondo rigorosi standard ambientali, sociali ed economici. La carta è disinchiostata e sbiancata TCF (*Total Chlorine Free*).

Indice

Capitolo 1.....	4
Introduzione	4
1.1 Motivazioni e scopo del lavoro	5
1.2 Sviluppo della tesi	6
 Capitolo 2.....	 8
Introduzione, tecniche analitiche e metodo sperimentale.....	8
2.1 Il biorisanamento	8
2.2 Tecniche analitiche	17
2.2.1 Spettrofotometria	17
2.2.2 Cromatografia liquida e gassosa	19
2.2.3 Spettrometria di massa	22
2.3 Distribuzione dei tempi di permanenza	24
2.4 Generalità sui microorganismi	27
2.5 Modellazione della crescita microbica	28
2.6 Design of Experiments	31
 Capitolo 3.....	 42
Biorisanamento e funghi.....	42
3.1 Stato dell'arte	42
3.2 I funghi	43
3.3 Materiali	44
3.3.1 <i>Pleurotus sajor caju</i> e <i>medium</i> di crescita	44
3.3.2 IPA utilizzati per le prove	46
3.3.3 Biodisponibilità e agenti mobilizzanti	46
3.3.4 Materiali	48
3.4 Analisi chimiche	48
3.5 Prove sperimentali	51
3.5.1 Campagna sperimentale su piastre di Petri	51
3.5.2 Acquisizione dati e modellazione della crescita	53
3.5.3 Analisi del piano fattoriale	55
3.5.4 Campagna sperimentale in beute agitate	61
3.5.5 Analisi dei risultati	62
3.6 Conclusioni	65

Capitolo 4.....	66
Biorisanamento e consorzi batterici	66
4.1 Stato dell'arte.....	66
4.2 I batteri, caratteristiche principali.....	67
4.3 Materiali	71
4.3.1 Consorzio batterico	71
4.3.2 Beute e fermentatori.....	72
4.3.3 <i>Medium</i> di crescita.....	73
4.3.4 Materiali principali utilizzati.....	73
4.3.5 Reidratazione e acclimatazione dei consorzi batterici.....	75
4.4 Analisi chimiche.....	75
4.5 Prove sperimentali con i consorzi batterici.....	76
4.6 Analisi del piano fattoriale	79
4.6.1 Analisi statistica per il parametro λ , fase lag	79
4.6.2 Analisi statistica per il parametro μ_1 , velocità di crescita	82
4.6.3 Analisi statistica per il parametro μ_2 , velocità di crescita	85
4.7 Capacità degradative del consorzio batterico	88
4.7.1 Risultati delle analisi in HPLC.....	92
4.8 Biorisanamento e consorzi batterici, conclusioni	97
 Capitolo 5.....	 99
Biorisanamento e microalghe	99
5.1 Stato dell'arte.....	99
5.2 Le microalghe	100
5.3Materiali	102
5.3.1 <i>Medium</i> e colture algali	102
5.3.2 Parametri monitorati.....	103
5.3.3 Analisi chimiche	104
5.3.4 Fotobioreattori	105
5.4 Studio del comportamento della <i>Nannochloropsis oculata</i>	109
5.5 Modellazione della crescita algale	112
5.6 Analisi del piano fattoriale	114
5.7 Degradazione di azoto e fosforo.....	117
5.8 Impatto del fotoperiodo e alti carichi di azoto	122
5.8.1 Impatto della diversa scala di reattori sul calcolo della velocità di crescita.....	122
5.8.2 Campagna sperimentale cicli di luce e alti carichi di azoto	124
5.9 Biorisanamento e microalghe, conclusioni.....	126

6 Conclusioni	129
Bibliografia	134
Contributi scientifici.....	143
Appendice 1	145
Grafici capitolo 3 - Funghi.....	145
Appendice 2	154
Grafici capitolo 4 – Consorzi batterici	154
Appendice 3	158
Grafici capitolo 5 – Microalghe.....	158
Ringraziamenti	169

Capitolo 1

Introduzione

Le attività antropogeniche impattano inevitabilmente sull'ambiente a causa dell'immissione costante di inquinanti, modificandone il suo stato naturale. In seguito alla rivoluzione industriale, in particolare dagli anni '50 in poi, il forte sviluppo dell'industria chimica ha creato nuove opportunità di lavoro ed un sostanziale miglioramento della qualità della vita nel nostro paese. Di contro, forse anche per colpa di una carente tutela ambientale e di abusi, sono stati accumulati nell'ambiente molti prodotti xenobiotici che non sono facilmente degradabili per via naturale, come plastiche, fitofarmaci, solventi, fertilizzanti, ecc. Se prendiamo a titolo di esempio le sole acque di scarico prodotte quotidianamente da grandi città, siti industriali, attività agricole o da allevamenti di bestiame, nonostante tali emissioni vengano depurate in apposite strutture prima di essere reimmesse nell'ambiente, può capitare che nel lungo periodo a causa di guasti ed eventi non prevedibili, i composti tossici rilasciati si accumulino nell'ambiente.

Per porre rimedio e bonificare le diverse matrici ambientali, come terreni, acqua o aria, tra l'ampio spettro di metodologie utilizzate, si fa spesso ricorso a metodi chimico-fisici che, a fronte di risultati efficaci e veloci, sono costosi e poco sostenibili. Si vuole inoltre mettere in evidenza che tali processi possono generare a loro volta nuovi inquinanti. Tali processi di frequente si limitano alla semplice rimozione degli inquinanti dalla matrice contaminata e non alla loro effettiva degradazione. Infine, con questo approccio, si producono inevitabilmente nuovi rifiuti che necessitano di una opportuna collocazione.

In questo lavoro di tesi si tratterà il biorisanamento, ossia tutta una serie di applicazioni idonee a bioconcentrare, sequestrare, metabolizzare o rimuovere inquinanti dall'ambiente. Il termine biorisanamento viene descritto nell'enciclopedia Treccani con una definizione molto semplice: *'Rimozione di contaminanti dagli ambienti inquinati mediante processi di degradazione biologica'*. Le biotecnologie invece vengono definite come *'Tecnologie che controllano e modificano le attività biologiche degli esseri viventi per ottenere prodotti a livello industriale e scientifico'*.

L'impiego di biotecnologie e microorganismi per degradare composti organici da terreni contaminati sono studiate da oltre 50 anni, come ad esempio il biorisanamento *in-situ* o *ex-situ* per la rimozione di idrocarburi leggeri o gasoli. Tra le varie fonti significative di pressioni ambientali, anche l'industria petrolifera impatta sull'ambiente con il rilascio accidentale di composti tossici di vario tipo. Come vedremo, le metodologie di biorisanamento hanno dimostrato di potersi adattare a questo tipo di problemi, e si possono applicare alle diverse matrici ambientali, quali acque superficiali, acque sotterranee, aria e terreni, rilevandosi adeguate per degradare un ampio spettro di composti chimici inquinanti.

Visti i promettenti risultati del biorisanamento e la buona probabilità di riuscita per alcune classi di composti xenobiotici, la ricerca è molto attiva in questo settore; essa mira ad identificare nuovi microorganismi il cui metabolismo sia in grado di degradare composti organici, sequestrare metalli e altro ancora. L'applicazione delle biotecnologie spazia dallo studio e utilizzo dei microorganismi, ai processi che sfruttano o producono enzimi, come nelle fermentazioni industriali o nei trattamenti biologici dei classici impianti di depurazione. Inoltre, la ricerca è molto impegnata ad affrontare tecniche di biorisanamento di tipo 'molecolare' che puntano ad uno studio che scende sino al livello intracellulare. Queste applicazioni mirano alla caratterizzazione degli acidi nucleici contenuti in popolazioni microbiche che vivono in ambienti inquinati, al fine di comprendere i meccanismi che portano alla degradazione dei composti trovati nel sito. L'approccio molecolare permette quindi di studiare le caratteristiche di tali popolazioni indigene semplicemente effettuando la tracciatura genetica di un campione rappresentativo di popolazione microbica, senza la necessità di ricreare le colonie in laboratorio ed effettuare test in vitro. Il fine ultimo di questo tipo di studi è l'ingegnerizzazione dei microorganismi, per creare nuove specie che hanno specifiche caratteristiche e sono in grado di degradare composti *target*.

1.1 Motivazioni e scopo del lavoro

Nel presente lavoro di dottorato si è cercato di valutare metodologie di biorisanamento alternative a quelle già oggetto di studio dalla comunità scientifica, che siano di stampo biologico e a basso impatto ambientale. Si è cercato inoltre di creare una metodologia applicabile che, partendo da microorganismi naturali o loro miscele, fosse in grado di degradare inquinanti e microinquinanti prioritari per l'ambiente. Come si vedrà più nel dettaglio, si è deciso di affrontare il tema della degradazione di una particolare classe di microinquinanti, gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), utilizzando consorzi batterici e funghi della famiglia '*white rot*'. Questi microinquinanti persistono nell'ambiente perché molto stabili e difficilmente attaccabili dai microorganismi presenti in natura. Lo studio degli IPA è anche motivato dalle difficoltà incontrate sinora per la loro rimozione biologica, come emerge dall'attuale stato dell'arte. A tal riguardo, l'impiego di funghi della famiglia '*white rot*' e di particolari consorzi batterici, risulta invece una valida e concreta opportunità per la degradazione di molte molecole tossiche.

Un'altra parte del dottorato è stata dedicata allo studio delle capacità depurative delle microalghe. In particolare, sono state esplorate le potenzialità di tali microorganismi per processi di depurazione di macroinquinanti da matrici acquose. Le microalghe sono spesso utilizzate per scopi energetici e produzione di composti ad alto valore aggiunto; in questo lavoro di dottorato si è invece focalizzata l'attenzione sulla loro capacità di degradazione nei confronti di azoto e fosforo. Tali composti sono presenti in acque di scarico o nei processi di acquacoltura che possono essere depurate grazie alle microalghe. Questa alternativa è stata valutata realizzabile nel breve periodo, in termini di applicabilità e di risultati concreti. Si è quindi esplorata la capacità delle microalghe

di usare queste molecole come fonte di nutrimento e permetterne contestualmente la loro rimozione. Viste poi le capacità di adattamento a condizioni sfavorevoli mostrate da tali microorganismi, se ne sono testate le potenzialità con l'obiettivo di sostituire, o integrare, trattamenti tradizionali di depurazione di acque di scarico.

Un'altra importante motivazione è la forte convinzione che ad oggi la salvaguardia ambientale dovrebbe essere un obiettivo prioritario per il mondo industrializzato. Nonostante il diffondersi di una maggiore sensibilità verso le problematiche ambientali, che talvolta sono accompagnate da importanti interventi legislativi, queste azioni non sembrano ad oggi sufficienti per una maggiore tutela ambientale. A tal proposito tutti dovrebbero adoperarsi per affrontare queste tematiche in maniera attiva, a partire dalle istituzioni, dal mondo industriale e anche dalla comunità scientifica, nell'ottica di trovare soluzioni tecniche e nuove metodologie che mirano alla salute dell'ambiente e al suo ripristino.

1.2 Sviluppo della tesi

Lo sviluppo di questo lavoro di tesi è strutturato in cinque capitoli, di cui il presente ne introduce brevemente l'ambito di collocazione e lo scopo.

Nel *secondo capitolo* vi è una introduzione al biorisanamento, alle tecniche analitiche utilizzate e al metodo sperimentale applicato. Il capitolo riporta i fondamenti della spettrofotometria, della cromatografia liquida e gassosa e accenna alla spettrometria di massa. Vengono poi descritti i concetti base della fluidodinamica dei reattori, viene fatta una panoramica di carattere generale sul mondo dei microorganismi e si conclude con la descrizione dell'approccio matematico statistico utilizzato per le campagne sperimentali, il *Design of Experiments*, ossia la progettazione statistica degli esperimenti.

Nel *terzo capitolo* viene trattato il biorisanamento per mezzo dei funghi della famiglia *white rot*. Viene riportato lo stato dell'arte e una panoramica sulla biologia dei funghi e si introducono le prove sperimentali, che sono mirate alla tollerabilità e degradazione da parte di un particolare ceppo fungino nei confronti degli IPA selezionati. I dati raccolti sono elaborati con tecniche statistiche che sono discusse nel dettaglio, mostrando le buone potenzialità di tale microorganismo, il *Pleurotus sajor caju*, nella degradazione di questi composti inquinanti.

Nel *quarto capitolo* viene fatto il punto sulla letteratura relativa ai consorzi batterici e viene mostrata la loro efficacia nei processi di biorisanamento nei confronti degli IPA. Il capitolo descrive la progettazione delle campagne sperimentali, la loro esecuzione e come viene effettuata l'analisi dei dati raccolti durante le prove. Le conclusioni mettono in evidenza come il consorzio batterico selezionato e la metodologia utilizzata diano evidenze della degradazione dei composti policiclici selezionati.

Nel *quinto capitolo* si riporta lo stato dell'arte relativo alle microalghe e al loro utilizzo per la rimozione di inquinanti da effluenti liquidi inquinati da alti carichi di azoto e fosforo. Si descrivono gli esperimenti condotti in fotobioreattori sia su scala di laboratorio che su scala pilota. Tutti i dati raccolti vengono poi analizzati e integrati con le analisi chimiche per mostrare le potenzialità anche di questa classe di microorganismi, che principalmente vengono utilizzati per la produzione di biofuels, ma possono essere concretamente impiegati anche in altri campi.

Ne *sesto capitolo* vengono infine riportate le conclusioni di questo lavoro di dottorato, mettendo in risalto gli aspetti principali e di maggior interesse che sono emersi dalle varie campagne sperimentali. Particolare risalto verrà data agli effettivi risultati ottenuti che, grazie all'integrazione di analisi statistica e analisi di laboratorio, ha dato strumenti oggettivi per valutare i risultati conseguiti.

Nella parte finale di questa tesi vengono riportate delle appendici che contengono tutta una serie di grafici, curve di crescita, curve di correlazione e *trend* di consumo di inquinanti, che si è ritenuto opportuno separare dai capitoli di pertinenza per facilitare la lettura del documento. In queste appendici si dà la possibilità al lettore di vedere, almeno in parte, le informazioni che hanno permesso l'elaborazione dei molti dati acquisiti.

Capitolo 2

Introduzione, tecniche analitiche e metodo sperimentale

In questo capitolo si introducono il tema del biorisanamento, argomento fondamentale di questa tesi di Dottorato, le tecniche analitiche di analisi e infine il metodo sperimentale impiegato. Data la complessità e l'estensione degli argomenti trattati, è fatto un breve riepilogo dei concetti fondamentali utilizzati e sono presentati i riferimenti bibliografici di base per permettere gli opportuni approfondimenti.

2.1 Il biorisanamento

Con il termine biorisanamento si intende il risanamento, il ripristino e/o il recupero mediante processi biologici di ecosistemi o ambienti naturali, in precedenza inquinati da attività antropiche. I processi biologici sono noti da molto tempo, però il termine biorisanamento definisce una tecnologia che consente di cogliere risultati laddove i processi naturali non sono efficaci. Sinteticamente, il biorisanamento, identifica quei processi che impiegano i microorganismi quale unico mezzo per raggiungere gli obiettivi. In definitiva, con questa tecnologia, si cerca di ripristinare matrici quali terra, acqua e aria, in maniera ottimale e sostenibile per l'ambiente.

Infatti, la continua espansione delle applicazioni commerciali di prodotti chimici, da quelli a uso agricolo sino a quelli per la cura dell'uomo, determina la produzione di ingenti quantità di rifiuti spesso dannosi per l'ambiente. Molte tecniche di smaltimento che fino a pochi anni fa si pensavano risolutive, quali l'incenerimento e il conferimento in discarica, oggi si stanno dimostrando inefficienti, costose e provocano, talvolta, l'introduzione di nuovi inquinanti per l'ambiente, quali per esempio le diossine prodotte nel corso della combustione e i percolati derivanti dalle discariche. Il biorisanamento, invece, è un approccio molto promettente che viene già impiegato con successo in qualche caso di inquinamento. Il biorisanamento, in buona sostanza, sfrutta le capacità cataboliche dei microorganismi nei confronti di composti xenobiotici (Lebkowska *et al.*, 2011).

Grazie alla continua scoperta di specie microbiche nuove è sempre più resistenti ai composti xenobiotici, si possono compiere operazioni che prima non erano possibili. Si citano, a titolo di esempio, i batteri termofili estremi, che resistono a temperature quasi prossime al punto di ebollizione dell'acqua, ai batteri acidofili che resistono a pH acidi, i batteri basofili che di contro resistono a pH alcalini o i funghi anaerobici che vivono in assenza di ossigeno. Inoltre, recenti studi dimostrano come i microrganismi hanno le capacità di degradare un ampio spettro di composti recalcitranti alla biodegradazione. I composti che sono stati (e sono tuttora) oggetto di studio e degradabili biologicamente sono diversi, come gli organici alifatici clorurati, i carbammati, gli erbicidi, gli insetticidi, i composti organofosforati, i composti aromatici e aromatici condensati, le ammine aromatiche e i metalli pesanti (Mrozic *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2011; Chavez *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2007; Moscoso *et al.*, 2012). È importante rimarcare che i singoli ceppi

di microorganismi, ad esempio di alcuni batteri, sono in grado spesso di degradare uno specifico inquinante ma non riescono a degradarne una miscela della stessa famiglia, specialmente quando tali composti sono molto refrattari alla biodegradazione. Un esempio concreto di questi composti sono gli idrocarburi clorurati, i pesticidi, gli aromatici poli-condensati, i policlorobifenili, ecc. Per queste ragioni la ricerca si sta sempre più orientando verso lo studio dei consorzi batterici che stanno dando ottimi risultati se comparati con le singole specie (Moscoso *et al.*, 2012, Janbandhu *et al.*, 2011). Infatti quello che riesce a fare un singolo microorganismo può essere amplificato da più specie che producono differenti enzimi e possono dar luogo a co-metabolismi e meccanismi più complicati, che risultano vincenti nel caso di miscele di composti. La genetica e la biologia molecolare, inoltre, possono consentire di modificare i microrganismi per ottenere risultati che spaziano dalla degradazione di composti inquinanti alla produzione di *biofuels* a partire da cellulosa o emicellulosa.

Tra i diversi inquinanti persistenti derivanti dai processi industriali, in questo lavoro di tesi sono stati presi in considerazione principalmente gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA). Essi sono ricorrenti nei composti petroliferi, nel tar da carbone, ma si ottengono anche come sottoprodotti di combustioni incomplete di combustibili fossili. A causa della continua immissione nell'ambiente da parte dell'uomo, si è visto che nell'ultimo secolo la loro concentrazione nell'ambiente sta crescendo costantemente (Keith *et al.*, 1979; Simpson *et al.*, 1996; Connell *et al.*, 1998). Alcuni IPA sono cancerogeni e mutageni nei confronti di organismi viventi, migrano nei sedimenti acquiferi per via della loro insolubilità e vengono adsorbiti nel particolato (Boonchan *et al.*, 2000). Una importante fonte di IPA nell'ambiente è dovuta ai rifiuti industriali, in particolare quelli derivanti da processi di gassificazione e liquefazione di coke, carbone, incenerimento di rifiuti e altri prodotti derivanti dal petrolio (Cerniglia *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1989). Per via delle loro proprietà mutagene e cancerogene l'Agenzia della Protezione Ambientale Americana (EPA: *Environmental Protection Agency*) ha inserito sedici IPA in una lista di inquinanti prioritari, i cui principali vengono riportati in figura 2.1. È noto che all'aumentare del peso molecolare degli IPA, diminuisce la solubilità e tende ad aumentare la loro tossicità, come mostrato in figura 2.2, rendendo più difficoltosi i processi di biorisanamento (Adami *et al.*, 2000; Mersch-Sundermann *et al.*, 1992). Come naturale conseguenza di queste proprietà, gli IPA si depositano su terreni e sedimenti, rimanendo inalterati nell'ambiente per lunghissimi periodi di tempo. Inoltre, vista la loro natura lipofila, tendono a biomagnificarsi nell'ecosistema, a causa dell'accumulo delle sostanze tossiche negli esseri viventi, che aumenta all'aumentare del livello trofico.

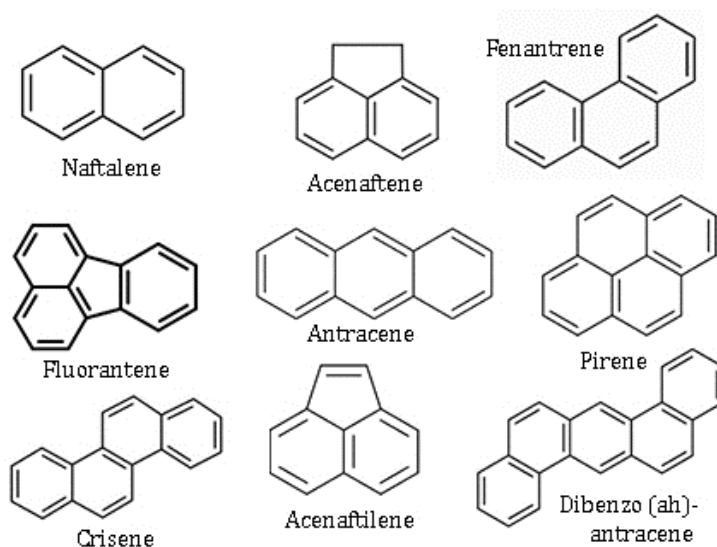


Figura 2.1: alcuni IPA considerati prioritari dall'EPA

Recalcitrance ↓	PAH	Solubility mg/l	Genotoxicity
	 Naphthalene	31.700	Toxic
	 Acenaphthene	3.900	+ Ames
	 Anthracene	0.070	Toxic
	 Phenanthrene	1.300	Toxic
	 Fluoranthene	0.260	Weak Carcinogen
	 Pyrene	0.140	± Ames
	 Benz[a]anthracene	0.002	+ Ames + Carcinogen
	 Benzo[a]pyrene	0.003	+ Ames + Carcinogen

Figura 2.2: alcuni IPA ordinati in scala di refrattarietà alla biodegradazione, attività genotossiche e solubilità.

Gli IPA con numero elevato di anelli condensati, allo stato dell'arte attuale, sembra che non siano metabolizzati dai microorganismi. Sono però stati scoperti degli enzimi fondamentali per la degradazione di tali molecole, quali la mono e di-ossigenasi (Gibson *et al.*, 1984; Wiseman *et al.*, 1982), che tramite processi di tipo ossidativo possono 'aprire' gli anelli aromatici di questa classe di composti. Molti microorganismi, come alcuni funghi che degradano la lignina per mezzo di enzimi (e.g. lignina perossidasi), sono in grado di degradare diversi composti xenobiotici, come sarà meglio discusso nei successivi capitoli. La degradazione è poi legata a molti fattori quali la composizione del suolo, la presenza di fonti di carbonio e nutrienti, oltre che alla presenza stessa nel suolo di microorganismi in grado di degradare tali composti.

Di seguito verranno riportati i principali dettagli degli IPA utilizzati durante le varie campagne sperimentali, informazioni tratte principalmente dalle schede di sicurezza dei vari produttori che li commercializzano per scopi analitici.

Fenantrene

Il fenantrene ($C_{14}H_{10}$) è costituito da tre anelli aromatici, con cinque possibili strutture di risonanza.

È affine all'Antracene, che ha la stessa formula bruta ma differente formula di struttura, di conseguenza i due composti costituiscono due isomeri. Allo stato puro, il FENANTRENE si presenta sotto forma di cristalli incolori o giallognoli, inodori,

con un peso specifico di poco più di 1 kg/dm³.

Il fenantrene presenta una *K-region*, zona ad alta densità elettronica, ed una *Bay region*, regione di recesso formata da una ramificazione nella sequenza di atomi degli anelli benzenici in grado di formare un epossido¹, che si sospetta essere carcinogeno. Pertanto, è utilizzato come modello per il substrato per studi sul catabolismo delle regioni Bay e K contenute in IPA cancerogeni come il Benzo[a]Pirene, Benzo[a]antracene, e crisene.

Il fenantrene si trova in alte concentrazioni in sedimenti contaminati da IPA, suoli superficiali e siti di rifiuti. La degradazione batterica del fenantrene è stata ampiamente studiata. Una varietà di ceppi batterici tra cui *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, la quale specie è presente anche nel consorzio batterico Bulab 5738 utilizzato in questo studio, e *Sphingomonas*, sono stati isolati e hanno la capacità di utilizzare il fenantrene come unica fonte di carbonio e di energia (Seo Jong-Su *et al.*, 2009).

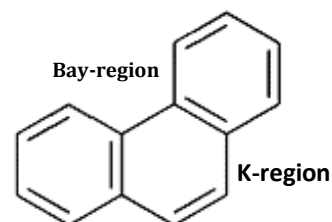


Figura 2.3 Formula di struttura del fenantrene.

Nomenclatura IUPAC	Fenantrene
Numero CAS	85-01-8
Formula molecolare	C ₁₄ H ₁₀
Peso molecolare	178.23 g/mol
Aspetto	Stato fisico: cristallino
	Colore: incolore o giallognolo
	Odore: inodore
Punto di ebollizione	339 °C a 760 mm Hg
Punto di fusione	99°C
Solubilità in acqua µg/l a 25 °C	1290
Solubilità in altri solventi	Etanolo
Simboli di rischio chimico	
Frasei H†	302, 410
Frasei P†	262, 272

Tabella 2.1: Principali caratteristiche del fenantrene

Pirene

Il pirene è una molecola appartenente agli idrocarburi policiclici aromatici costituito da quattro anelli benzenici (C₁₆H₁₀), che allo stato puro risulta inodore e si presenta sotto forma di cristalli incolori se puro. È poco solubile in acqua, ma solubile in solventi apolari come l'esano e ben solubilizzabile anche in altri solventi come metanolo o acetone. La formula di struttura è riportata in figura 2.4, e le principali caratteristiche sono riassunte in tabella 2.2. Di seguito verranno riportate le principali caratteristiche che reperibili in letteratura.

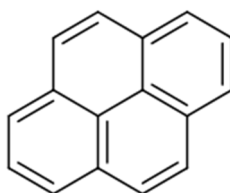


Figura 2.4: struttura molecolare del pirene

Proprietà chimiche: Il pirene reagisce con ossidi di azoto a formare nitroderivati, nonché con acido nitrico al 70%. In normali condizioni di laboratorio è stabile, così come sono stabili soluzioni in acqua, dimetilsolfossido, etanolo (95%) e acetone se tenute per 24 ore in normali condizioni di laboratorio. Sebbene non si conosca il suo punto di infiammabilità, si ritiene che il pirene sia combustibile. Allo stato solido in soluzione presenta una leggera fluorescenza bluastra. Non subisce fotoossidazione in

solventi organici se sotto luce fluorescente. Riscaldato fino a decomposizione, emette fumi con odore pungente.

Tossicinetica metabolismo: l'assorbimento del pirene può avvenire per via cutanea.

Genotossicità: in esperimenti sul DNA di *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* il pirene si è rivelato incapace di produrre mutazioni. Altre prove su genidi cellule batteriche hanno dato esito sia positivo che negativo, mentresu cellule di lievito ha prodotto solo un aumento dell'incidenzadi conversione dei geni in fase mitotica. Il pirene non ha indottoaumenti di mutazioni recessive letali legate al sesso in *Drosophila*. Risultati discordanti sono stati pure ottenuti da esperimenti condottisu cellule in vitro di mammiferi e esito negativo hanno datoiniezioni intraperitoneali del composto nel midollo osseo di topi (datiEPA).

Nomenclatura/sinonimi	Pirene, Benzo[def]fenantrene, beta-pirene
Numero CAS	129-00-0
Formula molecolare	C ₁₆ H ₁₀
Aspetto fisico	Cristalli prismatici monoclini, incolori se puri, giallo chiari se impuri (con tetracene)
Peso molecolare	202,25 g/mol
Punto di fusione	151 – 154 °C
Punto di ebollizione	390- 395°C a 760 mm Hg
Solubilità in acqua (mg/l a 25 °C)	0,135
Solubilità in altri solventi	(mg/ml a 22°C): dimetilsolfossido 5-10; etanolo (95%) < 1; acetone 50-100. E' solubile in toluene, bisolfuro di carbonio, etere di petrolio, etere e benzene. Completamente solubile nei solventi organici.
Simboli di rischio chimico	
Frasi H†	410
Consigli P††	273 - 501

Tabella 2.2: caratteristiche principali del pirene

Cancerogenicità: i dati sperimentali sulla cancerogenicità del pirene non sono conclusivi, non è classificabile come cancerogeno umano. Studi su animali hanno accertato che l'inalazione provoca: tossicità epatica, patologie polmonari, patologie intragastriche, neutropenia, leucopenia, anemia. Inoltre, il contatto con la pelle può causare: iperemia, perdita di peso, alterazioni ematopoietiche, dermatiti, effetti cronici, leucocitosi.

Tossicità acuta: l'esposizione umana a pirene può derivare sia da inalazione di aria contaminata, sia da consumo di cibo e acqua inquinata. Un'esposizione particolarmente elevata si ha con il fumo di sigaretta e con l'ingestione di cibi affumicati. Nei ratti l'inalazione di pirene ha causato danni epatici, polmonari e gastrici, mentre l'assorbimento cutaneo per 10 giorni ha prodotto iperemia, perdita di peso e anomalie ematopoietiche. Applicazioni cutanee per 30 giorni hanno inoltre prodotto dermatiti.

Tossicità cronica: In uno studio di 13 settimane maschi e femmine di topo sono stati trattati per intubazione gastrica con 0, 75, 125 o 250 mg/kg/giorno di pirene mescolato ad olio di mais. I parametri tossicologici considerati sono stati i seguenti: anomalie del peso corporeo, consumo di cibo, mortalità, segni patologici clinici di organi e tessuti e chimica del sangue e del siero. In alcuni animali di tutti i gruppi, compreso il gruppo di controllo, sono stati osservati casi di nefropatia, caratterizzata dalla presenza di focolai multipli di rigenerazione tubulo-renale, spesso accompagnata da infiltrazioni di linfociti interstiziali e/o da focolai di fibrosi interstiziale. Il peso relativo e assoluto dei reni si è rivelato ridotto negli animali trattati con la dose più alta. In base a questi risultati il NOAEL (no-observed-adverse-effect levels) è stato di 75[mg/kg/giorno] e il LOAEL (lowest-observed-adverse-effect levels) di 125 [mg/kg/giorno] (dati EPA).

Degradazione: il rilascio di pirene nell'ambiente è molto diffuso poiché questo composto è un prodotto comune di combustione incompleta. E' largamente associato a particolato, particelle di suolo e sedimenti. Sebbene le maggiori concentrazioni si abbiano nei pressi delle fonti di emissione, la sua presenza in luoghi anche molto distanti da esse indica che il pirene è piuttosto stabile nell'atmosfera e che è capace di essere trasportato a lunga distanza. Nell'aria può subire fotolisi diretta, sebbene l'adsorbimento al particolato possa apparentemente ritardare questo processo la sua emivita in fase di vapore dipende dalla sua reazione con gli altri inquinanti atmosferici: è di 0.67 giorni se reagisce con ozono e di 14 giorni se reagisce con biossido di azoto; se reagisce con radicali ossidrilici prodotti fotochimicamente, la sua emivita stimata è di 1,12 giorni. Liberato nell'acqua viene adsorbito molto fortemente dai sedimenti e dal particolato, si bioconcentra da leggermente a moderatamente negli organismi acquatici, ma non subisce idrolisi. Nei pressi della superficie delle acque può subire una significativa biodegradazione e una diretta fotolisi. Importante può essere anche l'evaporazione, in seguito alla quale l'emivita può variare da 4.8 a 39.2 giorni per un fiume o può essere di 1176giorni per uno stagno. L'adsorbimento ai sedimenti limita l'evaporazione. Se liberato nel suolo si ritiene venga fortemente adsorbito dalle particelle di terreno e per questo non dovrebbe lisciviare in misura apprezzabile nella falda, sebbene il suo rinvenimento in essa dimostra che può comunque raggiungerla. Si ritiene che non evapori né venga idrolizzato dal terreno ove può comunque biodegradarsi in buona parte.

Crisene

Il crisene è un IPA costituito da quattro anelli benzenici ($C_{18}H_{10}$), che allo stato puro risulta inodore e si presenta sotto forma di cristalli, da incolore al blu fluorescente, se puro. È poco solubile in acqua, ma solubile in solventi apolari come l'esano e ben solubilizzabile anche in altri solventi come metanolo o acetone. La formula di struttura è riportata in figura 2.5 e in tabella 2.3 sono riportate le principali caratteristiche chimico fisiche.

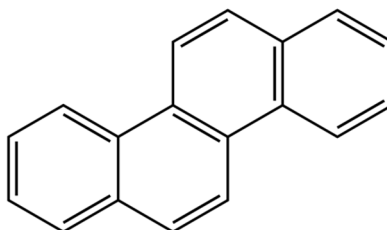


Figura 2.5: struttura molecolare del crisene

Proprietà chimiche: il crisene è molto stabile in condizioni normali di laboratorio.

Genotossicità: il crisene produce anomalie cromosomiche nelle cellule germinali di cavia e di topi dopo esposizione per intubazione, nonché esito positivo in prove batteriche di mutazione genetica e alterazioni in cellule di mammiferi esposte in coltura (dati EPA).

Cancerogenicità: non vi sono dati sufficienti di prove effettuate su animali per dimostrare gli effetti cancerogeni del crisene sull'uomo. Nei topi esso produce un aumento dell'incidenza di carcinomi e linfomi maligni a seguito di iniezioni intraperitoneali e carcinomi dermici per esposizione cutanea. Anche se la cancerogenicità del crisene sull'uomo non è stata confermata, esso rientra fra quei prodotti definiti cancerogeni come catrame di carbone, fuliggine, emissioni di cokeria e fumo di sigaretta (dati EPA).

Degradazione: il crisene è un composto facilmente rinvenibile associato al particolato, al suolo e ai sedimenti poiché si tratta di un prodotto che si forma a seguito di una combustione incompleta. Nel suolo sembra che venga adsorbito molto fortemente e non liscivi nelle acque sotterranee. Non si idrolizza o evapora in maniera apprezzabile dal suolo e può essere soggetto a biodegradazione. Nelle acque superficiali esso è soggetto a fotolisi con un'emivita media di 4.4 ore. Nell'aria il crisene subisce fotolisi diretta, anche se l'adsorbimento sul particolato può ritardare questo processo. L'emivita stimata del crisene nell'aria è di 1.25 ore.

Nomenclatura /sinonimi	1,2-Benzofenantrene; benzo[a]fenantrene; 1,2,5,6- dibenzonaftalene; 1,2-benzfenantrene.
Numero CAS	218-01-9
Formula molecolare	C ₁₈ H ₁₄
Aspettofisico	Scaglie ortorombiche bipiramidali, da incolore a blu fluorescenti. Può contenere tracce di tetracene, che non è facilmente separabile dal crisene.
Peso molecolare	228,28 g/mol
Punto di fusione	254 °C
Punto di ebollizione	448°C a 760 mm Hg
Solubilità in acqua (mg/l a 25 °C)	0,0018 mg/kg (insolubile)
Solubilità in altrisolventi	(mg/ml a 22 ° C): dimetilsolfossido 5-10; etanolo (95%) < 1; acetone 50-100. E' solubile in toluene, bisolfuro di carbonio, etere di petrolio, etere e benzene. Completamente solubile nei solventi organici.
Simboli di rischio chimico	
Frasi H†	341, 350, 410
Consigli P††	201 - 273 - 281 - 308-313 - 501

Tabella 2.3: caratteristiche principali del crisene

† Le frasi H (Hazard System) rappresentano indicazioni di caratteristiche di pericolo per sostanze chimiche e sono contenute nel Regolamento CE n. 1272/2008.

H350 – Può provocare il cancro, H341 – Sospettato di provocare alterazioni genetiche, H410 – Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

†† I cosiddetti 'consigli P' (Precautionary Statements) rappresentano i consigli di prudenza per le sostanze chimiche e sono contenuti nel Regolamento CE n. 1272/2008.

P201 – Procurarsi istruzioni specifiche prima dell'uso, P273 – Non disperdere nell'ambiente, P313 – Consultare un medico.

2.2 Tecniche analitiche

In seguito sono discusse le tecniche analitiche utilizzate in questo lavoro di dottorato. In particolare sono descritte le tecniche Colorimetriche, Spettrofotometriche, Cromatografiche, oltre a brevi cenni sulla Spettrometria di Massa.

2.2.1 Spettrofotometria

La Spettrofotometria è la scienza che studia gli spettri elettromagnetici e utilizza degli strumenti, detti spettrofotometri, per misurare l'intensità luminosa (Gore M., 2000). La colorimetria e la fotometria utilizzano strumenti capaci di misurare la qualità di luce assorbita o trasmessa dopo il passaggio attraverso una soluzione. Nella colorimetria si usa la luce bianca come sorgente luminosa e l'occhio umano come strumento rilevatore. Le soluzioni devono essere necessariamente colorate (colorimetri comparatori e colorimetro di Dubosq). Nella fotometria, invece, si utilizzano radiazioni il più possibile monocromatiche e una cellula fotoelettrica come strumento rilevatore. Secondo lo strumento usato si può lavorare nel campo visibile, nell'ultra violetto (UV), o nell'infrarosso (IR). Noi ci limiteremo a vedere una particolare applicazione di questa materia, relativamente a misure in campi di luce UV e Visibile tramite l'ausilio di strumentazione dedicata, gli spettrofotometri. Questi strumenti sono stati utilizzati principalmente per analisi di tipo colorimetrico e per la misura indiretta di popolazioni microbiche, quali consorzi batterici e microalghe.

Lo spettrofotometro può essere semplificato con il seguente schema logico, che indica anche i componenti fondamentali da cui è costituito (figura 2.6):

- ✚ una sorgente luminosa, ossia una lampada che emette radiazioni nell'intervallo spettrale di misura che può essere UV, Visibile o IR;
- ✚ un monocromatore, che seleziona e lascia passare la lunghezza d'onda impostata dall'operatore e disperde le altre;
- ✚ un compartimento in cui è posta una cella che contiene il campione da analizzare;
- ✚ un rivelatore, che trasforma l'intensità della radiazione giunta ad esso in un segnale elettrico che è sempre elaborato per fornire i valori delle misure di assorbimento.

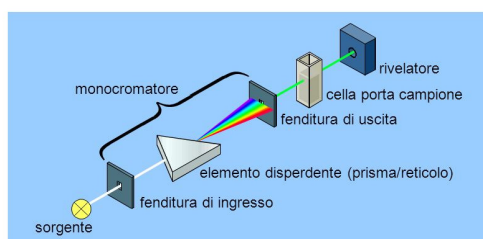


Figura 2.6: schema logico di uno spettrofotometro

Il principio di funzionamento si basa sulla legge di *Lambert e Beer* (Douglas *et al*, 2009), la quale fa riferimento a radiazioni monocromatiche e a soluzioni diluite. Si trova che l'assorbanza (A) è direttamente proporzionale alla concentrazione (c) della soluzione in esame, al coefficiente di assorbimento (ϵ) e alla lunghezza del cammino ottico (l) attraverso la specie assorbente, come correlato dalla seguente equazione:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Definendo ora la trasmittanza Tr come il rapporto tra la luce trasmessa (I) e la luce incidente (I_0):

$$Tr = \frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon \cdot c \cdot l}$$

l'assorbanza o densità ottica (OD) può essere riscritta come:

$$A = \log \left(\frac{1}{Tr} \right)$$

La relazione tra assorbanza e trasmittanza è legata da una relazione non lineare dovuta al logaritmo e come risultato si ha che l'assorbanza assume valori alti tanto più la trasmittanza è bassa, ossia quanto più il rapporto tra luce trasmessa e luce incidente è basso.

Un utilizzo classico della spettrofotometria è quello di sfruttare le proprietà di alcuni composti di assorbire determinate lunghezze d'onda per via della loro particolare formula di struttura. In particolare si cita l'esempio dell'analisi colorimetrica impiegata per la ricerca dell'urea su campioni ottenuti da delle campagne sperimentali condotte con microalghe. Il principio della metodica analitica si basa sull'utilizzo di opportuni reagenti chimici che sono in grado di formare composti 'colorati', in questo caso in presenza di urea. Questi composti hanno la caratteristica di assorbire luce nello spettro UV-Visibile e sfruttando la legge di Lambert e Beer, si risale alla concentrazione di soluzioni incognite. Naturalmente prima delle analisi si dovrà procedere alla calibrazione dello strumento con soluzioni a titolo noto, che vengono preparate *ad hoc*.

Come accennato, la spettrofotometria è stata utilizzata anche per la valutazione della crescita microbica in diversi esperimenti. Si vogliono inoltre citare anche altri metodi impiegati per la misura di popolazioni microbiche, che si possono dividere in due grandi categorie: metodi diretti ed indiretti.

I metodi diretti sono volti alla conta del numero di batteri totali, o di quelli vitali, o alla determinazione della massa cellulare, metodi tra i quali si possono citare:

-  conteggio delle cellule totali tramite esame microscopico;
-  conteggio delle cellule totali mediante contatore *coulter*;

-  conteggio delle cellule vitali tramite, con il conteggio delle *Unità Formanti Colonia* (UFC);
-  Determinazione della massa cellulare tramite misura del peso secco.

I metodi appartenenti alla seconda categoria, invece, quantificano i microorganismi in base alla determinazione della torbidità di sospensioni liquide contenente una discreta quantità di biomassa. Si può inoltre eseguire la titolazione di specifici componenti cellulari (carbonio, azoto, proteine, ATP, acidi nucleici), presenti in quantità costante in ogni singola cellula.

Per monitorare sia la crescita algale sia quella dei consorzi batterici si è proceduto in due modi, ossia con misure di torbidità a determinate lunghezze d'onda (metodo indiretto), e con misure di biomassa tramite l'analisi del peso secco (metodo diretto), che però esula dalla spettrofotometria.

La spettrofotometria e quindi le letture di torbidità meglio si presta ad effettuare misure di popolazioni con cellule singole, come batteri e microalghe. Qualche difficoltà maggiore si è incontrata con i funghi utilizzati, per via della loro struttura filamentosa, che da problemi di ripetibilità nelle letture spettrofotometriche. Il problema delle cellule filamentose può comunque essere risolto con l'omogeneizzazione e la diluizione della sospensione microbica prima della lettura spettrofotometrica (Morris e Nicholls, 1978; Meletiadis, 2001).

2.2.2 Cromatografia liquida e gassosa

La cromatografia è un metodo di separazione di tipo chimico-fisico che sfrutta la tendenza delle diverse sostanze a distribuirsi secondo determinate proporzioni tra fasi distinte e separate, solitamente un solido e un liquido o un liquido e un gas. In questa tecnica una fase è solitamente tenuta fissa, mentre l'altra è mobile; a seconda poi del meccanismo utilizzato può prendere diversi nomi, ma di base viene sempre definita cromatografia. Il nome deriva dalle prime applicazioni, che sono state condotte nei primi del '900, dove erano separati composti aventi colorazioni diverse.

Negli anni le tecnologie si sono molto evolute, grazie anche allo sviluppo dell'elettronica e dell'informatica. Attualmente le tecniche più utilizzate sono la Gas Cromatografia e la Cromatografia Liquida. I principi chimico-fisici su cui si basano entrambe le tecniche possono essere l'adsorbimento, la ripartizione, lo scambio ionico o altro ancora. Tutte le tecniche comunque si basano sulla presenza di una fase fissa che esercita un'azione selettiva sui composti che vengono trasportati da una fase mobile che li contiene.

La Cromatografia Liquida ad Alte Prestazioni (HPLC) basata su fenomeni di adsorbimento e ripartizione, permette di compiere separazioni impossibili da ottenere con la classica Cromatografia Liquida, come la cromatografia su strato sottile. Una delle caratteristiche principali è la presenza di fasi stazionarie con granulometrie molto fini e

ad alta superficie di scambio che richiedono elevate pressioni per ottenere risultati in tempi accettabili. La seconda caratteristica che la distingue è l'utilizzo di una fase mobile liquida a temperature prossime a quella ambiente (solitamente 25-40 °C), che permette di analizzare composti termolabili, senza quindi modificarne la struttura.

Lo schema di principio di un HPLC può essere descritto come segue: il flusso logico parte da un solvente (1), che viene spinto da una pompa ad alte pressioni (2), che può superare le 600 atmosfere di pressione e serve a spingere il solvente verso il circuito, a sua volta costituito da un sistema di iniezione (4) che introduce nel *loop* il campione da analizzare, solitamente pochi μl mediante iniezione con siringa. Infine il campione dopo aver attraversato la pre-colonna (5) e la colonna capillare (7), passa attraverso il rivelatore (9). Un sistema di elaborazione (10), ormai sempre presente, registra il segnale e solitamente con un software dedicato si ha la possibilità di elaborare i risultati e ottenere analisi di tipo quali-quantitative. In figura 2.7 è riportato uno schema molto semplicistico di un HPLC 'tipo' e le componenti principali appena citate.

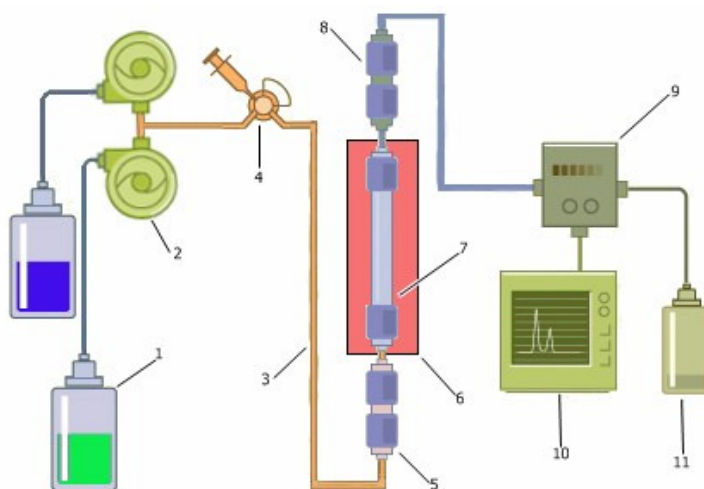


Figura 2.7: schema sistema HPLC

Nella cromatografia liquida l'impaccamento delle colonne cromatografiche è solitamente poroso, racchiuso in colonne capillari di pochi centimetri, i cui granuli hanno diametri dell'ordine dei micrometri. Questa fase è solitamente depositata su materiali inerti e nelle colonne più costose è legata chimicamente per evitare trascinamenti da parte del solvente. La fase mobile invece deve avere particolari requisiti, come poter solubilizzare le sostanze da analizzare, avere un elevato grado di purezza e non dare interferenza con il sistema di rilevazione, che solitamente è costituito da un sistema basato su assorbimento di luce a predefinite lunghezze d'onda, come ad esempio un DAD (*Diode Array Detector*).

La Cromatografia a Scambio Ionico fa sempre parte dell'analisi Cromatografica Liquida ad Alte Prestazioni, però ha come caratteristica di base una fase mobile costituita da soluzioni acquose di tipo ionico. La fase fissa è invece formata da resine scambiatrici, che presentano gruppi funzionali che possono scambiare ioni con la fase mobile che la attraversa. Le resine possono esser cationiche o anioniche, in base al tipo di ioni (positivi o negativi) che devono catturare. Lo schema logico è praticamente identico a quello mostrato in figura 2.7, però sostanzialmente varia il tipo di colonna e il rilevatore.

La resina scambiatrice di ioni, è solitamente contenuta in particolari colonne capillari costruite in materiali plastici per evitare corrosioni. La colonna viene imbevuta da opportuno solvente che dipende dal tipo di analisi da effettuare e poi viene fatta passare la miscela da separare. La resina scambierà i propri ioni con quelli che la attraversano in maniera selettiva. Ad esempio in soluzioni diluite e a temperatura ambiente vengono trattenuti maggiormente cationi a numero atomico più elevato. Gli ioni a più alto potenziale di scambio vengono trattenuti maggiormente nella parte iniziale della colonna, mentre gli altri verranno trattenuti nelle parti successive. Con la successiva introduzione dell'eluente, che è solitamente una soluzione leggermente acida o basica, gli ioni verranno eluiti con una velocità che è inversamente proporzionale al loro potenziale di scambio. La soluzione che eluisce dalla colonna viene poi mandata in un rilevatore che è in grado di dare un segnale proporzionale alla concentrazione dei composti. Un elaboratore elettronico genererà un cromatogramma con i picchi delle sostanze separate. In questo caso il rilevatore può essere di tipo potenziometrico e genererà infine un segnale elettrico proporzionale alla concentrazione degli ioni che lo attraversano.

Relativamente a queste sezioni si può dire che nel corso di questo lavoro di tesi si è fatto utilizzo di sistemi HPLC classici per l'analisi di composti organici, abbinati a rilevatori a serie di diodi (DAD), che permettono anche di ottenere spettri UV tridimensionali e confrontare i composti ottenuti con librerie di spettri di composti noti. Si sono inoltre utilizzati cromatografi ionici per analisi di anioni e cationi in soluzioni di acque di mare, come verrà scritto nel dettaglio successivamente.

Passiamo ora a parlare brevemente della Gascromatografia, che forse è la tecnica analitica strumentale più utilizzata oggi, perché riesce a dare risultati su diversi settori analitici.

In questo caso la fase mobile è un gas inerte, detto gas di trasporto o *carrier*, che percorre la colonna cromatografica trasportando i componenti da separare. Il campione viene vaporizzato in un iniettore che scalda la miscela e la immette nella colonna capillare. La gascromatografia lavora principalmente per ripartizione e la fase fissa è solitamente un liquido a bassa tensione di vapore che impregna un supporto inerte (spesso la fase liquida è legata a tale supporto chimicamente, come per l'HPLC). In figura 2.8 viene riportato a titolo di esempio uno schema logico di un sistema Gascromatografico.

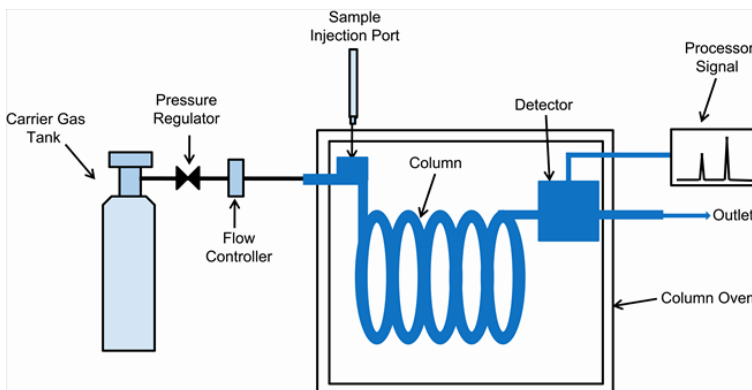


Figura 2.8: schema sistema gas cromatografico

I composti, successivamente, in base alle loro affinità con la fase fissa, percorreranno la colonna più o meno velocemente uscendo separati e infine attraversando un rilevatore che ha il compito di fornire un segnale il più possibile proporzionale alla concentrazione dei vari composti eluiti. Le colonne sono ormai tutte di tipo capillare, la cui composizione e la lunghezza, variabile dai 10 ai 100m, varia a seconda delle applicazioni. Le colonne cromatografiche per questo tipo di tecnica analitica, sono avvolte a spirale e vengono costantemente tenute sotto flusso di un *carrier* come azoto, elio, ecc., e sono posizionate dentro il forno del gascromatografo, che permette di ottenere rampe di temperatura controllate per accelerare i tempi di separazione. Per analisi di composti semivolatili come gli IPA il forno del gascromatografo può raggiungere temperature di oltre 340 °C in pochi minuti, permettendo, grazie anche alle basse pressioni di lavoro, di separare miscele complesse di composti a peso molecolare che varia tra i 35 sino ai 450 amu (Unità di Massa Atomica). Anche l'iniettore riveste un ruolo fondamentale nel gascromatografo; questo è posto poco prima della colonna capillare e ha il compito di iniettare e vaporizzare la miscela da analizzare, che solitamente è iniettata in volumi di pochi microlitri (μL). I rilevatori che si possono abbinare sono di diversi tipi in funzione delle analisi da condurre e spaziano da rilevatori termocoduttivi, rilevatori a ionizzazione di fiamma (FID), a cattura di elettroni (ECD), ecc. Un particolare tipo di rilevatore molto performante è lo spettrometro di massa, che verrà descritto nel prossimo paragrafo.

2.2.3 Spettrometria di massa

Le capacità di analisi della spettrometria di massa, hanno portato questa tecnica analitica a superare di gran lunga le altre tecniche analitiche citate in termini di sensibilità, limiti di rilevazione, velocità, quantità di analita necessario per le prove e spettro di adattabilità (de Hoffman *et al*, 2007). La spettrometria di massa è attualmente utilizzata in più campi della chimica analitica, come controlli sull'inquinamento ambientale, controlli sugli alimenti, scienze forensi, monitoraggio di processo, ecc.

Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è la produzione in fase gassosa di composti ionizzati, con diversi sistemi, uno dei quali è la ionizzazione elettronica, giusto per fare un esempio. Una molecola, definita M , soggetta ad un flusso di elettroni, genererà uno ione molecolare radicalico:

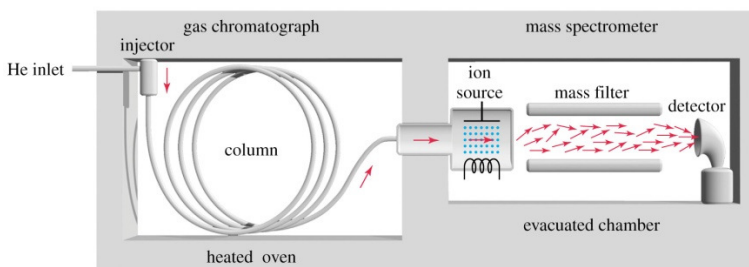
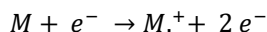


Figura 2.9: schema di un sistema gas cromatografico abbinato ad un rivelatore a spettrometro di massa

Lo ione molecolare formato, viene in genere ulteriormente frammentato quando investito da un fascio di elettroni. È importante notare che si generano degli ioni radicalici positivi con un numero dispari di elettroni, che posseggono delle caratteristiche molto particolari. Lo spettrometro di massa è in grado di separare questi ioni molecolari formati in base al loro rapporto massa-carica (m/z). Si può quindi creare un grafico con le abbondanze degli ioni generati in base a questo rapporto e alla loro abbondanza. Si ricorda che l'abbondanza di uno ione rappresenta la quantità relativa rilevata dallo spettrometro, rispetto allo ione più abbondante. La maggior parte degli ioni positivi hanno un rapporto massa-carica che deriva dalla perdita di un solo elettrone.

Lo spettrometro di massa lavora sempre in condizioni di alto vuoto per evitare il più possibile collisioni con altre molecole gassose durante il tragitto con il rivelatore. Questo comporta l'utilizzo di sistemi che riescano a far passare i campioni, dalla pressione atmosferica a pressioni bassissime, che sono dell'ordine di 10^{-10} Torricelli, con l'ausilio di pompe da vuoto di tipo meccanico, accoppiate a pompe per alto vuoto, dette anche turbo-molecolari.

La spettrometria di massa è solitamente abbinata ad altre tecniche analitiche, come ad esempio la gas cromatografia o la cromatografia liquida. Questo accoppiamento permette di separare i composti presenti nel campione, grazie alle tecniche cromatografiche e, successivamente, il rivelatore a spettrometro di massa identifica e quantifica i composti separati. Sistemi ancora più complessi abbinano due spettrometri di massa in tandem per andare a formare sistemi cosiddetti a triplo quadrupolo, che

garantiscono altissimi livelli di affidabilità per analisi di composti organici come pesticidi, IPA, PCB e tanto altro ancora.

A titolo esemplificativo, in figura 2.10, viene riportato lo spettro di massa del Toluene, per una sorgente ionica che lavora a ionizzazione elettronica. Lo spettro generato contiene in ordinata le abbondanze relative dei frammenti aventi massa su carica indicata nell'ascissa. Grazie alla presenza di database contenenti gli spettri di massa di decine di migliaia di composti, come le librerie spettrali NIST ad esempio, è possibile confrontare gli spettri di massa dei composti analizzati con quelli noti, ottenuti in condizioni standardizzate, per riconoscere con facilità molecole presenti in campioni incogniti.

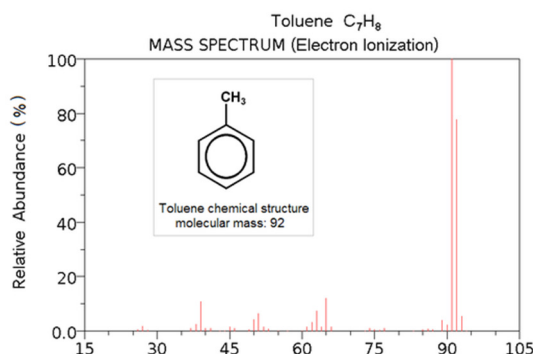


Figura 2.10: spettro di massa del Toluene (ionizzazione elettronica)

2.3 Distribuzione dei tempi di permanenza

Con lo scopo di valutare il comportamento fluidodinamico dei reattori utilizzati per le varie prove di crescita, che saranno illustrate nel dettaglio nei prossimi capitoli, con particolare riferimento ai reattori utilizzati per la crescita algale e dei consorzi batterici, si fa un breve accenno alla fluidodinamica dei reattori e alla definizione della distribuzione dei tempi di permanenza.

I reattori a mescolamento perfetto (*CSTR*) e a flusso a pistone (*Plug Flow*) descrivono idealmente due condizioni fluidodinamiche opposte, ossia il mescolamento perfetto e il flusso a pistone. Il reattore con *flusso a pistone* è caratterizzato dal fatto che il moto dei fluidi attraverso il reattore è ordinato in modo tale che si può avere mescolamento radiale del fluido senza che vi sia mescolamento o diffusione nella direzione del moto. Condizione necessaria e sufficiente perché si abbia flusso a pistone è che il tempo di permanenza nel reattore sia lo stesso per tutti gli elementi fluidi. Per contro il reattore a *mescolamento perfetto*, invece, come suggerisce il nome stesso, è un reattore il cui contenuto è mescolato completamente e il valore di ciascun parametro termodinamico è uniforme in tutto il reattore: pertanto la corrente uscente da questo reattore ha la

stessa composizione del fluido all'interno (Levenspiel, 1999). Tali tipi di reattori sono illustrati schematicamente nella figura 2.11.

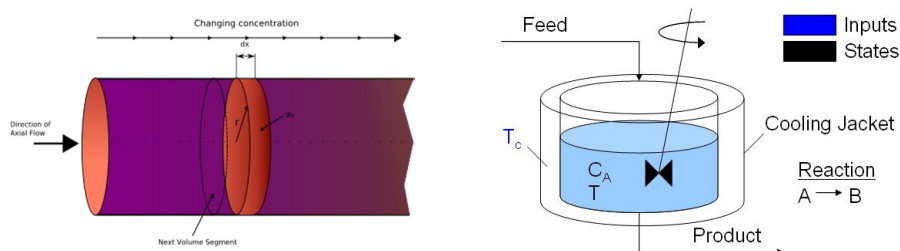


Figura 2.11: sulla sinistra, reattore PFR e sulla destra, reattore CSTR

I reattori reali in certe condizioni possono avvicinarsi molto all'idealità, ma in altri casi lo scostamento può essere considerevole. Questa deviazione può essere provocata dalla formazione di cammini preferenziali, dal ricircolo dei fluidi o dallo stabilirsi di zone stagnanti nei recipienti. In figura 2.12 sono riportati degli esempi.

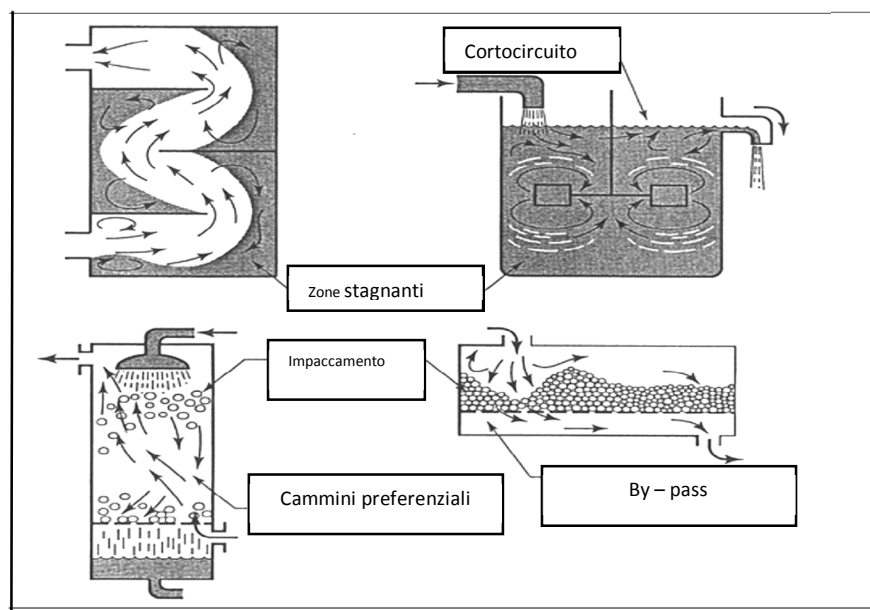


Figura 2.12: schematizzazione dei principali scostamenti dall'idealità per diversi tipi di reattori

Queste situazioni devono essere evitate perché possono dar luogo all'abbassamento delle prestazioni del reattore e solitamente si verificano nel passaggio di scala (*scale-up*), cioè quando si passa da apparecchiature pilota o di laboratorio, ad apparecchiature per produzione su larga scala.

Nello studio della fluidodinamica mirata ai fini della progettazione a seconda degli scopi, si può trascurare la completa comprensione dei campi di velocità all'interno del reattore e ci si può 'accontentare' di conoscere il tempo che le singole particelle trascorrono nel reattore, o più precisamente la distribuzione dei tempi di permanenza del fluido che l'attraversa. Questi dati possono essere facilmente ottenuti con delle prove di tipo *stimolo-risposta*, che permettono di costruire le curve della distribuzione dei tempi di permanenza. E' evidente che elementi di fluido che percorrono cammini diversi nel reattore possano impiegare tempi diversi per attraversare lo stesso; la distribuzione di questi tempi per la corrente fluida in uscita è definita *distribuzione dei tempi di permanenza* (RTD, *Residence Time Distribution*) o *Distribuzione dell'età in uscita* 'E'.

Per la caratterizzazione della fluidodinamica della fase liquida sono state condotte prove stimolo risposta di tipo impulsivo, iniettando una soluzione di *KCl* 3 molare come stimolo e misurando la conduttanza della corrente uscente dal reattore come risposta. Tali prove hanno permesso di correlare la conduttanza della soluzione in uscita dal reattore in funzione del tempo, per diversi valori delle portate di liquido e per diverse velocità di agitazione.

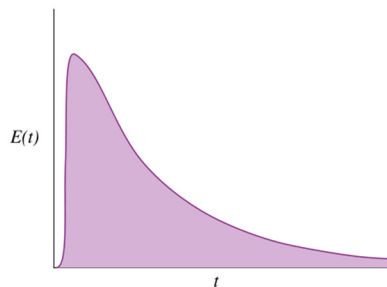


Figura 2.13: tipico andamento per una curva RTD in un reattore CSTR

Dalle letture effettuate con il conduttimetro sulla corrente in uscita dal reattore durante le prove è dunque stato possibile costruire le curve RTD e confrontarle con le curve teoriche relative ad un comportamento ideale di flusso CST. Per ricavare le curve teoriche si è eseguito un bilancio di materia, supponendo di iniettare il tracciante al tempo t_0 e considerando una concentrazione iniziale C_0 , ottenendo l'equazione di bilancio 2.1:

$$0 - F \cdot C + 0 = V \cdot \frac{\partial C}{\partial t} \quad (2.1)$$

In eq. 2.1 il termine V rappresenta il volume del reattore e F la portata volumetrica della corrente in ingresso. Integrando l'equazione 2.1 con la condizione iniziale, per t_0 e $C=C_0$, si ottiene l'equazione 2.2.

$$C(t) = C_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (2.2)$$

Il termine $\tau = V/F$ è il tempo medio di permanenza nel reattore. Maggiori dettagli sui reattori utilizzati verranno trattati nel capitolo dedicato alle microalghe, dove si descriveranno dettagliatamente i fotobioreattori utilizzati per le prove.

2.4 Generalità sui microorganismi

Gli organismi viventi che hanno un diametro inferiore a 0,1 mm non sono visibili ad occhio nudo, ma solo attraverso l'uso del microscopio e perciò vengono considerati microrganismi. Questi minuscoli esseri viventi sono estremamente diffusi in natura: li troviamo infatti nell'ambiente, nel terreno, nelle acque, nell'aria, negli alimenti e anche negli animali e nelle piante. Sono detti anche microbi o germi, si mostrano in varie forme e con diverse proprietà, molti sono formati da singole cellule, come batteri e lieviti, altri da molte cellule (pluricellulari: es. muffe) e altri ancora, come i virus, non hanno un vero aspetto cellulare. La maggior parte dei microbi esplica le proprie funzioni vitali in presenza di ossigeno libero e sono perciò denominati aerobi, mentre quelli che non ne necessitano sono definiti anaerobi. Altri microrganismi invece possono vivere in entrambe le condizioni e sono allora definiti aerobi facoltativi, o viceversa, anaerobi facoltativi.

La classificazione dei microrganismi può essere compiuta in funzione di vari parametri tra cui: condizioni operative, metabolismo e la natura degli stessi. Un organismo per svolgere le sue funzioni e riprodursi necessita di:

-  sorgente di energia;
-  carbonio per la sintesi di nuova materia cellulare;
-  nutrienti.

Per esempio i batteri autotrofi crescono meno velocemente perché la trasformazione di CO_2 in tessuto cellulare richiede più energia. L'energia richiesta per la sintesi cellulare può essere fornita dalla luce o da una reazione di ossidazione chimica. Quelli che usano la luce sono chiamati fotosintetici, quelli che usano le reazioni chimiche chemiosintetici. Lo scopritore del mondo microbico fu lo scienziato Antony van Leeuwenhoek (1632-1723), che perfezionò i primi microscopi semplici. La scoperta che gli conferì notorietà, nel 1677, fu la scoperta microrganismi detti allora *animalcules* o *little animals*. Leeuwenhoek descrisse per primo i protozoi e le alghe presenti nell'acqua, i lieviti del pane e della birra, ponendo in risalto la varietà e l'abbondanza dei microrganismi

nell'ambiente (Lanciotti, 1996). Nel 1969 Robert H. Wittaker stabilì una classificazione degli esseri viventi in cinque regni, che tuttora è ritenuta tra le migliori e viene suddivisa in mondo Vegetale, Animale, Protisti, Funghi e Monere.

2.5 Modellazione della crescita microbica

Poiché l'obiettivo principale delle prove di crescita effettuate, che verranno successivamente trattate nel dettaglio, è l'ottenimento dei parametri caratteristici della crescita dei microorganismi, si è stabilito di modellare le curve di crescita con equazioni non lineari di tipo empirico, definite anche 'biologiche', che hanno una forma di tipo sigmoidale.

Si è scelto di non impiegare un approccio di tipo statistico che avrebbe portato comunque a efficaci previsioni con delle semplici equazioni *polinomiali*, i cui parametri però, non avrebbero avuto alcun significato fisico o biologico (Richards, 1969). Il tipo di approccio scelto, quello di impiegare equazioni 'biologiche', permette di ottenere modelli con parametri che hanno un significato di tipo fisico e/o biologico, come ad esempio la velocità di crescita dei microorganismi.

Tra le varie equazioni utilizzate per modellare matematicamente la crescita microbica, le più utilizzate sono l'equazione Logistica e l'equazione di Gompertz (Seber *et al*, 2003). Queste due equazioni, per via della loro particolare costruzione e la presenza di almeno tre parametri, permettono di seguire l'andamento delle diverse fasi di crescita di una popolazione microbica: fase di latenza (*lag*), fase di crescita esponenziale e fase stazionaria. Queste classi di equazioni sono state utilizzate anche in altri campi delle scienze, come ad esempio quello veterinario ed agricolo, per monitorare la crescita di popolazioni di capi d'allevamento.

Tra le due equazioni citate si è scelta l'equazione di Gompertz (equazione 2.3) perché meglio rappresentava i punti sperimentali in termini di deviazione standard dell'errore S (equazione 2.4) nei vari esperimenti valutati.

$$\frac{dA}{dt} = \mu \cdot A(\log A_{\infty} - \log A) \quad (2.3)$$

$$S = \sqrt{\frac{SSE}{N - P}} \quad (2.4)$$

L'equazione 2.3, così scritta, indica il *rateo* di crescita di una popolazione (variazione della popolazione/variazione del tempo) ed è stata utilizzata per ottenere i parametri biologici velocità di crescita, tempo di acclimatazione e popolazione a saturazione. I

parametri del modello di Gompertz sono stati stimati a partire dai dati sperimentali sfruttando le librerie di regressione non lineare presenti in Matlab®. L'algoritmo utilizzato dal software è il noto *Levenberg-Marquardt*, che garantisce buona la convergenza anche dove il più semplice algoritmo di *Gauss-Newton* fallisce. Un esempio di confronto tra dati sperimentali e modello stimato di Gompertz, con relative iperboli fiduciarie al 95%, è riportato in figura 2.14, per misure di densità ottica di una prova di crescita algale condotta in un fotobioreattore da 120 litri contenente *Nannochloropsis oculata* esposta ad un carico di azoto e fosforo da degradare.

Un altro pregio dell'equazione di Gompertz è che ammette soluzione analitica. L'equazione 2.3 riportata nella forma differenziale, è stata quindi risolta analiticamente e modificata inserendo una costante aggiuntiva che ha permesso di valutare il tempo di latenza (λ) la popolazione al tempo iniziale (A_0 , che comunque essendo nota è stata inserita come dato noto nell'equazione). L'equazione 2.5, con le opportune modifiche e utilizzata nel programma di regressione appositamente sviluppato è riportata di seguito:

$$y = A_0 + (A_\infty - A_0) \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{e^{\mu+1}}{A_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (2.5)$$

In equazione 2.5 il termine 'y' rappresenta la popolazione microbica, 'A₀' indica la popolazione al tempo iniziale, 'A_∞' indica la popolazione al valore di saturazione (*plateau*), 'λ' rappresenta il tempo di acclimatazione e infine 't' esprime il tempo. Dai punti sperimentali è possibile quindi ottenere i quattro parametri di crescita desiderati, anche se il parametro A₀ viene solitamente fissato, visto che è noto.

Come si può vedere nella figura 2.14, la curva di regressione segue molto bene i punti sperimentali e gli intervalli di confidenza della previsione mostrano come l'eventuale errore di stima sia molto limitato, soprattutto nella fase esponenziale, che è quella di maggiore interesse per la stima della velocità di crescita. Questi risultati hanno incoraggiato l'uso del modello di Gompertz per tutte le curve di crescita ottenute, senza andare a considerare equazioni o modelli più complessi. Tutti i dettagli delle prove di crescita, delle condizioni sperimentali e delle statistiche calcolate (relative alle regressioni) per ogni esperimento condotto, saranno riportati nei successivi capitoli e parte nelle appendici.

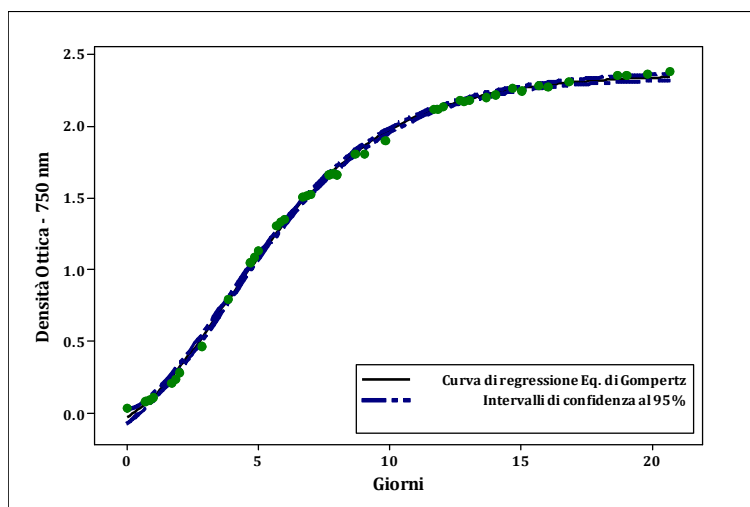


Figura 2.14: punti sperimentali e curva di regressione; crescita algale in fotobioreattori

2.6 Design of Experiments

L'approccio del *Design of Experiment* (DoE), ossia la progettazione statistica degli esperimenti, cerca di migliorare un generico processo nell'ottica di renderlo più robusto anche rispetto alle variabili di disturbo, orientandolo nella direzione voluta. Solitamente questo si traduce nelle esigenze di migliorare la produzione, ridurre i costi ed aumentarne l'efficienza. Con riferimento alla figura 2.15, si può vedere un processo, vi sono le variabili di input che lo influenzano, delle risposte di output misurabili e contiene altri fattori controllabili e non controllabili che influiscono sul processo stesso. Il DoE è mirato alla raccolta di dati appropriati e idonei all'analisi con metodologie statistiche che permettono di giungere a conclusioni valide e oggettive.

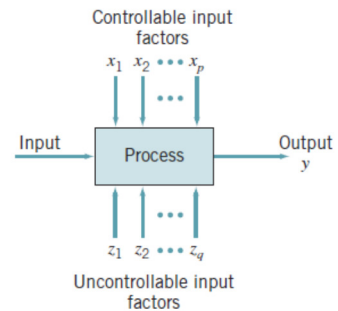


Figura 2.15: schema a blocchi generico processo

I passaggi fondamentali per applicare la pianificazione statistica degli esperimenti, seguendo la metodologia suggerita e adottata da Montgomery (2013), sono riportati di seguito:

- ✚ Formulazione del problema
- ✚ Scelta dei fattori (o variabili di ingresso), scelta degli esperimenti da condurre ed intervalli di variazione dei fattori
- ✚ Scelta della variabile di risposta, che dovrà essere rappresentativa del processo in esame
- ✚ Scelta del piano sperimentale, possibilmente un piano fattoriale se i fattori sono molti, scelta delle repliche e dell'ordine degli esperimenti
- ✚ Esecuzione degli esperimenti
- ✚ Analisi statistica dei risultati
- ✚ Conclusioni oggettive sui risultati ottenuti.

La scelta del tipo di *design* da adottare per il piano sperimentale è un punto di fondamentale importanza, su cui si trarranno alla fine tutte le informazioni. Le variabili in gioco sono diverse, come il numero dei fattori, i livelli scelti, i *range* dei vari parametri da esplorare, numero di repliche e così via. Come conseguenza a questa scelta ci sarà poi la possibilità di creare un modello empirico che permetterà di descrivere i risultati ottenuti. Questo modello darà una relazione quantitativa tra fattori significativi e risposta del sistema. Un esempio di modello del primo ordine a due variabili (fattori) è riportato nell'equazione 2.6, nella quale con i parametri ' β_i ' si intendono le costanti ottenute dalla regressione a seguito dell'analisi statistica dei dati, applicata ai generici fattori x_i . L'errore del modello è indicato dal simbolo ε inserito nel modello.

$$y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \varepsilon \quad (2.6)$$

Questa categoria di modelli molto semplici sono detti modelli degli effetti principali e non tengono ovviamente conto di eventuali interazioni tra fattori, però vengono spesso utilizzati in campagne sperimentali di screening dando risultati veloci e accettabili. Per campagne sperimentali dove si vuole studiare o verificare l'interazione tra più fattori, il processo non può essere adeguatamente descritto da questi semplici modelli empirici del primo ordine e bisogna aumentarne il grado di accuratezza, aggiungendo eventualmente dipendenze che tengano conto delle possibili interazioni tra fattori. A titolo esemplificativo è riportato un modello, equazione 2.7, che contempla interazioni tra i fattori (x_i) e termini quadratici. Le costanti anche in questo caso sono indicate con i termini β_{ij} e l'errore con il termine ε . Se poi si vuole inoltre ottimizzare il processo, si dovrà valutare l'ausilio di un modello ancora più completo, come quello riportato nell'equazione 2.7, che riporta le interazioni tra i fattori e i termini quadratici.

$$y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_{12} \cdot x_1 x_2 + \beta_{11} \cdot x_1^2 + \beta_{22} \cdot x_2^2 + \varepsilon \quad (2.7)$$

Ovviamente, l'inferenza di modelli più complessi rispetto al semplice modello lineare presentato nell'equazione 2.6, richiederà piani fattoriali adeguati più articolati e con un maggiore numero di esperimenti. Questo, data la natura dai piani fattoriali, porta però a una rapida ed esponenziale crescita del numero delle prove sperimentali da eseguire. Si dovrà quindi sempre trovare un buon compromesso tra le informazioni cercate e le dimensioni della campagna sperimentale.

Negli esperimenti nei quali si vuole studiare l'effetto di più fattori, i piani fattoriali (*factorial design*) sono considerati tra i più efficienti (Montgomery, 2013), perché eseguiti con l'esplorazione di tutte le possibili combinazioni tra fattori e livelli, che porta alla variazione congiunta dei fattori, fornendo informazioni significative sugli effetti sia singoli che combinati del sistema oggetto di studio. Questi piani fattoriali sono genericamente indicati come 2^k *factorial design* (se effettuati su due livelli e k fattori) e si basano sui seguenti principi fondamentali:

-  Variazione;
-  Replicazione;
-  Casualizzazione;
-  Bloccaggio;
-  Ortogonalità;
-  Variazione simultanea.

Ovviamente questo tipo di piani fattoriali (2^k *factorial design*) assume come ipotesi di base la linearità della risposta dei fattori. L'eventuale presenza di non linearità può essere comunque determinata aggiungendo nuovi punti al piano base, come punti centrali ad esempio, che danno un riscontro sulla possibile curvatura dovuta agli effetti del secondo ordine. Le informazioni ottenute dal piano devono essere poi elaborate per mezzo di un'opportuna analisi statistica. Lo studio statistico consiste principalmente in due parti, un *test 't'* che verifica la significatività degli effetti sul sistema e un'analisi di

varianza (ANOVA) che corrobora tali informazioni e fornisce ulteriori elementi per la comprensione del sistema.

Uno dei principali difetti, se così si può chiamare, dei piani fattoriali completi è la crescita esponenziale del numero di esperimenti al crescere del numero di fattori. Si pensi ad un piano fattoriale 2^6 , che necessita di 64 esperimenti, senza considerare le repliche; solamente 6 gradi di libertà (gdl) su 63 sono dovuti agli effetti principali e 15 gdl per le interazioni di secondo grado. I restanti gdl sono da attribuirsi ad interazioni di terzo grado e superiori, che solitamente nei processi fisici e biologici danno uno scarso contributo al sistema e si può valutare di non tenerne conto, dopo opportune valutazioni, senza compromettere significativamente lo studio del problema.

Per ovviare a questo problema e ridurre l'elevato numero di esperimenti ottenuti dall'utilizzo di un piano fattoriale completo, si può far impiego di piani fattoriali frazionari. Questo tipo di piani usa frazioni dei piani fattoriali completi ed è quello maggiormente impiegato per la progettazione di produzione e processi, miglioramenti di processi e sperimentazione nell'industria (Montgomery, 2013). L'utilizzo principale di questi piani fattoriali frazionari è nella fase di screening di grandi campagne sperimentali, mirate ad individuare i fattori che danno un forte impatto sul sistema. Dopo queste fasi di screening preliminare, seguono campagne sperimentali più mirate, che magari fanno utilizzo di piani fattoriali completi, ma con un numero di fattori più limitato.

I punti di forza dei piani fattoriali frazionari possono essere riassunti come segue:

- ✚ Quando si studiano molte variabili, solitamente il processo è influenzato da pochi effetti principali (*The sparsity of the effects principle*);
- ✚ I piani fattoriali possono essere proiettati su piani fattoriali più robusti (*The projection property*);
- ✚ Si possono combinare più esperimenti frazionari in maniera sequenziale per costruire piani più completi (*Sequential Experimentation*).

I piani fattoriali frazionari sono genericamente indicati con la dicitura 2^{k-p} , dove la frazione del piano sperimentale si può facilmente ricavare essendo $1/2^p$. Questo tipo di piani richiede la scelta di 'p' generatrici, che dovranno essere scelte con molta attenzione per via della struttura dei confondimenti (*aliasing*) che verrà a formarsi. Questa scelta è fondamentale per evitare che interazioni e fattori d'interesse non possano confondersi tra di loro vanificando quindi lo sforzo fatto per condurre la campagna sperimentale.

In questo tipo di piani si deve quindi cercare di mantenere massima la 'risoluzione', proprio per via dei possibili confondimenti. La risoluzione è un parametro che dice quanto è alto il livello di confondimenti, ossia quanto le interazioni di vario livello andranno a confondersi tra di loro. Per maggiori dettagli si rimanda sempre al testo edito da Montgomery (2013).

Vediamo ora un esempio pratico di piano fattoriale completo e come si effettua l'analisi statistica dei dati, per rendere più concreti i concetti di tipo qualitativo appena riportati. Si prende come caso di studio il piano fattoriale completo 2^3 adottato nel capitolo relativo ai consorzi batterici, che verrà ampiamente discusso nel seguito.

Il piano fattoriale impiegato è costituito da tre fattori, che chiameremo per semplicità 'A', 'B' e 'C', che sono stati fatti variare su due livelli di concentrazione. Si indichi numero di repliche del piano con n (in questo caso $n=2$), e i livelli dei fattori con le relative lettere minuscole, 'a', 'b' e 'c'.

Il calcolo degli effetti sul sistema dovuti alla variazione congiunta dei fattori, può essere fatto per mezzo dell'algoritmo di Yates (1937), che ci permette inoltre di costruire la tabella 2.4 che riporta tutte le combinazioni degli esperimenti da fare e dei livelli dei singoli fattori per ogni trattamento, che indicheremo 'Run'. Nella tabella sono riportati gli effetti principali, le interazioni doppie e l'unica interazione tripla che si genera (ABC), oltre che la media di tutti gli esperimenti 'I'. I segni riportati all'interno della tabella indicano il livello, alto (+) e basso (-). Nella colonna 'Run' viene riportato invece il numero progressivo dell'esperimento.

Gli otto esperimenti possono essere rappresentati graficamente da un cubo, i cui vertici indicano le specifiche combinazioni di trattamenti, come riportato in figura 2.16. Utilizzando l'output della campagna sperimentale è possibile calcolare gli effetti principali e le eventuali interazione dei fattori.

Run	Combinazione trattamenti	I	A	B	AB	C	AC	BC	ABC
1	(1)	+	-	-	+	-	+	+	-
2	a	+	+	-	-	-	-	+	+
3	b	+	-	+	-	-	+	-	+
4	ab	+	+	+	+	-	-	-	-
5	c	+	-	-	+	+	-	-	+
6	ac	+	+	-	-	+	+	-	-
7	bc	+	-	+	-	+	-	+	-
8	abc	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabella 2.4: Tabella dei segni per il piano fattoriale 2^3

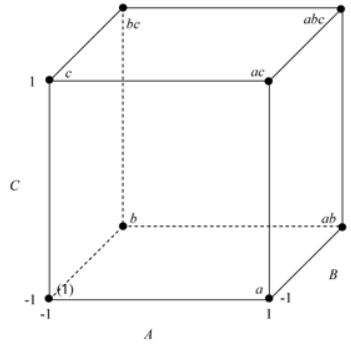


Figura 2.16: Rappresentazione grafica esperimenti piano 2^3

Con semplici passaggi è possibile calcolare l'effetto di A, che è dato dalla media aritmetica delle quattro prove in cui A è al livello alto $\bar{y}_{A+}$ meno la media aritmetica delle quattro prove in cui A è al livello basso $\bar{y}_{A-}$, come riportato in equazione 2.8.

$$A = \bar{y}_{A+} - \bar{y}_{A-} = \frac{a + ab + ac + abc}{4n} - \frac{(1) + b + c + bc}{4n} \quad (2.8)$$

Se definiamo il contrasto con la relazione 2.9, possiamo riscrivere in maniera compatta l'equazione 2.8, che diventa la 2.10 e stima l'effetto A. k è il numero di fattori n è il numero di repliche eseguite nelle stesse condizioni sperimentali.

$$\text{contrasto}_A = a - (1) + ab - b + ac - c + abc - bc \quad (2.9)$$

$$A = \frac{2}{n \cdot 2^k} \cdot (\text{contrasto}_A) \quad (2.10)$$

I segni dei coefficienti delle combinazioni dei trattamenti presenti nel contrasto sono quelli presenti in colonna A, tabella 2.4. Il contrasto per qualunque effetto può essere ottenuto facilmente dalla Tabella dei segni.

Con lo stesso procedimento si può calcolare l'effetto di B, che risulta dato dalla differenza tra le medie aritmetiche tra le quattro combinazioni dei trattamenti nella faccia frontale del cubo e le quattro sul retro.

Ciò porta a :

$$\begin{aligned} B = \bar{y}_{B+} - \bar{y}_{B-} &= \frac{1}{4n} \cdot (\text{contrasto}_B) \\ &= \frac{1}{4n} \cdot [b + ab + bc + abc - (1) - a - c - ac] \end{aligned} \quad (2.11)$$

L'effetto di C è la differenza nelle medie delle quattro combinazioni di trattamenti nella faccia superiore del cubo e le quattro su quella inferiore. L'interazione tripla ABC è

definita come la differenza media tra l'interazione AB per i due differenti livelli di C. Anche in questo caso i segni del contrasto_{ABC} sono quelli riportati nella colonna ABC di Tabella 2.4. In generale è possibile definire il contrasto dell'effetto AB...K espandendo il membro di destra di:

$$\text{Contrasto}_{AB\dots K} = (a \pm 1)(b \pm 1) \dots (k \pm 1) \quad (2.12)$$

Identificati i contrasti degli effetti è possibile stimare questi ultimi e le relative somme dei quadrati rispettivamente come:

$$AB \dots K = \frac{2}{n2^k} (\text{Contrasto}_{AB\dots K}) \quad (2.13)$$

e

$$SS = \frac{(\text{Contrasto}_{AB\dots K})^2}{n2^k} \quad (2.14)$$

Ad un esperimento condotto con una campagna sperimentale che utilizza un piano fattoriale completo 2^k , può essere associato un modello di regressione, che può coincidere con un modello di regressione lineare completo, contenente tutte le interazioni possibili tra gli effetti. Il modello di regressione lineare completo per il piano fattoriale caso di studio, 2^3 , è descritto in equazione 2.15.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 + \epsilon \quad (2.15)$$

dove y è la risposta del sistema, i β_i sono i coefficienti della regressione (parametri da stimare), le variabili x_i , rappresentano i fattori A, B e C. Queste sono definite su una scala codificata da -1 a +1 (i livelli basso e alto di A, B, C) e possono assumere valore +1 (corrispondente al valore massimo del fattore) o -1 (valore minimo del fattore).

I termini $x_1 x_2$, $x_1 x_3$ e $x_2 x_3$ e rappresentano rispettivamente le interazioni doppie AB, AC e BC mentre $x_1 x_2 x_3$ è l'interazione tripla ABC. ϵ è una componente di errore casuale nella quale confluiscono tutte le fonti di variabilità dell'esperimento, inclusi errore di misura, variabilità causata da fattori non controllati e rumore di fondo complessivo (effetto di variabili ambientali, ecc.).

Il corrispondente modello di regressione stimato è quindi:

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_1 + \hat{\beta}_2 x_2 + \hat{\beta}_3 x_3 + \hat{\beta}_{12} x_1 x_2 + \hat{\beta}_{13} x_1 x_3 + \hat{\beta}_{23} x_2 x_3 + \hat{\beta}_{123} x_1 x_2 x_3 \quad (2.16)$$

La media aritmetica di tutte le osservazioni sono l'intercetta $\hat{\beta}_0$, mentre i coefficienti di regressione stimati sono rappresentati da $\hat{\beta}$, che sono pari alla metà dei corrispettivi fattori stimati. Questo modello di regressione, se rappresentato graficamente da luogo al cosiddetto grafico della superficie di risposta, che rappresenta i valori di y generati al variare delle combinazioni dei fattori quando presi due alla volta. Questo implica che

per un piano 2^3 si potranno tracciare tre grafici relativi alla superficie di risposta, relativi alle coppie $x_i x_j$ che si possono combinare.

A questo punto è possibile effettuare i test statistici per valutare la significatività degli effetti ed effettuare l'analisi di varianza (ANOVA), in modo da valutare oggettivamente tutti i risultati ottenuti. In tabella 2.5 viene riportata la tabella ANOVA per il caso in esame, e di seguito verranno definiti i termini al suo interno. La somma dei quadrati totale, che rappresenta la dispersione totale presente nel campione di dati, è calcolata in equazione 2.17

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c \sum_{l=1}^n y_{ijkl}^2 - \frac{y_{....}^2}{abcn} \quad (2.17)$$

y_{ijkl} è la risposta osservata quando il fattore A è all'i-esimo livello ($i = 1, \dots, a$), il fattore B al j-esimo livello ($j = 1, \dots, b$), il fattore C al k-esimo livello ($k = 1, \dots, c$) per l-esima replicazione ($l = 1, \dots, n$).

$y_{....}$ è la somma di tutte le osservazioni:

$$y_{....} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c \sum_{l=1}^n y_{ijkl} \quad (2.18)$$

Le somme dei quadrati principali sono ricavate dai totali dei fattori A, B e C. La somma totale delle osservazioni per il trattamento i-esimo del fattore A, per il trattamento j-esimo del fattore B e per il trattamento k-esimo del fattore C sono date rispettivamente da:

$$y_{i...} = \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c \sum_{l=1}^n y_{ijkl} \quad (2.19)$$

$$y_{.j..} = \sum_{i=1}^a \sum_{k=1}^c \sum_{l=1}^n y_{ijkl} \quad (2.20)$$

$$y_{..k.} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{l=1}^n y_{ijkl} \quad (2.21)$$

La somma dei quadrati degli effetti principali sono quindi ottenibili come:

$$SS_A = \frac{1}{bcn} \sum_{i=1}^a y_{i...}^2 - \frac{y_{....}^2}{abcn} \quad (2.22)$$

$$SS_B = \frac{1}{acn} \sum_{i=1}^a y_{i\cdot\cdot}^2 - \frac{y_{\cdot\cdot\cdot}^2}{abcn} \quad (2.23)$$

$$SS_C = \frac{1}{abn} \sum_{i=1}^a y_{\cdot\cdot k\cdot}^2 - \frac{y_{\cdot\cdot\cdot}^2}{abcn} \quad (2.24)$$

La somma dei quadrati delle interazioni sono così ricavate:

$$SS_{AB} = \frac{1}{cn} \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b y_{ij\cdot\cdot}^2 - \frac{y_{\cdot\cdot\cdot}^2}{abcn} - SS_A - SS_B \quad (2.25)$$

$$SS_{AC} = \frac{1}{bn} \sum_{i=1}^a \sum_{k=1}^c y_{i\cdot k\cdot}^2 - \frac{y_{\cdot\cdot\cdot}^2}{abcn} - SS_A - SS_C \quad (2.26)$$

$$SS_{BC} = \frac{1}{an} \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c y_{\cdot j k\cdot}^2 - \frac{y_{\cdot\cdot\cdot}^2}{abcn} - SS_B - SS_C \quad (2.27)$$

La somma dei quadrati dell'interazione a tre fattori è data da:

$$SS_{ABC} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c y_{ijk\cdot}^2 - \frac{y_{\cdot\cdot\cdot}^2}{abcn} - SS_A - SS_B - SS_C - SS_{AB} - SS_{AC} - SS_{BC} \quad (2.28)$$

La somma dei quadrati dell'errore è pari a:

$$SS_E = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c \sum_{l=1}^n (y_{ijkl} - \bar{y}_{ijk\cdot})^2 \quad (2.29)$$

dove:

$$\bar{y}_{ijk\cdot} = \frac{y_{ijk\cdot}}{n} \quad (2.30)$$

rappresenta la media delle osservazioni della cella ijk . La somma dei quadrati delle differenze all'interno dei trattamenti è rappresentata da SSE, che da una misura genuina della varianza. I quadrati medi MS_i si ottengono dal rapporto della somma dei quadrati con i gradi di libertà corrispettivi:

$$MS_i = \frac{SS_i}{gdl_i} \quad (2.31)$$

Il numero dei gradi di libertà (gdl) per ogni effetto principale è dato dal numero dei livelli del fattore meno uno e il numero dei gdl per ogni interazione è dato dal prodotto del numero dei dgl associati con le componenti individuali dell'interazione. In caso di assenza di effetti dei trattamenti dei fattori e delle loro interazioni, i valori attesi dei quadrati medi MS_A , MS_B , MS_C , MS_{AB} , MS_{AC} , MS_{BC} , MS_{ABC} e MS_E sono tutte stime della varianza dell'errore sperimentale.

Per valutare la significatività degli effetti dei fattori e delle loro interazioni è possibile eseguire il test statistico F, dividendo il corrispondente quadrato medio dell'effetto o dell'interazione per il quadrato medio dell'errore. Valori elevati di tale rapporto indicano che l'effetto del fattore *i-esimo* non è trascurabile e permettono di concludere che la differenza tra i trattamenti è statisticamente significativa ed è maggiore della dispersione presente tra i dati. Nel caso in cui i fattori non siano significativi e assumendo che gli errori sperimentali siano normalmente distribuiti con valore atteso zero e varianza comune σ^2 , allora ciascun MS_i è distribuito come una variabile aleatoria del tipo χ^2 ad (a-1), (b-1), (c-1), (a-1)(b-1), (a-1)(c-1), (b-1)(c-1) e (a-1)(b-1)(c-1) rispettivamente per il quadrato medio di A, B, C, AB, AC, BC, ABC, mentre l' MS_E è una χ^2 ad $abc(n-1)$ gradi di libertà.

In tal caso il rapporto:

$$F_0 = \frac{MS_i}{MS_E} \quad (2.32)$$

per un piano fattoriale a due livelli, tre fattori e due repliche è una variabile aleatoria di tipo *Fisher* a (1,8) gradi di libertà, essendo *a*, *b*, *c*, *n* pari a 2.

Nelle tabelle dell'analisi della varianza verrà riportato anche il valore del *p-value* associato all'effetto. Questo valore corrisponde alla probabilità che la statistica usata per il test assuma un valore pari o maggiore al valore osservato dalla statistica quando l'ipotesi nulla H_0 è vera. Valori del *p-value* più alti del livello di significatività α scelto per il test indicano che l'effetto non è significativo, vice versa confermano la significatività dell'effetto. Il *p-value* viene calcolato come riportato in eq. 4.31.

$$p - value = 1 - F_{1,abc(n-1)}(F_0) \quad (2.33)$$

Nota la significatività degli effetti principali e delle interazioni è possibile rimuovere dal modello quanto non è significativo.

Origine della variabilità	Somma dei quadrati	Gradi di libertà	Quadrati medi	F ₀
A	SS _A	a-1=1	$MS_A = \frac{SS_A}{a-1}$	$F_0 = \frac{MS_A}{MS_E}$
B	SS _B	b-1=1	$MS_B = \frac{SS_B}{b-1}$	$F_0 = \frac{MS_B}{MS_E}$
C	SS _C	c-1=1	$MS_C = \frac{SS_C}{c-1}$	$F_0 = \frac{MS_C}{MS_E}$
AB	SS _{AB}	(a-1)(b-1)=1	$MS_{AB} = \frac{SS_{AB}}{(a-1)(b-1)}$	$F_0 = \frac{MS_{AB}}{MS_E}$
AC	SS _{AC}	(a-1)(c-1)=1	$MS_{AC} = \frac{SS_{AC}}{(a-1)(c-1)}$	$F_0 = \frac{MS_{AC}}{MS_E}$
BC	SS _{BC}	(b-1)(c-1)=1	$MS_{BC} = \frac{SS_{BC}}{(b-1)(c-1)}$	$F_0 = \frac{MS_{BC}}{MS_E}$
ABC	SS _{ABC}	(a-1)(b-1)(c-1)=1	$MS_{ABC} = \frac{SS_{ABC}}{(a-1)(b-1)(c-1)}$	$F_0 = \frac{MS_{ABC}}{MS_E}$
Errore	SS _E	abc(n-1)=8	$MS_E = \frac{SS_E}{abc(n-1)}$	
Totale	SS _T	abcn-1=15	$MS_T = \frac{SS_T}{abcn-1}$	

Tabella 2.5: tabella di Analisi della Varianza per il piano 2³.

Attraverso l'analisi dei residui è possibile fare un ulteriore controllo di adeguatezza del modello. La parte non spiegata dal modello è rappresentata dal residuo che viene definito come segue (per tre fattori):

$$e_{ijkl} = y_{ijkl} - \hat{y}_{ijkl} \quad (2.34)$$

Il residuo standardizzato è definito come:

$$d_i = \frac{e_i}{\sqrt{MSE}} \sim N(0,1) \quad (2.35)$$

Nel caso in cui nel residuo fosse sopravvissuta solo la componente aleatoria della misura sperimentale, dividendo per la varianza dell'errore sperimentale si ottiene una normale di media 0 e varianza unitaria (N(0,1)), ossia una variabile gaussiana di tipo standard. Nel 95% dei casi i residui cadono in una banda compresa tra -2 e +2.

Un'ulteriore rappresentazione grafica per l'analisi dei residui è il grafico di probabilità normale dei residui, che viene riportato in figura 2.17 a titolo di esempio.

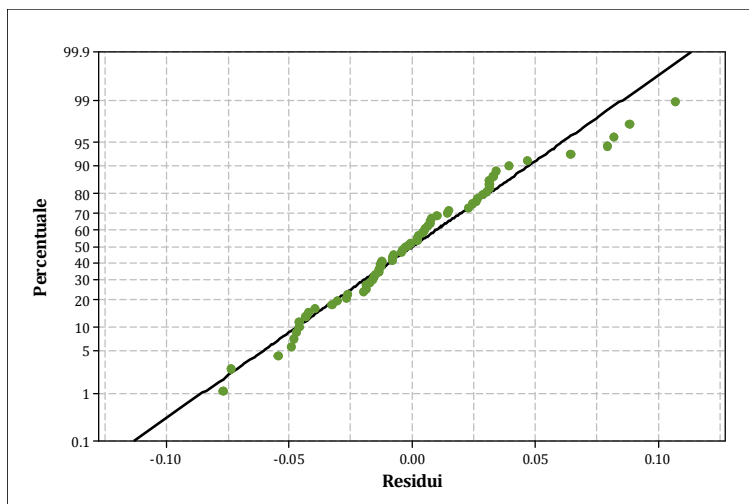


Figura 2.17: grafico di probabilità normale dei residui

Se la distribuzione dell'errore è normale, i residui si dispongono lungo la retta e non si allontanano troppo da questa, il modello si dimostra adeguato alla descrizione dei dati sperimentali. Un altro modo per valutare l'adeguatezza del modello è il coefficiente di determinazione R^2 ($0 \leq R^2 \leq 1$) che viene definito in equazione 2.36.

$$R^2 = 1 - \frac{SS_E}{SS_{Totale}} \quad (2.36)$$

Solitamente valori di R^2 prossimi all'unità indicano che il modello approssima bene i dati sperimentali, ma ciò potrebbe essere dovuto anche ad altri fattori. Una variante di R^2 è R^2_{adj} che considera anche il numero di fattori:

$$R^2_{adj} = 1 - \frac{MS_E}{\frac{SS_T}{gdl_T}} \quad (2.37)$$

Un ultimo parametro che è stato valutato per la valutazione dell'adeguatezza dei modelli è 'S', che rappresenta la stima della deviazione standard dell'errore nel modello di regressione. Più piccolo risulta tale valore, tanto più adeguato si può considerare il modello.

$$S = \sqrt{MS_E} \quad (2.38)$$

Capitolo 3

Biorisanamento e funghi

In questo capitolo si affronta lo studio di una tecnologia alternativa di biorisanamento basata sull'uso di sistemi fungini, che sembra rappresentare una promettente possibilità o quantomeno una buona integrazione delle tecnologie esistenti. Sono presentati lo stato dell'arte, le caratteristiche dei microorganismi impiegati e i dettagli degli esperimenti condotti.

3.1 Stato dell'arte

In tutti gli ecosistemi i funghi hanno un ruolo fondamentale nella decomposizione della sostanza organica quale cellulosa, emicellulosa e lignina. I funghi hanno la capacità di mineralizzare, rilasciare e accumulare vari elementi tra cui i metalli. È stato dimostrato che i funghi sono in grado di modificare la permeabilità del terreno e gli scambi ionici al suo interno, riuscendo anche a rimuovere inquinanti. I funghi però crescono lentamente e necessitano di adatti substrati per riuscire a degradare alcune sostanze e creare i cometaboliti e metaboliti, prodotti durante il processo di degradazione. Il processo di biotrasformazione di composti chimici, acque di scarico o rifiuti è definito come micotrasformazione (*mycotransformation*) quando effettuato dai funghi. La comunità scientifica nelle ultime decadi ha lavorato molto sull'utilizzo dei funghi per la degradazione di rifiuti e di inquinanti tossici e persistenti presenti nel suolo e sui sedimenti. In particolare, si sono dimostrati in grado di rimuovere metalli pesanti e mineralizzare composti organici persistenti (Singh *et al*, 1991).

La famiglia dei funghi a 'radice bianca' (*white rot*) sono in grado di degradare facilmente la complessa molecola della lignina e dopo la scoperta degli enzimi ossidativi extracellulari prodotti da questi funghi (Bumpus *et al*, 1985), i *white rot* sono stati proposti per il biorisanamento. Il largo numero di specie di funghi e i diversi tipi di meccanismi ossidativi/riduttivi operati dagli enzimi prodotti (Kurt *et al*, 2010), rende attraente il loro utilizzo per il biorisanamento di diverse matrici e i molti composti tossici e persistenti, per citarne alcuni, i pesticidi (Xiao *et al*, 2011), i clorofenoli (Rubilar *et al*, 2011) i coloranti organici (Zhou *et al*, 2011; Mishra *et al*, 2011;), gli antibiotici (Rodarte-Morales, 2012) e alcuni idrocarburi policiclici aromatici (Hadibarata *et al*, 2009; Acevedo *et al*, 2011).

Il successo del biorisanamento ad opera di questi microrganismi non è certo semplice dato il numero elevato di variabili da considerare e che possono influenzare il processo biodegradativo. Una volta deciso quale inquinante o quale miscela di composti inquinanti si vuole provare a degradare, l'approccio migliore è quello di fare dei test su scala di laboratorio e poi, una volta ottimizzate tutte le condizioni sperimentali, passare alla scala pilota. Questo percorso dà anche la possibilità di produrre un inoculo di micelio fungino che può essere acclimatato ai composti inquinanti e può permettere di passare ai trattamenti sul campo con maggiori probabilità di successo.

3.2 I funghi

I funghi occupano un'importante posto nell'ecosistema come organismi non fotosintetici perché ottengono i nutrienti dalla degradazione della sostanza organica. I funghi durante i processi di degradazione, producono metaboliti di interesse per la chimica e anche metaboliti secondari che utilizzano per sopravvivere nell'ambiente e spesso per contrastare organismi antagonisti, come i predatori. I funghi, come è noto, crescono spontaneamente e vengono abitualmente coltivati dall'uomo, inserendosi in diversi aspetti della vita. La chimica dei funghi entra quotidianamente nella vita umana, dalla lievitazione naturale di pane, birra e vino, alla produzione commerciale per usi alimentari. Ci sono poi anche gli aspetti negativi legati alle malattie delle colture alimentari, piante ornamentali o alla degradazione degli alimenti conservati (ad esempio mais e grano stoccati in sili sono attaccati da funghi e muffe). Possono essere fonte produttiva per farmaci, a partire dai metaboliti prodotti, o dare origine a malattie a piante ed esseri viventi, creando quindi anche risvolti negativi a livello economico e sanitario. Lo studio dei metaboliti prodotti e il loro possibile utilizzo, spazia tra migliaia di composti, su cui sono ancora in atto ricerche su una moltitudine di discipline e hanno contribuito globalmente allo sviluppo della chimica. Si pensi ad esempio a come la scoperta della penicillina, avvenuta nel 1928 grazie a Fleming, abbia contribuito significativamente ad un cambiamento della medicina e ai risvolti sulla salute umana.

I funghi sono microrganismi eucarioti con un nucleo distinto, a differenza dei batteri che sono procarioti senza un nucleo ben distinto. I funghi sono anche differenti dagli attinomiceti (*gram* positivi usati per la produzione di antibiotici). Per quanto riguarda i lieviti, seppur appartengano al regno dei funghi, sono organismi unicellulari e non sono visibili ad occhio nudo. I funghi non vivono in maniera isolata, e possono comportarsi come parassiti, simbionti o saprofiti. Come già detto, questi, possono essere utilizzati industrialmente per compiere trasformazioni microbiologiche di differenti sostanze. Questa capacità che peraltro già sfruttata per la produzione di integratori e medicinali, può trovare applicazione anche nel biorisanamento di suoli contaminati. Esistono oltre 250.000 specie di funghi e solo una piccola parte di questi è stata studiata dettagliatamente dal punto di vista metabolico. Infatti, si può affermare che le stesse specie di funghi possono avere diversi ceppi che hanno metabolismi o metaboliti differenti o dipendenti dalle condizioni di crescita. La struttura dei funghi può essere molto varia, però la struttura di base è solitamente di tipo filamentoso e prende il nome di '*ifa*' (foto 3.1 - Sn). Le *ife* aggregandosi in molte unità, vanno a costituire il micelio (foto 3.1 - Dx) o come avviene per alcune specie, un rizoma, che può dar luogo al corpo fruttifero che solitamente si sviluppa nei mesi autunnali e che rilascia spore. Diversamente i lieviti, che pur appartengono al regno dei funghi, sono costituiti solo da piccole cellule non visibili a occhio nudo e non rilasciano spore.

La riproduzione avviene solitamente per mezzo delle spore, che però possono avere uno sviluppo vegetativo dato anche da altre parti di micelio (pratica di replicazione utilizzata anche per il lavoro di questa tesi).

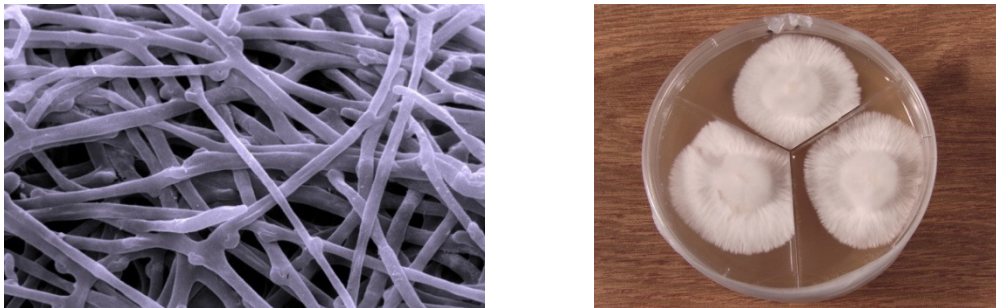


Figura 3.1: ife fungine viste al microscopio(Sn) e micelio in fase di crescita su piastra di Petri (Dx)

La crescita dei funghi è legata all'ambiente che li circonda e questo, solo in alcuni casi, può essere ricreato in laboratorio o per scopi di produzione industriale. La crescita in vitro, ad oggi, non è possibile per tutte le specie di funghi, soprattutto per quelli commestibili di maggior pregio. I funghi possono essere allevati sia in mezzo solido, come su piastre di Petri (riempite con un *medium* solidificato per mezzo di Agar), o in culture liquide agitate e areate (beute o fermentatori). Il mezzo di coltura, il *medium*, solitamente contiene una fonte di carbonio, azoto, fosforo e altri microelementi necessari per lo sviluppo del fungo. È importante sottolineare che la composizione chimica del *medium* può essere di fondamentale importanza per la produzione di particolari metaboliti, per via delle diverse condizioni che vengono a crearsi. È noto, ad esempio, che usando come fonte di azoto il nitrato di Ammonio, il *medium* diventa velocemente acido rispetto all'utilizzo della Glicina. Inoltre i *medium* di crescita possono essere naturali o sintetici a seconda che si usino estratti di composti organici complessi o semplicemente sali inorganici. Solitamente i funghi prediligono un *medium* leggermente acido (pH 4-5) e temperature tra i 18-25 °C. I *medium* di crescita per i batteri, invece, sono solitamente più efficaci intorno alla neutralità e la crescita è favorita a temperature più elevate, circa 37 °C, per batteri mesofili.

3.3 Materiali

3.3.1 *Pleurotus sajor caju* e *medium* di crescita

Per questo lavoro di tesi è stato impiegato un fungo appartenente alla famiglia dei 'white rot', funghi appartenenti generalmente al gruppo dei Basidiomiceti, che colonizzano il legno, ne decompongono la lignina e i materiali ligneo cellulósici, causandone il cosiddetto 'marciume bianco'. Il nome 'white rot' deriva infatti dall'aspetto del legno attaccato da questi funghi, nel quale la degradazione della lignina porta ad una decolorazione del substrato. I materiali ligno-cellulosici hanno un'elevata resistenza alla degradazione biologica dovuta proprio alla presenza di lignina, macromolecola della parete cellulare dei vegetali, che conferisce ai tessuti legnosi una notevole stabilità strutturale. La lignina è un etero-polimero complesso, ma soprattutto

la sua dimensione e la sua idrofobicità la rendono particolarmente resistente alla degradazione da parte dei sistemi enzimatici intracellulari (Guillèn *et al.*, 2004). I *white rot*, infatti, dovendo solubilizzare per poi assimilare macromolecole essenzialmente insolubili, producono e secernono enzimi extracellulari, come Laccasi (Brown, 1967; Salas *et al.*, 1995), Manganese Perossidasi (Kuwara *et al.*, 1984), Lignina perossidasi (Glenn *et al.*, 1983) e Aril-alcol ossidasi (Fakoussa e Hofrichter, 1999), che gradualmente attaccano e demoliscono i costituenti macromolecolari del materiale lignocellulosico. Le piccole molecole solubili risultanti vengono poi assorbite dalle stesse ife e utilizzate come nutrienti.

Il fungo *Pleurotus sajor caju* utilizzato per questo lavoro di testi cresce spontaneamente nei paesi orientali, ed è stato scelto per via delle sue estreme capacità di attacco nei confronti di substrati da colonizzare, per la sua relativa resistenza alla competizione con altri microorganismi, per l'adattabilità del metabolismo alla composizione del substrato e per via della sua non patogenicità nei confronti dell'uomo. Il ceppo proviene dalla collezione del dipartimento di Biochimica della facoltà di Scienze, Monserrato (CA). Il *Pleurotus s.c.* viene costantemente mantenuto in ambiente il più possibile sterile a temperatura controllata di 4°C, per evitare contaminazioni dovute ad altri microorganismi. Per il continuo 'ringiovanimento' del fungo, ossia la procedura di riproduzione vegetativa a partire da altre parti di micelio, il fungo viene fatto crescere con un *medium* contenente gli estratti di malto (2%) e lievito (0.5%) e solidificato con agar (1.5%), operando sempre in ambiente il più possibile sterile e a temperatura controllata.

L'operazione di ringiovanimento viene eseguita periodicamente per mantenere in buono stato la coltura madre. La procedura è la seguente: sono prelevati piccoli dischi di 6 mm di micelio fungino, che poi sono trasferiti in piastre di Petri opportunamente preparate con il *medium* sopra descritto. Le piastre sono poi lasciate incubare per 4/7 giorni a 25°C, ottenendo piastre (figura 3.2) ricoperte da micelio fungino che possono essere utilizzate come inoculo per altre piastre o beute tipo *Erlenmeyer*.

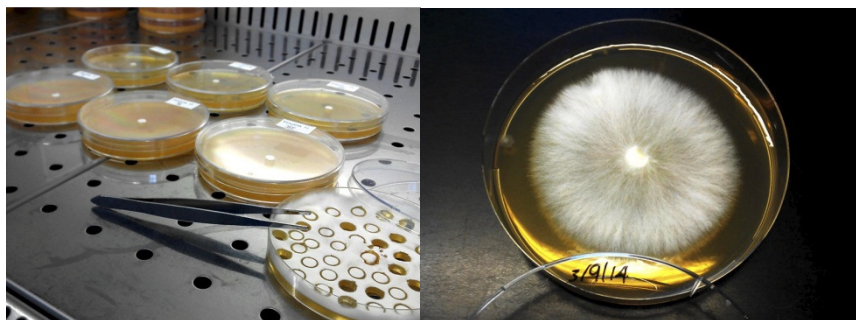


Figura 3.2: fase di inoculo in ambiente sterile (Sn)
Ife *Pleurotus s.c.* in crescita (Dx) - foto G. Saiu

3.3.2 IPA utilizzati per le prove

Con l'idea di iniziare a mettere in piedi procedure e una metodologia valida per testare l'effettiva capacità degradativa da parte di questo fungo, si è scelto di partire da composti aromatici a 4 anelli condensati. Si può dire che questi composti scelti fanno da spartiacque tra i composti facilmente degradabili, come il Naftalene, che possiede soli due anelli condensati (la nota naftalina) e quelli di più difficile degradazione, a partire da composti a 5 e più anelli condensati. Inoltre, la scelta è ricaduta su delle molecole che fanno parte dei composti definiti 'prioritari' dall'EPA per la salvaguardia ambientale, come già introdotto nel capitolo 2.

Per l'esecuzione delle prove sperimentali sono stati utilizzati due IPA, il pirene e il crisene, entrambi composti policiclici a quattro anelli condensati. Gli esperimenti condotti mirano a verificare le capacità di tollerabilità e degradazione da parte del fungo *Pleurotus sajor caju*.

3.3.3 Biodisponibilità e agenti mobilizzanti

Spesso la matrice che contiene gli inquinanti oppone resistenza al loro rilascio per diversi fattori chimico-fisici (Adsorbimento, presenza di cariche, affinità, ecc.). Studi scientifici hanno dimostrato come questo ne limiti la loro disponibilità nei confronti dei microorganismi (Erickson *et al.*, 1993; Luthi *et al.*, 1994; Weissenfels *et al.*, 1992). La biodisponibilità è un fattore che ha una importanza nel rilascio di composti xenobiotici verso l'acqua, limitando quindi la possibilità da parte dei microorganismi di effettuare la degradazione. Di contro, si può affermare che questo fatto possa avere anche un effetto positivo, poiché le molecole adsorbite nel terreno tendono a desorbirsi con difficoltà e ne limitano la diffusione nell'ambiente (Katayama *et al.*, 2010).

I fattori che entrano in gioco in questi meccanismi sono molti e complessi, per avere un'idea si pensi alle interazioni tra stato fisico/chimico dell'inquinante e del suolo, i fattori esterni come temperatura, presenza di nutrienti, ossigeno e il tipo di microorganismo che è presente (o popolazione). Ovviamente la diffusione del composto nel mezzo acquoso ha un ruolo chiave che fa da stadio limitante per la ricezione dei composti ai microorganismi. Una delle possibilità per aumentare la biodisponibilità sono gli agenti mobilizzanti, i tensioattivi, chiamati spesso in letteratura *Surfactanti* (Surface Active Agents), che possono dare un contributo significativo per composti NAPL (Non Aqueous Phase Liquids) e composti idrofobici come gli IPA, aumentandone la solubilità apparente in acqua. I surfactanti utilizzano principalmente tre meccanismi per aumentare la solubilità di composti idrofobici:

-  Emulsione di NAPL per mezzo della riduzione della tensione superficiale tra fase acquosa e non acquosa, con formazione di micro emulsioni;
-  Aumento della solubilità apparente, grazie alla formazione di micelle che inglobano le sostanze apolari;
-  Trasporto facilitato, riducendo la tensione superficiale dei composti inquinanti.

Questi meccanismi, che variano in funzione del composto usato e degli inquinanti, possono aumentarne la diffusività e quindi anche migliorare la solubilità in mezzi acquosi.

Gli agenti mobilizzanti, o semplicemente surfactanti, sono solitamente formati da due parti, una idrofilica e una lipofila. La prima li rende solubili in acqua, mentre la seconda gli permette di inglobare le particelle idrofobe e aumentarne la disponibilità in acqua per i microorganismi. Solitamente i surfactanti, superata una certa concentrazione, detta concentrazione micellare critica (CMC), tendono a formare delle 'micelle' (figura 3.3) che sono degli aggregati di molecole che permettono di aumentare la solubilità apparente dei composti inglobati al loro interno. I surfactanti sono di origine sia naturale che industriale e hanno largo impiego in svariati settori, come l'industria alimentare, farmaceutica, cosmetica e industriale.

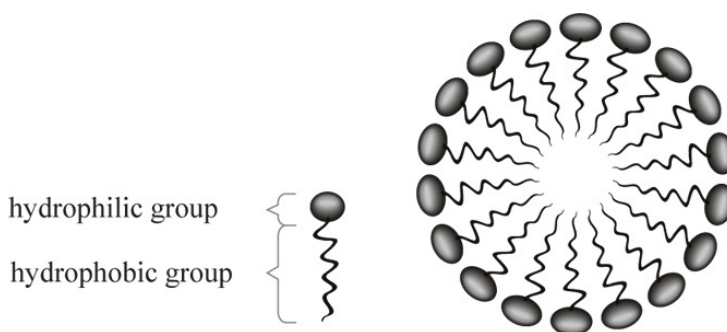


Figura 3.3: Formazione di una micella di un surfattante

Il surfattante non ionico utilizzato per questo lavoro di tesi è un *polyoxyethylene sorbitan monooleate*, chiamato commercialmente Tween80® o *Polisorbate 80*. La coda idrofobica contiene 18 atomi di carbonio ed è utilizzato sia nell'industria alimentare che farmaceutica, non essendo un composto tossico. In figura 3.4 è riportata un'immagine della formula di struttura di tale composto, che in soluzioni acquose tende a disporsi come nello schema di figura 3.3.

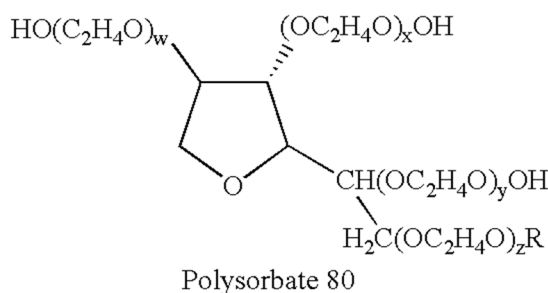


Figura 3.4: Formula di struttura del Tween80

3.3.4 Materiali

Durante le prove sperimentali si sono eseguite tutta una serie di analisi che verranno meglio descritte, utilizzando classiche apparecchiature di laboratorio. Tra le principali citiamo bilance tecniche e analitiche, autoclave di piccolo volume per le sterilizzazioni e la cappa a flusso laminare. La cappa laminare utilizzata è della Steril, modello VHB Compact, classe II BIOHAZARD che rispetta inoltre la norma UNI EN 12469.

3.4 Analisi chimiche

Per lo svolgimento di questa parte del lavoro di tesi si è reso necessario utilizzare un estrattore accelerato, che ha permesso di estrarre gli IPA dalla biomassa fungina, più sistemi Cromatografici (HPLC) che hanno permesso l'analisi delle soluzioni delle varie prove sperimentali, così come più sistemi Gas Cromatografici abbinati a Spettrometri di Massa (GC-MS). In particolare questi ultimi, i GC-MS, ci hanno dato le evidenze dei risultati che presenteremo e la certezza del riconoscimento dei composti analizzati.

I campioni prelevati durante la fase di crescita del fungo sono stati filtrati a 0,20 μm e analizzati in HPLC con il metodo validato EPA 8310, i cui dettagli sono riportati nella tabella 3.1. Prima della filtrazione i campioni sono stati centrifugati per separare il micelio presente in sospensione ed evitare di intasare i filtri, vista l'abbondante formazione di micelio. I campioni sono quindi stati analizzati direttamente senza ulteriori trattamenti, grazie alla compatibilità della colonna utilizzata con tale matrice.

Metodo	EPA 8310		
Colonna	Zorbax Eclipse plus C18 4.6x100mm, 3,5 μm particle size		
HPLC	Agilent 1200 infinity		
Detector	DAD: 230, 240, 254, 270, 350 nm e 400 nm per riferimento		
Solventi	Acqua (A) – Acetonitrile (B)		
Vol. Iniezione	5 μl		
Modalità pompa	Gradiente (%)		
	min	A	B
	0-2	60	40
	2-16	5	95
	16-18	60	40
Temperatura	25 °C		
Run time	18 min		

Tabella 3.1: Dettagli del metodo EPA 8310, analisi HPLC

Per estrarre gli eventuali residui di inquinanti dal micelio fungino in sospensione, è stata effettuata per alcuni campioni un'estrazione liquido-solido sul micelio separato per centrifugazione. A tale scopo è stato utilizzato un estrattore automatico che lavora ad alte pressioni e temperature per garantire elevate prestazioni di estrazione. Nella figura 3.5 è riportata l'immagine dell'estrattore, Dionex® ASE 300, che è stato utilizzato con le seguenti impostazioni (ottenute dopo diverse prove sperimentali): temperatura 100 °C, pressione 1500 psi, 'static' 5 min, 'flush' 60%, 'purge' 60 sec, 1 ciclo, solventi acetone-diclorometano (1:1). L'estratto ottenuto è stato disidratato con solfato di Sodio, concentrato in un evaporatore rotante, *Buchi Rotavapor*, e infine ripreso con esano e standard interni deuterati (*Deuterated PHA Mixture, ULTRA SCIENTIFIC, pn. ISM-750*).



Figura 3.5: Dionex ASE 300, estrattore con solventi - foto G. Saiu

Gli estratti ottenuti dai campioni di micelio fungino sono stati iniettati in un gas cromatografo che utilizzava come detector uno spettrometro di massa (GC-MS). Il metodo utilizzato è l'*EPA8270d* i cui dettagli sono riportati in tabella 3.2. Lo strumento era stato preventivamente tarato con una miscela certificata di 23 IPA (PAH Mixture, ULTRA SCIENTIFIC, pn. ITPM-23) e IPA Deuterati usati come standard interni (*Deuterated PHA Mixture, ULTRA SCIENTIFIC, pn. ISM-750*).

Sono state inoltre condotte delle prove per verificare la fattibilità di monitorare lo sviluppo del fungo in beute agitate tramite letture spettrofotometriche. A tale scopo è stata fatta una campagna sperimentale impiegando beute di tipo *Erlenmayer* da 250 ml contenenti come *medium* i soli estratti di malto e lievito, un volume di lavoro di 100 ml e inoculo con 4 plug di micelio fresco da circa 6 mm. Durante la fase di crescita si sono eseguite delle letture spettrofotometriche di torbidità a 450 nm (Morris & Nicholls, 1978), ottenendo dei profili di crescita microbica, come riportato nella figura 3.6. Tale procedura non è stata poi diffusamente utilizzata perché non di interesse e per via della non accertata affidabilità, anche se dai primi risultati ottenuti è parsa valida per gli scopi di tale lavoro.

Metodo	EPA 8270d
GC-MS	Agilent GC 6890
Rampa forno	50 °C -> hold 1 min 10 °C/min -> 320 °C
Tempo analisi	36 min
Iniettore	Splitless 290 °C 10 psi Flusso totale 42 ml/min
Colonna	HP5-MS 5% Phenyl Methyl Silox Tmax 320 °C 30 m x 250 µm x 0.25 µm Flusso 1.2 ml/min Velocità 40 cm/s
Carrier gas	Elio elevata purezza
Iniezione	1 µl

Tabella 3.2: Dettagli del metodo di analisi GC-MS, EPA 8270d

I campioni sono stati prelevati in cappa sterile e vista l'elevata concentrazione di biomassa si è proceduto diluendo il campione prima di effettuare le letture. Questa procedura non è stata successivamente adottata per due ragioni principali: non è stata valutata indispensabile per gli obbiettivi di questo lavoro di tesi, e secondariamente, perché potrebbe dare problemi di ripetibilità sulle letture se non meglio affinata. Infatti, per via della tipologia di micelio che risulta filamentoso, la fase liquida prelevata dovrebbe essere omogeneizzata meccanicamente per ottenere delle misure di assorbanza su una matrice il più possibile omogenea e minimizzare gli errori dovuti alla distribuzione dei filamenti del fungo.

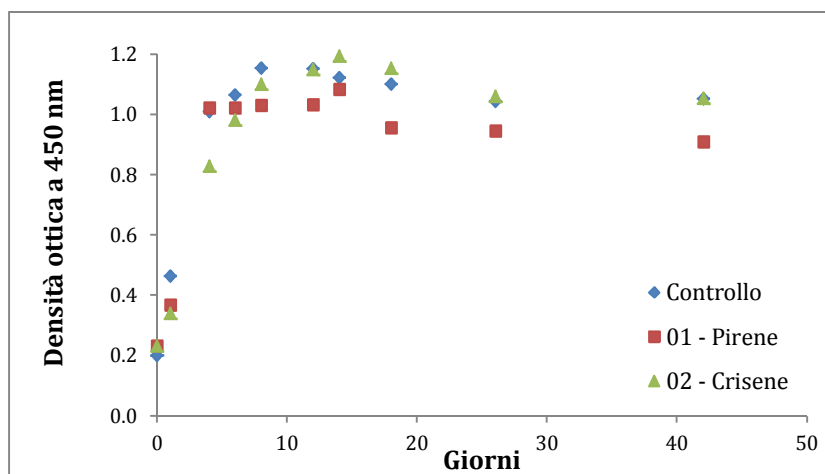


Figura 3.6: Crescita su beute agitate, letture di assorbanza

3.5 Prove sperimentali

Le prove sperimentali condotte con il *Pleurotus s.c.* sono state condotte sia in piastre di Petri, che in beute contenenti colture liquide (figura 3.7). Con lo scopo di ottenere la massima resa dal fungo, in termini di crescita, tolleranza ed eventuale degradazione degli inquinanti selezionati, è stata condotta una prima campagna sperimentale di natura esplorativa con un *medium* modificato, come verrà meglio dettagliato nel seguito. Nel *medium*, sono stati introdotte sostanze che stimolano la produzione di enzimi da parte del fungo, come il rame (Bettin *et al.*, 2008), una seconda fonte di azoto, peptone da Caseine (Hanson, 2008), un'aggiuntiva fonte di carbonio, lecitina di soia (Pannu *et al.*, 2004) e l'aggiunta di un surfattante, Tween80® (Roch and Alexander, 1995), oltre che gli inquinanti scelti, pirene e crisene. Il fungo è stato esposto a diverse concentrazioni dei composti sopra elencati, in condizioni controllate e applicando i criteri del *Design of Experiment*.



Figura 3.7: Piastre di Petri (Sn) e beute tipo Erlenmayer (Dx)- - foto G. Saiu

3.5.1 Campagna sperimentale su piastre di Petri

Il comportamento del fungo, utilizzato su piastre di Petri in forma miceliale, è stato monitorato per oltre 40 giorni, in delle piastre dove è stata fatta variare congiuntamente la concentrazioni di:

- ✚ Pirene
- ✚ Solfato di rame
- ✚ Peptone da Caseine
- ✚ Tween 80
- ✚ Lecitina di soia
- ✚ Crisene.

Per gli esperimenti è stato scelto un piano fattoriale frazionario su due livelli, a sei fattori, con 3 repliche per esperimento, avente risoluzione IV che viene solitamente indicato con la dicitura: (2^{6-2}) . Il piano frazionario è stato scelto per via del buon compromesso tra numero di esperimenti e validità delle informazioni rese, soprattutto

in considerazione del fatto che è fatto come *screening* preliminare per la verifica degli effetti dei numerosi fattori da analizzare. La scelta di non utilizzare un piano di tipo *full factorial* nasce dalla quasi impossibilità di gestire l'elevato numero di esperimenti che si sarebbero dovuti condurre contemporaneamente. Infatti, si dovrebbero esplorare 64 (2^6) diverse combinazioni di esperimenti, per ciascuna delle quali sono richieste 3 repliche, che porta ad un numero totale di esperimenti pari a 192. Utilizzando il piano frazionario, che ha comportato la preparazione di 48 piastre contenenti *medium* differenti e il loro monitoraggio per circa due mesi, si sono ottenute informazioni significative per i fattori scelti e le loro interazioni sino al terzo livello, grazie all'elevata risoluzione del piano frazionario scelto. Il dettaglio della campagna sperimentale è riportato nelle tabelle 3.3 e 3.4.

Fattore/livello	Basso(-1) †	Alto (+1) †
Pirene	0	5†
Crisene	0	5†
CuSO ₄	0	12,5†
Peptone	0	10†
Tween80	2.5	10†
Lecitina di soia	0	30†

Tabella 3.3: Livelli di concentrazione utilizzati per i fattori scelti († mg a kg di *medium* solido)

Piano fattoriale frazionario 2_{IV}^{6-2}						
Run	Pirene	CuSO ₄	Peptone	Tween80	Lecitina	Crisene
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	1	1	1
3	-1	-1	1	-1	1	1
4	-1	-1	1	1	-1	-1
5	-1	1	-1	-1	1	-1
6	-1	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	-1	1
8	-1	1	1	1	1	-1
9	1	-1	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1	1	-1
11	1	-1	1	-1	1	-1
12	1	-1	1	1	-1	1
13	1	1	-1	-1	1	1
14	1	1	-1	1	-1	-1
15	1	1	1	-1	-1	-1
16	1	1	1	1	1	1

Tabella 3.4: Dettaglio del piano fattoriale frazionario (2_{IV}^{6-2}).

Ogni prova sperimentale (definita 'run') con i dettagli dei livelli scelti e riportata nella tabella 3.4 è stata replicata 3 volte, con l'aggiunta di ulteriori tre piastre contenenti solamente il *medium* di base (Estratti di malto e lievito, solidificati con agar-agar), ottenendo un totale di 51 piastre. Nella tabella 3.5 vengono riportate le generatrici del piano, le relazioni di definizione e la struttura dei *confondimenti*, detti anche '*alias*'.

Termini			
Generatrici	E=BCD	F=ACD	-
Relazioni di definizione	I = BCDE	I= ACDF	I= ABEF
Struttura dei confondimenti (<i>alias structure</i>)	A + BEF + CDF D + ACF + BCE AD + CF BC + DE	B + AEF + CDE D + ACF + BCE AE + BF BD + CE	C + ADF + BDE F + ABE + ACD AF + BE + CD

Tabella 3.5: generatrici del piano, relazioni di definizione e *alias*

3.5.2 Acquisizione dati e modellazione della crescita

La crescita del fungo è stata dettagliatamente monitorata acquisendo giornalmente fotografie ad alta risoluzione di ogni piastra, con l'ausilio di una fotocamera digitale reflex (Canon EOS 50d, sensore da 15 mega pixel). Tutte le foto sono state scattate con l'ausilio di un solido treppiede e acquisite in formato camera (*file 'raw'*), per poter poi essere elaborate in maniera più accurata. Visto l'elevato numero di immagini generate, oltre 2000, si è deciso di implementare '*in house*' una procedura semi automatica: per mezzo del software Adobe Photoshop® (e di azioni *batch*), le foto sono selezionate automaticamente, ritagliate opportunamente e poi convertite in bianco e nero. Successivamente, la superficie della piastra coperta da micelio fungino viene selezionata e si eliminano le informazioni dei pixel eccedenti che non sono di interesse (creando uno sfondo bianco). Infine, l'immagine elaborata e contenente le sole informazioni relative al micelio, vengono convertite in formato 'jpeg' per poter essere utilizzato in Matlab®. Anche in ambiente Matlab® è stato scritto un programma dedicato che permetteva di binarizzare i file jpeg ottenuti e attribuire un valore relativo all'area del micelio, per risalire alle dimensioni della popolazione fungina. Si è deciso di adottare questa procedura automatizzata per ovviare principalmente ai problemi di una crescita non perfettamente radiale. Nella figura 3.8 è riportata un'immagine del micelio in fase di crescita all'interno di una piastra e la relativa immagine rielaborata automaticamente dal software.

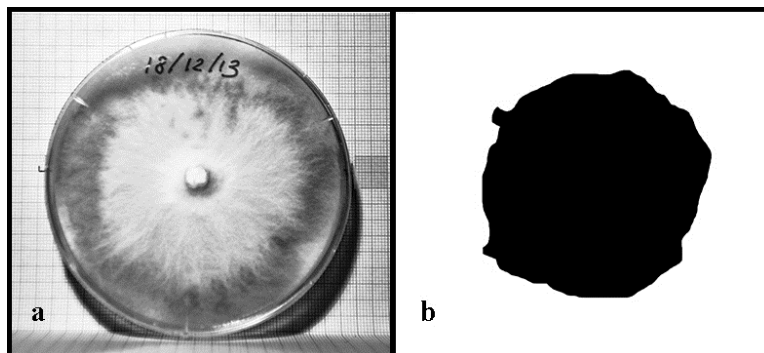


Figura 3.8: Binarizzazione foto acquisite. a) foto acquisita, b): micelio selezionato per calcolo area - foto G. Saiu

Come descritto nel capitolo 2, la modellazione della crescita del micelio è effettuata per mezzo di un'equazione di tipo sigmoidale, l'equazione di Gompertz (eq. 2.3). Dai dati sperimentali acquisiti è possibile ottenere delle stime per i parametri biologici del modello di Gompertz per tutti gli esperimenti, con particolare riferimento alla velocità di crescita μ [die⁻¹] (Seber et al, 2003). La ricerca dei parametri è effettuata ricorrendo all'algoritmo di *Levenberg-Marquardt* implementata in Matlab®.

Come si può vedere nel grafico riportato in figura 3.9, riguardo la popolazione fungina espressa come area rilevata nel tempo, la curva di regressione segue i punti sperimentali e gli intervalli di confidenza della previsione del modello mostrano come l'eventuale errore di stima sia contenuto, soprattutto nella fase esponenziale, che è quella di maggior interesse per il calcolo della velocità di crescita. In appendice A1 vengono riportate ulteriori curve di crescita e regressioni per un set completo di prove, con il riferimento delle condizioni sperimentali in base alla prova sperimentale 'run' definito in tabella 3.4.

$$\frac{dA}{dt} = \mu \cdot A(\log A_{\infty} - \log A) \quad (2.3)$$

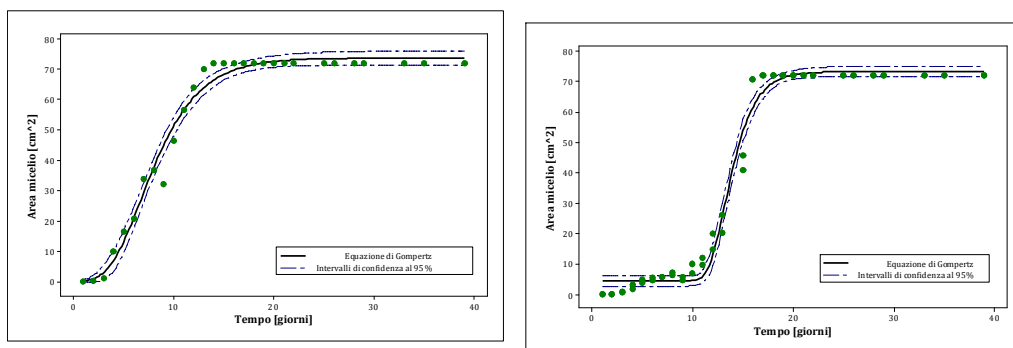


Figura 3.9: Curve di crescita in termini di aree per diversi esperimenti su piastre di Petri

Nella tabella 3.6, sono riportati i parametri caratteristici del modello stimati per le diverse misure sperimentali. Nella prima colonna vengono riportati gli esperimenti, i cui dettagli sono stati presentati nelle tabelle 3.3 e 3.4, la fase di acclimatazione rilevata, l'area dopo dieci giorni e l'area massima raggiunta dal micelio durante la fase di prova e, infine, la velocità di crescita. Per brevità i dati riportati sono espressi come medie dei valori stimati, ma si ribadisce che per l'analisi del piano fattoriale e per l'analisi statistica dei dati si è ovviamente tenuto conto di tutti i valori puntuali.

Come si può notare durante il periodo di prova non tutte le piastre sono state ricoperte per intero dal micelio fungino, a causa delle diverse condizioni sperimentali e soprattutto per via della presenza degli inquinanti che, soprattutto il crisene, ne hanno inibito la crescita. L'analisi completa del piano sarà descritta nel successivo paragrafo.

<i>Run</i>	<i>Lag P. [die]</i>	<i>A_{10die} [cm²]</i>	<i>A_{max} [cm²]</i>	<i>μ [die⁻¹]</i>
01	3	5.09	13.09	2.40
02	5	7.05	56.99	5.29
03	14	0.55	23.12	0.33
04	7	5.06	15.92	2.03
05	30	2.51	72.29	11.63
06	5	5.89	30.64	3.49
07	3	5.34	15.33	1.06
08	4	11.87	27.72	5.48
09	9	1.71	7.21	0.70
10	5	7.76	72.29	5.89
11	6	0.30	10.52	0.00
12	40	0.30	1.62	0.00
13	8	1.52	27.69	1.69
14	3	8.58	72.29	16.55
15	6	3.36	17.63	0.48
16	40	0.30	1.92	0.00

Tabella 3.6: Riepilogo costanti calcolate, espresse come valori medi

3.5.3 Analisi del piano fattoriale

Per monitorare la crescita si è ritenuto che lo scalare μ (velocità di crescita), sia un parametro imparziale e valida variabile di output per ogni esperimento effettuato. Questo ci ha permesso di analizzare il piano fattoriale e valutare la risposta del sistema dovuta ai diversi fattori. Utilizzando il metodo di Yates (Nelson et al, 2003) si sono calcolati gli effetti sul sistema in base alla velocità di crescita stimata. Una prima analisi è stata condotta costruendo la carta di Pareto in base agli effetti calcolati, figura 3.10. Questo grafico a barre, mette in ordine decrescente e in valore assoluto gli effetti, creando un diagramma di facile ed intuitiva lettura. Nel grafico è inoltre riportata una soglia ottenuta con un test di significatività statistica, test-*t*, che ci permette di individuare quali fattori ed effetti combinati sono statisticamente significativi per la crescita del fungo. Il valore di soglia per il test è pari a $\alpha=0.05$.

Come mostrato dal grafico in figura 3.10, i fattori che danno il maggiore impatto sulla velocità di crescita, sono, in ordine di importanza: il peptone, il crisene, l'interazione doppia pirene-lecitina, il solfato di rame, il Tween80, l'interazione pirene-Tween80. Anche l'interazione di terzo livello ABD (pirene, rame, tween80) risulta significativa per il livello di significatività scelto. Tale interazione è da prendere comunque con cautela e richiede ulteriori indagini. Per maggiore chiarezza viene riportato anche il grafico in figura 3.11 (dei singoli effetti), che mostra in che modo i singoli fattori influenzino la crescita del fungo. In particolare il solfato di rame e il Tween80® accelerano lo sviluppo del fungo, mentre peptone e crisene decelerano sensibilmente lo sviluppo del micelio. pirene e lecitina non hanno dato risultati statisticamente significativi nell'intervallo di concentrazioni qui esplorato. Questo aspetto induce a pensare che il fungo ben tolleri il pirene e poco si adatti al crisene, ma questo verrà approfondito successivamente nella campagna sperimentale in beute agitate. Un altro grafico molto utilizzato in questo tipo di analisi di tipo statistico è la rappresentazione dei dati in scala probabilistica, riportato in figura 3.12. Anche in questo caso è possibile vedere quali sono gli effetti che si scostano dal comportamento 'normale' e sono statisticamente significativi ai fini della crescita del fungo. In particolare i punti segnati con i quadrati rossi, che si discostano significativamente dalla retta per un valore $\alpha=0.05$, confermano quanto già rappresentato nel diagramma di Pareto. Anche il test ANOVA conferma quali sono i fattori ritenuti significativi. Inoltre, esso fornisce ulteriori strumenti di analisi grazie al calcolo del *p-value* (definito al capitolo 2) per ogni effetto ed interazione.

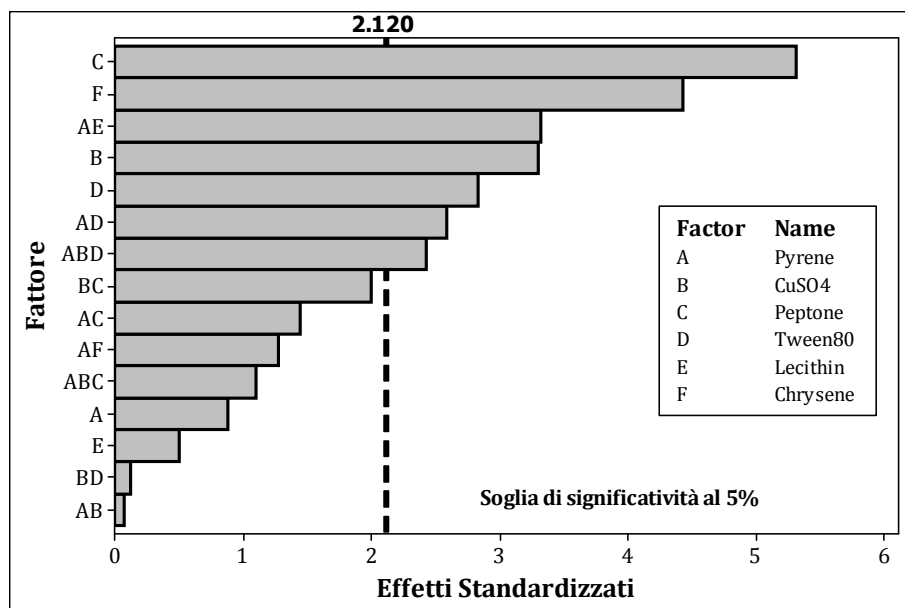


Figura 3.10: Carta di Pareto per gli effetti calcolati sul piano 2^{6-2} (adimensionale)

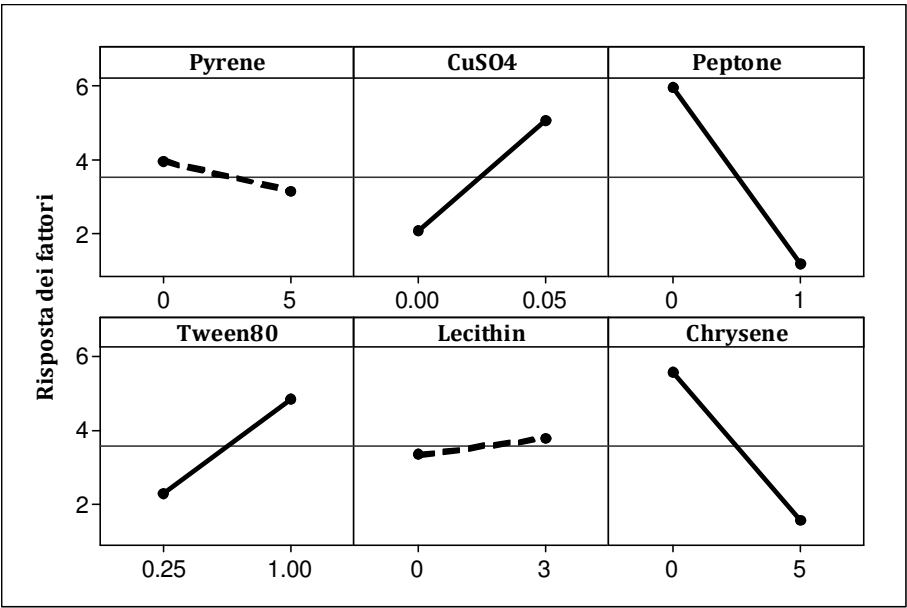


Figura 3.11: Diagramma degli effetti principali

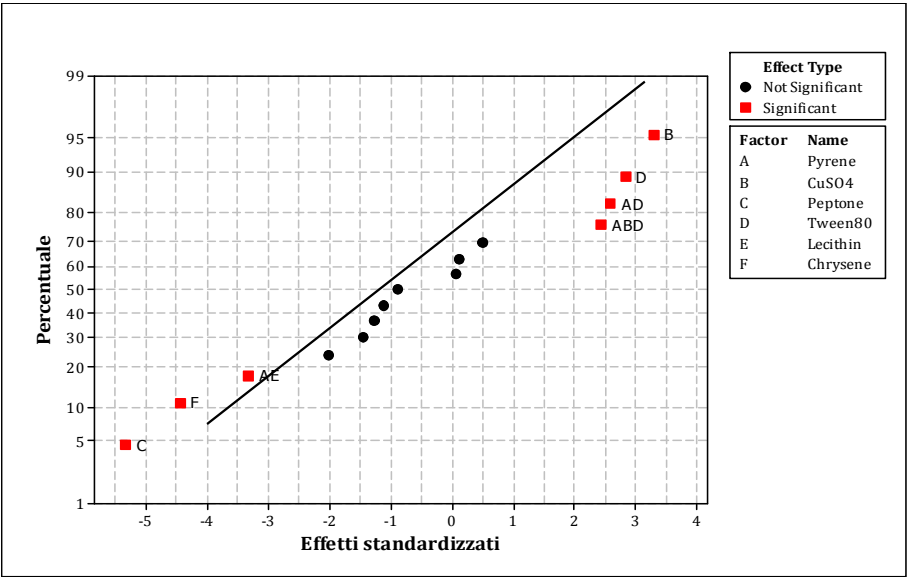


Figura 3.12: Diagramma di probabilità normale, per effetti standardizzati

I risultati del test ANOVA sono riportati in tabella 3.7, dove i fattori statisticamente significativi sono evidenziati con un asterisco e il relativo *p-value* viene riportato in grassetto. Nella tabella riepilogativa dell'analisi statistica si trovano i seguenti termini: grado di libertà (Gdl), somma dei quadrati (SS), media dei quadrati (MS), il parametro *F-ratio* e il corrispettivo *p-value*. Si considerano significativi i termini che passano il test imponendo un valore di alfa pari al 5% (errore di prima specie).

Sorgente	Gdl	SS	MS	F-ratio	p-value
Effetti principali	6	439.474	73.246	11.30	0.000
Pirene	1	5.102	5.102	0.79	0.388
CuSO ₄ (*)	1	70.514	70.514	10.87	0.005
Peptone (*)	1	183.003	183.003	28.22	0.000
Lecitina	1	1.613	1.613	0.25	0.625
Tween80(*)	1	52.208	52.208	8.05	0.012
Crisene (*)	1	127.034	127.034	19.59	0.000
Interazioni doppie	7	165.221	23.603	3.64	0.015
Pirene-CuSO ₄	1	0.033	0.033	0.01	0.944
Pirene-Peptone	1	13.614	13.614	2.10	0.167
Pirene-Tween80 (*)	1	43.596	43.596	6.72	0.020
Pirene-Lecitina (*)	1	71.441	71.441	11.02	0.004
Pirene-Crisene	1	10.513	10.513	1.62	0.221
CuSO ₄ -Peptone	1	25.927	25.927	4.00	0.063
CuSO ₄ -Tween80	1	0.097	0.097	0.01	0.904
Interazioni triple	2	46.115	23.057	3.56	0.053
Pirene-CuSO ₄ -Peptone	1	7.855	7.855	1.21	0.287
Pirene-CuSO ₄ -Tween80(*)	1	38.26	38.26	5.90	0.027
Errore residuo	16	103.748	6.484		
Errore puro	16	103.748	6.484		
Totale	31	754.557			

Tabella 3.7: analisi di varianza per piano fattoriale 2⁶⁻² (Adimensionale)

La struttura e la buona risoluzione del piano frazionario scelto (2⁶⁻²) hanno inoltre reso possibile interpolare i risultati ottenuti dall'analisi del piano, per ottenere un modello di stima del primo ordine che, tenendo conto dei parametri sopra la soglia di significatività, ci permette di stimare la velocità di crescita in base alle condizioni sperimentali. Ovviamente, tale modello è valido solo nell'intervallo di valori esplorato e sarebbero da prendere con cautela eventuali estrapolazioni. Il modello, che è di tipo polinomiale, è riportato in equazione 3.1. I coefficienti sono stati normalizzati per permettere un confronto immediato del contributo apportato dai fattori sul sistema.

$$\begin{aligned} \mu = & 3.564 - 2.391x_{pep} - 1.992x_{cry} - 1.494x_{pyr}x_{lec} + 1.484x_{CuSO_4} + 1.277x_{T80} \\ & + 1.167x_{pyr}x_{T80} + 1.093x_{pyr}x_{CuSO_4}x_{T80} \end{aligned} \quad (3.1)$$

Come rilevato dall'analisi statistica dei dati si è inoltre trovata la presenza di interazioni doppie tra fattori. La più importante è quella tra il pirene e la lecitina di soia, che viene confermata anche grazie alle curve di isolivello riportate nella figura 3.13 (Sn), che evidenziano la marcata curvatura dovuta all'interazione tra i due composti. Dai risultati ottenuti dal test *ANOVA* il contributo della lecitina come effetto singolo non risulta statisticamente significativo, mentre l'interazione doppia con il pirene ha portato ad un valore di *p-value* pari a 0,004. Analizzando il comportamento del sistema si può vedere, sempre in figura 3.13, che per alti livelli di lecitina e pirene si ha una diminuzione della velocità di crescita del fungo che, come prevedibile, aumenta in presenza di alti livelli di lecitina e assenza di pirene. Si ricorda che la lecitina di soia, in questi esperimenti, è stata scelta per la sua duplice proprietà di fonte aggiuntiva di carbonio e agente emulsionante (surfattante) e perché talvolta è impiegata come substrato di crescita per diverse colture microbiche.

Anche il Tween80 mostra un'interazione statisticamente significativa con il pirene, come evidenziato dal valore di *p-value* rilevato pari a 0,020. Il comportamento del fungo in presenza di livelli alti sia di pirene che di Tween80, è quello di raggiungere valori massimi della velocità di crescita, probabilmente per via dell'aumentata biodisponibilità del pirene, che potrebbe essere una fonte di carbonio aggiuntiva se degradata, aspetto che verrà trattato successivamente. Questo andamento è confermato anche dal crescere delle velocità μ all'aumentare del Tween80, come chiaramente mostrato in figura 3.13 (Dx) che riporta le curve di isolivello per l'interazione tra i due composti.

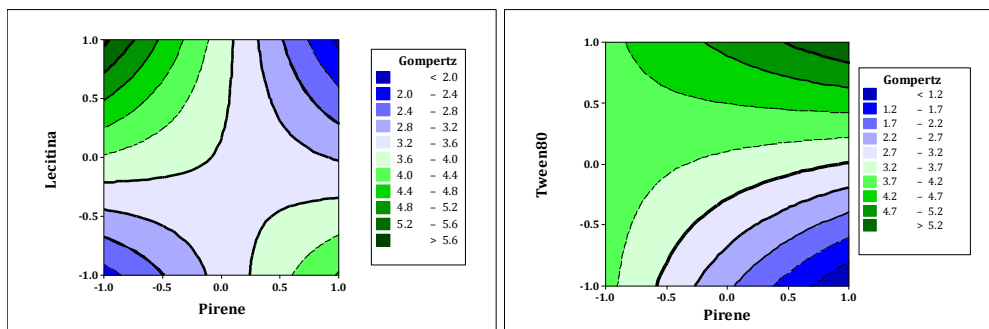


Figura 3.13: Curve di isolivello per interazioni doppie pirene-lecitina e pirene-Tween80

Infine, l'analisi statistica rileva la presenza di un'interazione di terzo livello tra pirene, Tween80 e solfato di rame, con un valore calcolato di *p-value* pari a 0,027. La contemporanea presenza dell'agente mobilizzante, che tende ad aumentare la biodisponibilità dei composti presenti nel *medium* e il solfato di rame, che è risultato essere uno stimolatore per la produzione della Laccasi (Dittmer *et al*, 1997, Soden & Dobson, 2001), portano ad ottenere valori di velocità di crescita superiori alle altre condizioni sperimentali.

Per valutare l'adattamento del fungo alle condizioni di crescita del *medium* e l'impatto degli inquinanti sulla crescita, si è fatta una valutazione dell'output del piano sperimentale dopo dieci giorni di prova, valutando l'area di copertura raggiunta per ogni piastra e non la velocità di crescita specifica. L'effetto positivo sulla crescita di micelio, dato dal solfato di rame e dal Tween80 viene confermato, così come gli effetti inibenti dati da peptone e crisene. In questa prima fase (10 giorni), che potremmo pensare di acclimatazione al nuovo substrato, l'effetto del pirene risulta statisticamente significativo e rallenta la crescita del micelio. Questo risultato per il pirene, è differente al risultato dell'analisi del piano fattoriale fatta analizzando le velocità di crescita (che rileva una non significatività del pirene), ma è probabilmente dovuto all'adattamento del fungo a tale molecola. Per meglio visualizzare i risultati appena descritti, si riporta in figura 3.14 il diagramma degli effetti principali e in figura 3.15 il diagramma di probabilità normale, che indica con i quadrati rossi gli effetti statisticamente significativi.

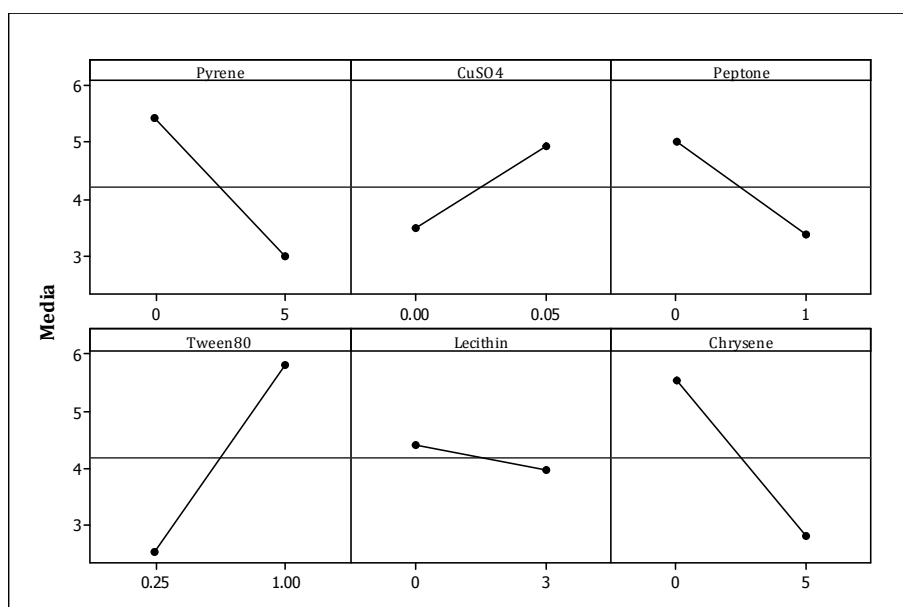


Figura 3.14: Diagramma degli effetti principali (aree dopo 10 gg)

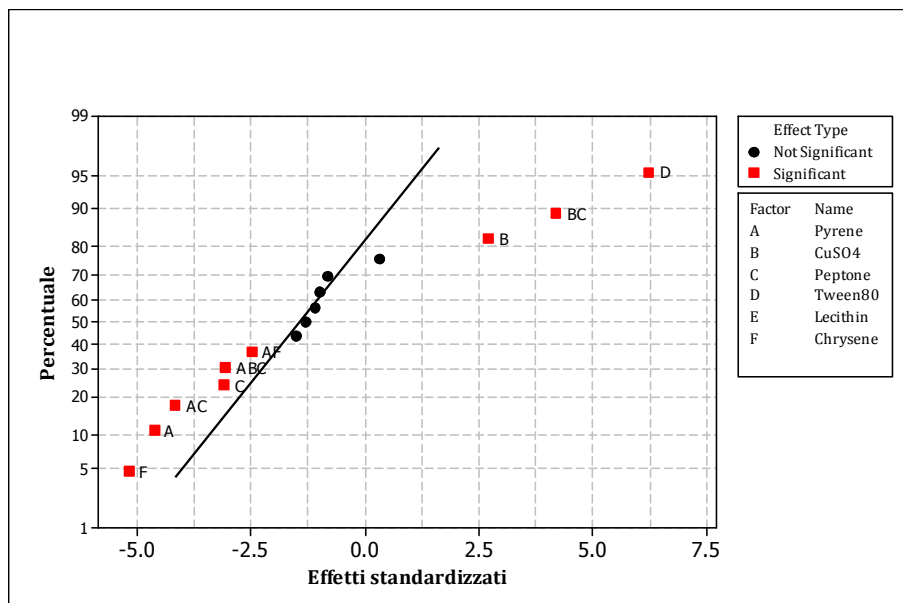


Figura 3.15: Diagramma di probabilità normale, per effetti standardizzati (aree dopo 10 gg)

3.5.4 Campagna sperimentale in beute agitate

Grazie ai risultati della campagna di screening effettuata con l'esposizione del *Pleurotus* s.c. agli inquinanti per verificarne la tolleranza, è stato possibile proseguire con ulteriori prove, mirate alla verifica della degradazione degli IPA. In particolare si riportano gli esiti di una campagna sperimentale effettuata in beute contenenti *medium* liquido.

Il fungo ha mostrato una buona tolleranza rispetto al pirene e, rilevato che lo sviluppo del micelio viene accelerato in presenza del solfato di rame e dalla contemporanea presenza del surfattante, il Tween80, si è riprodotto un *medium* di crescita liquido contenente questi due composti a livelli di concentrazione ottimali, scelti in base alla succitata campagna sperimentale. I valori di concentrazione sono stati scelti pari a 0,05 [mM] per il CuSO₄, e di 7,5 [g/l] per il Tween80, mentre il Policiclico Aromatico è stato valutato su due livelli di concentrazione, rispettivamente 5 e 10 [mg/l]. Per buona prassi si sono aggiunte anche delle 'beute di controllo', che presentano lo stesso mezzo di crescita ma non il pirene. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in doppio, in un incubatore a controllo elettronico di temperatura e velocità di oscillazione (*New Brunswick Scientific – Excella E24 incubator*). Per l'esecuzione della campagna sperimentale si è proceduto con una fase preliminare di ringiovanimento del fungo, su piastre di Petri contenenti il *medium* di base (estratti di malto e lievito), proseguendo poi con l'inoculo del micelio fungino, in ambiente sterile, in delle beute il cui *medium* era stato preventivamente sterilizzato (in autoclave) e conteneva le diverse concentrazioni di inquinante, oltre che rame e surfattante. In tabella 3.8 è riportato un riepilogo della composizione del *medium* e in figura 3.16 sono riportate alcune

immagini della fase di inoculo, effettuato in una cappa a flusso laminare, e l'interno dell'agitatore meccanico con le beute contenenti il micelio fungino in fase di crescita. Le prove sono state condotte per circa 40 giorni all'interno di un agitatore meccanico a temperatura controllata (25 °C). Durante le prove, con cadenza bisettimanale e sempre in condizioni di massima sterilità, sono stati eseguiti dei piccoli prelievi di sospensione per effettuare le analisi chimiche (circa 4 ml).

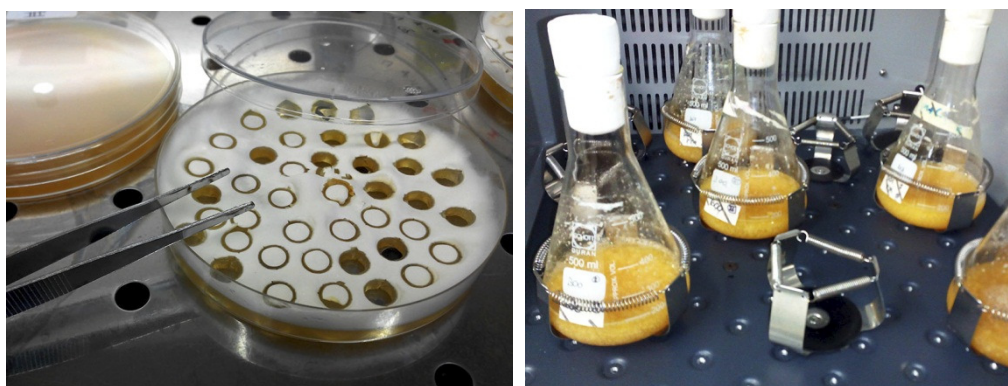


Figura 3.16: Fase di inoculo e beute contenenti il micelio fungino in fase di crescita - foto G. Saiu

Composto	Quantità	Unità
Estratto di lievito	0,5	%
Estratto di malto	1,5	%
Tween80	0,75	%
CuSO ₄	0,05	mmol
Pirene	0 – 5 - 10	mg/l

Tabella 3.8: Dettaglio concentrazioni delle prove sperimentali

3.5.5 Analisi dei risultati

Durante la campagna sperimentale sono stati prelevati dei campioni bisettimanalmente per via dei tempi caratteristici della crescita del fungo, congelando immediatamente i campioni ed analizzandoli poi in seguito tutti assieme. I risultati delle analisi chimiche sono mostrati in figura 3.17, dalla quale si rileva una riduzione del pirene già dal decimo giorno e la degradazione quasi completa in circa 16/18 giorni. Le analisi riportano i risultati relativi ai due livelli di concentrazione di pirene (5 e 10 mg/l) e sono state ottenute per mezzo di cromatografia liquida ad alte prestazioni, utilizzando il metodo validato EPA 8310, i cui dettagli sono riportati nella tabella 3.1. Le analisi hanno permesso di rilevare anche la formazione di un metabolita predominante, del quale non è stata ancora accertata con precisione la struttura molecolare. Il profilo di formazione del metabolita è riportato in termini di aree normalizzate (per ovvi motivi) nella figura 3.18. Le analisi si riferiscono alla prova eseguita su una concentrazione di pirene di 5 [mg/l], che ha lo stesso profilo delle analisi svolte sulla prova a concentrazione doppia, almeno in via qualitativa. Il diagramma contiene anche il profilo

di concentrazione del pirene nel tempo, per mettere in evidenza come la formazione del metabolita si generi esattamente durante la scomparsa dell'inquinante. Si ribadisce che, vista la bassa solubilità del pirene in acqua, circa 0,035 [mg/l], la presenza dell'agente emulsionante è fondamentale per il raggiungimento di tali concentrazioni in soluzione. Questo ci ha permesso di verificare la capacità degradativa del fungo a livelli di concentrazione che è più ragionevole trovare in sedimenti marini o fluviali, piuttosto che in acque superficiali o di falda.

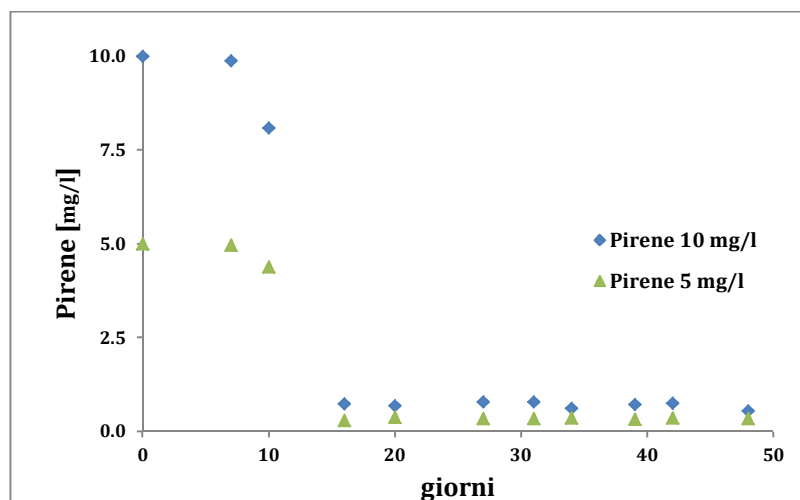


Figura 3.17: Analisi HPLC, degradazione del pirene per due prove sperimentali

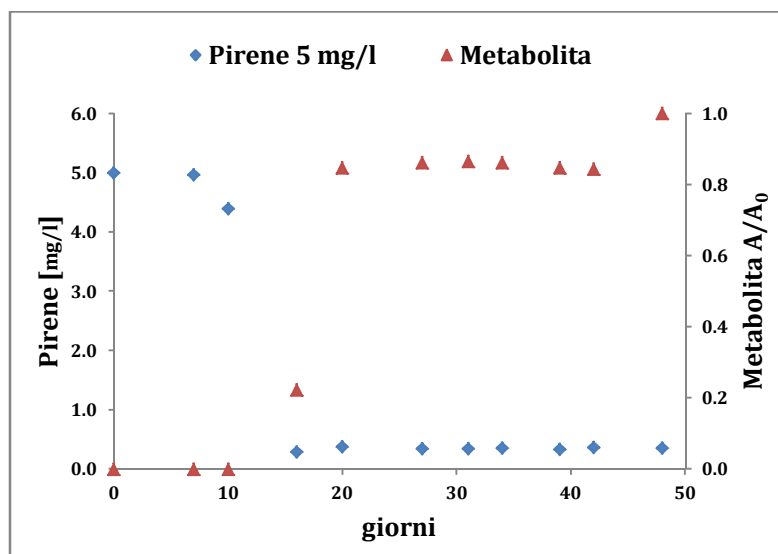


Figura 3.18: Consumo del pirene per conc. di 5 mg/l e profilo del metabolita formato (area picchi normalizzata)

Inoltre, per verificare l'effettiva degradazione del pirene anche nel micelio fungino in sospensione, così da escludere un eventuale adsorbimento del composto nelle cellule del fungo, sono state fatte ulteriori analisi. I campioni sono stati centrifugati per separare il micelio sospeso nella soluzione e si è proceduto all'analisi chimica per estrazione con solventi, come se si trattasse di un solido. Per la fase di estrazione, come già illustrato nella parte generale, si è utilizzato un estrattore accelerato che lavora ad alte pressioni e temperature (Dionex® ASE300). Il micelio dopo centrifugazione si presenta mucillaginoso e con una certa umidità residua, ma questo fatto non ha dato particolari problemi. Tutti gli estratti sono poi stati disidratati con apposito trattamento prima dell'analisi, effettuata in gas cromatografia abbinata alla spettrometria di massa, lavorando sia in selezione di massa (SIM) che in acquisizione totale (*Full Scan*). Le analisi hanno confermato la degradazione del pirene anche nella fase solida (cellule del fungo), come riportato in figura 3.19 che mostra in maniera qualitativa come nel tempo la concentrazione del pirene stia diminuendo (*Overlay* di due cromatogrammi selezionati), in analogia a quanto già mostrato in precedenza per la fase liquida analizzata in HPLC. Questi risultati (fig. 3.19) si riferiscono a due campioni prelevati a tempi diversi durante le prove di crescita in beuta, la cui fase solida separata per centrifugazione è stata estratta e analizzata nelle medesime condizioni. La possibilità di utilizzare uno spettrometro di massa garantisce la certezza di identificazione del composto, grazie al riconoscimento delle masse caratteristiche e alla possibilità di confrontare gli spettri di massa con librerie (tipo NIST) e standard ad elevata purezza. In seguito, per capire meglio la natura dei metaboliti prodotti, le analisi sugli estratti condotte in *full scan*, sono state ulteriormente studiate. Dai primi risultati delle analisi degli spettri di massa e dalla presenza di particolari frammenti generati, si può dire con certezza che c'è stata la rottura di almeno un anello condensato e che vi sia la presenza di gruppi OH nella struttura. Purtroppo, non si è raggiunta la precisa identificazione della formula di struttura del principale metabolita generato durante le prove di crescita. Si può comunque dire che tale metabolita è più facilmente degradabile rispetto al pirene, vista la presenza di gruppi OH e il ridotto numero di anelli condensati. Questi fattori lo rendono più appetibile ai microorganismi, vista la sua ridotta aromaticità.

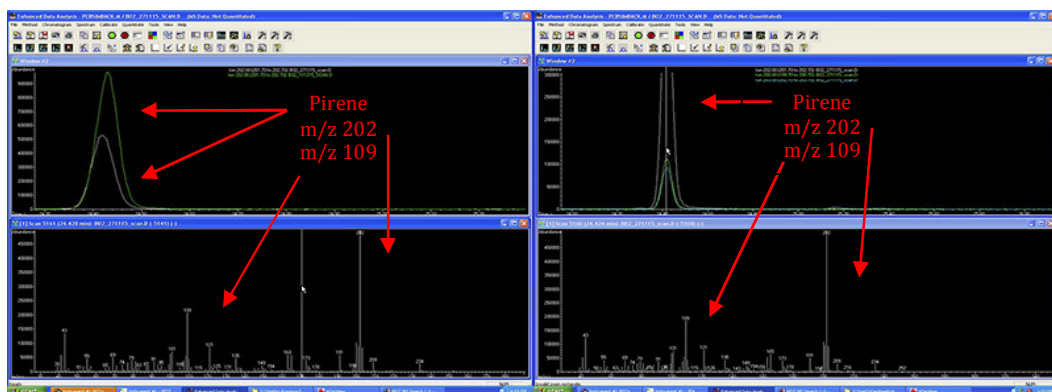


Figura 3.19: Analisi in GC-MS per estratto da micelio durante prove di crescita (Sn) e standard di riferimento per pirene (Dx) con masse caratteristiche

3.6 Conclusioni

Grazie all'utilizzo del *Design of Experiments* e del piano fattoriale frazionario scelto, si è potuta effettuare una campagna sperimentale di *screening* su diversi fattori che influenzano la crescita del *Pleurotus s.c.* e verificarne la tolleranza rispetto al pirene e al crisene. Dall'analisi del piano fattoriale è emerso principalmente che il fungo tollera bene il pirene, quantomeno nell'intervallo di concentrazione esplorato. Si è rilevato che la concomitante presenza di uno stimolatore di produzione di enzimi a base di rame e di un surfattante (Tween80), favoriscono lo sviluppo delle ife fungine durante le prove di crescita su terreni di coltura solidi. Sono state inoltre rilevate delle interazioni statisticamente significative, come quella tra pirene e lecitina e tra pirene e Tween 80, oltre alla presenza di una apprezzabile interazione di terzo livello tra pirene, rame e il surfattante.

Di contro, il fungo pare non tollerare bene il crisene che, nonostante sia un aromatico policiclico con lo stesso numero di anelli condensati del pirene, è refrattario alla biodegradazione e mutageno per alcuni organismi. Si è rilevato che il fungo in presenza di crisene si sviluppa poco e male, o addirittura la crescita si arresta completamente, in funzione delle condizioni del *medium* colturale e dei livelli di concentrazione del crisene stesso. Anche la presenza della fonte aggiuntiva di azoto, dovuta al peptone da caseine, sempre nell'intervallo di concentrazioni esplorato, non ha dato risultati positivi rallentando la crescita del fungo.

Grazie alla campagna sperimentale condotta nelle beute agitate è stato possibile verificare, oltre alle capacità di tollerabilità e crescita in presenza di pirene, le capacità di degradazione del *Pleurotus s.c.* nei confronti di questo inquinante. Sia le analisi in HPLC che in Gascromatografia abbinata alla spettrometria di Massa hanno infatti evidenziato come il pirene venga degradato, non trovandone più sensibili quantità sia nel *medium* che nelle cellule del fungo, nell'arco di 15-18 giorni.

Riguardo ai metaboliti prodotti, anche se non è nota con precisione l'esatta formula di struttura e non sono stati valutati gli intermedi di reazione (che comunque non erano obbiettivo di questo lavoro di tesi), essi risulterebbero di più facile degradazione vista la presenza di gruppi OH e il ridotto numero di anelli condensati (informazioni che si evincono dagli spettri di massa elaborati), che rendono i composti più appetibili ai microorganismi.

Capitolo 4

Biorisanamento e consorzi batterici

L'obiettivo di questo capitolo è investigare la degradazione di microinquinanti ambientali con l'ausilio di consorzi batterici. L'utilizzo di più specie microbiche contemporaneamente pare essere una promettente e valida alternativa all'utilizzo dei singoli ceppi batterici. Questi ultimi, infatti, sono molto efficaci nel degradare singoli composti xenobiotici ma, nel caso di miscele di composti persistenti possono risultare non adeguati, come verrà esposto meglio nello stato dell'arte.

4.1 Stato dell'arte

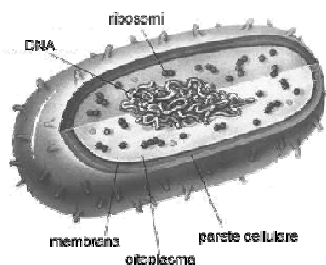
La degradazione di composti organici inquinanti per vie biologiche è forse la maggior autodifesa dell'ambiente a livello globale. Questo fenomeno naturale permette un risanamento spontaneo di terreni e acque. Purtroppo, esistono diversi composti recalcitranti a questi processi spontanei. Tra i composti tossici e persistenti per l'ambiente, gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), sono difficili da biodegradare e la loro refrattarietà spesso aumenta con il peso molecolare, come già visto nel capitolo 2. Questi fattori hanno portato il settore della ricerca a testare tutta una serie di microorganismi, come batteri e funghi, che grazie alle loro capacità metaboliche sono in grado di degradare, ossidare e mineralizzare alcuni IPA, anche ad alto peso molecolare. Alcune specie capaci di degradare i composti più recalcitranti sono i *Rodococcus*, *Burkholderia*, *Stenotropomonas*, *Spingomonas paucimobilis*, ecc. (Walter *et al*, 1991; Juhasz *et al*, 1996; Boonchan *et al*, 1998; Mueller *et al*, 1990). Alcuni studi che hanno utilizzato ceppi di singoli batteri non sono riusciti nello scopo della degradazione degli IPA, per molecole con cinque o più atomi di carbonio. Attualmente per effettuare una più efficace degradazione e possibilmente la mineralizzazione completa di tali composti, si può ricorrere ad un'azione congiunta di più specie microbiche che, grazie alla produzione di diversi enzimi e attraverso diversi percorsi metabolici e cometabolici, possano portare alla completa mineralizzazione degli inquinanti (Mrozik, 2003; Zhong *et al.*, 2011; Janbandhu and Fulekar, 2011). Quest'ultimo aspetto è molto importante in quanto è fondamentale, a seguito di attività degradative parziali, evitare la formazione di nuovi composti tossici intermedi solubili in acqua che potrebbero contaminare a loro volta il suolo e le falde acquifere (Lebkowska *et al.*, 2011). Si deve inoltre considerare il fatto che gli IPA sono solitamente presenti nell'ambiente come miscela di più composti della stessa famiglia e a volte vi è la contemporanea presenza di altri composti organici (spesso aromatici alogenati), che contribuiscono a rendere ancora più difficoltosa la degradazione biologica a causa della aumentata tossicità del sito nei confronti dei microorganismi.

Solitamente gli IPA sono trovati in natura in suoli e sedimenti, per via della loro spiccata caratteristica idrofobica, mentre vengono rilevati nelle acque in bassissime concentrazioni. Se però si considerano alcuni trattamenti di rimozione chimico-fisica applicati a terreni o sedimenti inquinati, questi possono generare effluenti liquidi

carichi di inquinanti. Queste acque di processo necessitano a loro volta di un trattamento o di essere smaltite; quindi si può rendere utile sviluppare dei metodi di biodegradazione su matrici liquide acquose. Nelle ultime decadi la comunità scientifica sta inoltre conducendo studi sul metabolismo di degradazione degli IPA per mezzo di microorganismi geneticamente ingegnerizzati. La maggior parte di questi esperimenti sono attualmente su scala di laboratorio, con risultati incoraggianti, che mostrano la potenzialità di alcune specie di degradare più composti inquinanti (Eaton R. W. And Chapman P. J., 1992; Sayler G. S. and Ripp S., 2000).

4.2 I batteri, caratteristiche principali

I batteri, sono microrganismi unicellulari considerati le forme di vita più piccole, più semplici e maggiormente diffuse che ci sono in natura. La cellula batterica è una cellula procariote, cioè costituita da una membrana cellulare, all'interno della quale si trova una zona nucleare, detta nucleotide. Nel nucleotide è contenuto un solo cromosoma circolare costituito da una molecola di DNA, che non è separata dal citoplasma cellulare da alcuna membrana, figura 4.1. I batteri possono avere forma sferica, cilindrica o incurvata, si riportano alcune foto in figura 4.2 eseguite al microscopio elettronico. I batteri sferici sono detti cocci, che nel riprodursi possono formare colonie disposte nello spazio, che prendono il nome di Diplococchi (a coppia), Streptococchi (a catenella) o Stafilococchi (a grappolo). I batteri cilindrici invece, sono generalmente detti bacilli e si dividono in batteri non sporigeni, bacilli e clostridi (sporigeni).



*Figura 4.1: cellula batterica
(foto tratta da letteratura)*

I batteri incurvati, sono detti vibrioni (cilindrici con una curvatura), spirilli (a sinusoide) e spirochete (sinusoidi ravvicinate). La cellula batterica è costituita per circa l'80% da acqua e per il restante 20% da materia secca, di cui il 90% è sostanza organica e il 10% sostanza inorganica. La frazione organica della sostanza cellulare può essere rappresentata con una formula bruta che tiene conto del rapporto in peso tra gli elementi più importanti, carbonio, idrogeno, azoto e ossigeno: $C_5H_7NO_2$. I batteri per il loro metabolismo utilizzano sia composti organici carboniosi disciolti (batteri eterotrofi) che l'azoto ammoniacale (batteri autotrofi chemiosintetici). Per questo motivo essi sono i principali *responsabili* della rimozione biologica, anche per via spontanea, del COD e del BOD disciolto nelle acque.

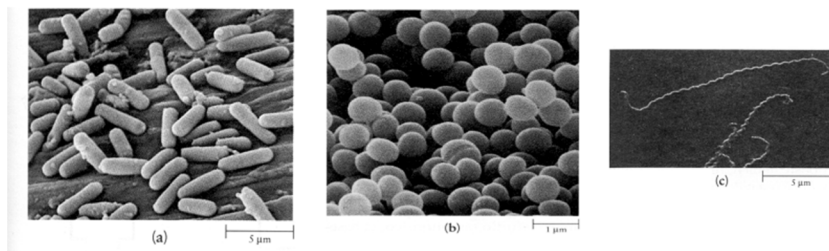


Figura 4.2: Tipologie di batteri, a) bacilli, b) cocci, c) spirilli

La crescita microbica è un processo catalitico che per avvenire ha bisogno di una cellula madre e di un adeguato substrato nutritizio. In esso devono essere contenuti macronutrienti e micronutrienti che servono per assolvere le funzioni cataboliche e anaboliche. La riproduzione cellulare avviene per scissione binaria: ogni cellula si scinde in due cellule figlie, dalla cui fissione si generano nuove cellule. Il tempo di generazione, ovvero l'intervallo di tempo trascorso tra due scissioni successive, può variare da una decina di minuti a tre ore, e dipende dalla specie microbica, dalla natura del substrato e dai fattori ambientali. La generazione di nuove cellule ($G=t/n$) può essere valutata mediante l'equazione 4.1:

$$G = t \cdot \frac{\log 2}{\log N} + \log N_0 \quad (4.1)$$

In equazione 4.1 N è il numero di cellule al tempo t , N_0 è il numero di cellule presenti al tempo iniziale t_0 . La formula si ricava semplicemente noto che il numero di cellule N è dato dal prodotto delle cellule iniziali (N_0) moltiplicato il numero di generazioni 2^N ($N=N_0 \cdot 2^N$), con semplici passaggi matematici si arriva a scrivere la 4.1. La crescita esponenziale microbica non può proseguire indefinitamente, poiché insorgono fattori limitanti quali, per esempio:

- ✚ Carenza del substrato nutritizio;
- ✚ Accumulo di cataboliti del metabolismo batterico;
- ✚ Variazione delle condizioni ambientali ottimali.

L'andamento della crescita microbica, in un ambiente controllato, può essere rappresentato come in figura 4.3. Si possono individuare quattro fasi principali. La prima è la fase di latenza, detta anche fase lag, che rappresenta il tempo trascorso dall'inoculazione alla crescita. Infatti, quando un ceppo microbico è inoculato in un substrato diverso da quello d'origine, è necessario un certo periodo di acclimatazione al nuovo substrato e alle nuove condizioni ambientali. La durata di questa fase può variare da poche ore a mesi e dipende dalle condizioni ambientali, dalla struttura chimica del substrato, dalla concentrazione dei composti, dalla presenza di sostanze inibitrici. È noto che gli enzimi prodotti dai batteri, che sono specifici per un determinato substrato, non sono in grado di svolgere la loro azione in presenza di nuovi

substrati. I batteri dovranno quindi produrre nuovi enzimi per adattarsi ai nuovi substrati e questo comporterà un periodo più o meno breve di tempo che è chiamato appunto fase di latenza. Terminata questa fase inizia la crescita microbica e la degradazione del substrato. La seconda fase corrisponde alla crescita esponenziale, in cui i microrganismi si riproducono per scissione binaria (es. *Escherichia Coli* mediamente si raddoppia in 15-20 min). L'inclinazione di questo tratto di curva dipende dal tipo di microrganismi e dal substrato.

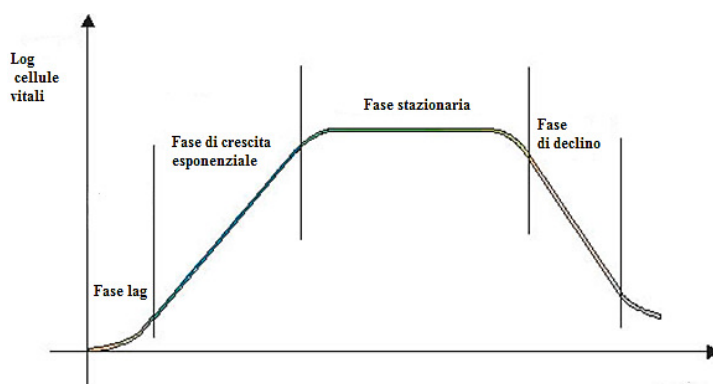


Figura 4.3: Curva di crescita batterica in un sistema chiuso

La fase di crescita esponenziale termina sia per accumulo di prodotti del catabolismo, sia per l'avvenuto consumo dei nutrienti quando questi non vengono reintegrati. Si assiste quindi ad una terza fase di tipo stazionario in cui non si registrano variazioni nella popolazione di batteri, essendoci un equilibrio dinamico tra generazione di nuove cellule e scomparsa di vecchie cellule. Infine si ha la fase endogena, dove il numero delle cellule microbiche diminuisce perché il substrato organico si è ormai esaurito. In questa fase i microrganismi utilizzano per il mantenimento delle funzioni cellulari il substrato da loro stessi accumulato, sotto forma di riserva di lipidi e glicidi, e il protoplasma cellulare dei microrganismi morti.

Si riporta in tabella 4.1 una lista di batteri che sono risultati efficaci nella degradazione aerobica di idrocarburi alifatici, aromatici e composti clorurati.

Gram Negativi	Gram Positivi
<i>Pseudomonas</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Arthrobacter</i>
<i>Xanthomonas</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Cytophaga</i>	

Tabella 4.1: alcuni batteri Gram negativi e positivi

I batteri che sembrano avere maggiori potenzialità sono gli *Pseudomonas* e più precisamente gli *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*. Si riporta a titolo illustrativo nelle figure 4.4 e 4.5, la colorazione di Gram[†] eseguita per la miscela di batteri utilizzati per le prove sperimentali e fotografata tramite un microscopio ottico.

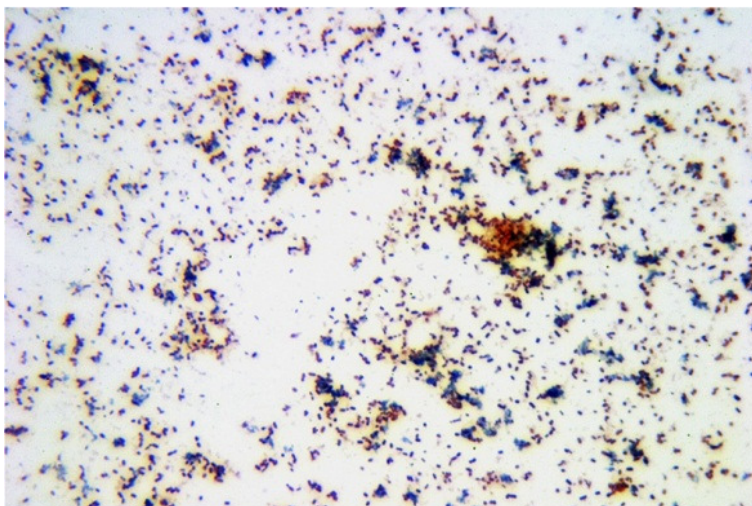


Figura 4.4: Consorzio batterico dopo colorazione di Gram, 400 ingrandimenti - foto G. Saiu

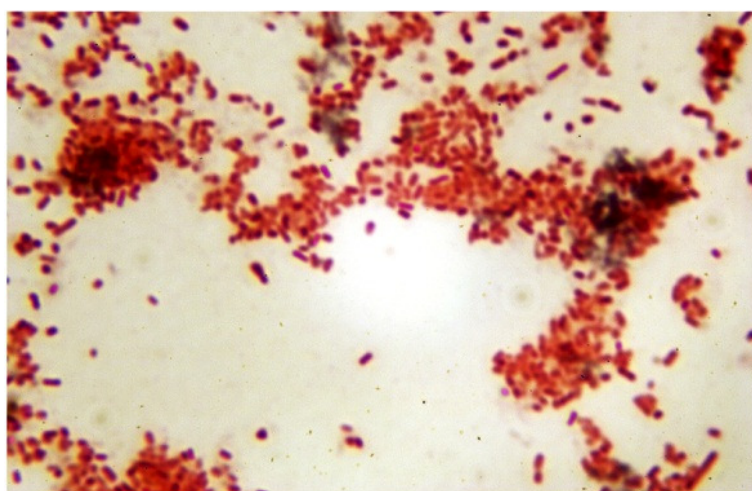


Figura 4.5: Consorzio batterico dopo colorazione di Gram, 1000 ingrandimenti - foto G. Saiu

[†] La colorazione di Gram, sviluppata da Hans Christian Gram nel 1884, è la colorazione maggiormente impiegata in batteriologia per l'esame al microscopio ottico di colture batteriche. Essa permette l'osservazione della morfologia e della disposizione delle cellule batteriche. È una colorazione differenziale che permette di separare i batteri in due gruppi distinti, *Gram positivi* e *Gram negativi*. Sono *Gram positivi* i batteri che risultano colorati di blu-violetto, mentre sono *Gram negativi* quelli di colore rosa. La diversa colorazione, oltre che dai coloranti usati, dipende dalla diversa composizione della membrana cellulare. Le foto sono state eseguite con una reflex digitale, montata su microscopio ottico trinoculare planacromatico a contrasto di fase in campo chiaro, con ingrandimenti da 400X a 1000X.

4.3 Materiali

Di seguito si riporta il materiale utilizzato per condurre le prove sperimentali, come la miscela dei batteri, i reattori di laboratorio, il medium colturale, e i *chemicals*.

4.3.1 Consorzio batterico

Per condurre le prove sperimentali si è utilizzata una miscela di microorganismi chiamata commercialmente *Bulab 5738*, fornito dalla '*Buckman Laboratories International*' che è spesso utilizzata in ambito nazionale per il trattamento di acque di scarico. Per via delle diverse specie microbiche presenti questo consorzio batterico è in grado di degradare diversi substrati organici, anche se molto diversi tra di loro. La miscela di partenza è costituita da un liofilizzato contenente crusca e alcuni enzimi. Più precisamente il contenuto del preparato contiene:

- ✚ substrato di crusca di cereali;
- ✚ microrganismi liofilizzati, appartenenti a diversi ceppi batterici quali *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*;
- ✚ enzimi liberi quali amilasi, cellulasi e lipasi i quali svolgono un ruolo importante nella fase iniziale di crescita batterica;
- ✚ Agenti attivi di superficie.



Figura 4.6: *Bulab 5738* in forma granulare - foto G. Saiu

In tabella 4.2 sono riportate le condizioni che favoriscono uno sviluppo ottimale del consorzio batterico, come indicato dal produttore, *Buckman Laboratories*.

Parametri	Minimo	Ottimo	Massimo
pH	5	7	9
O ₂ disciolto (mg/l)	1	2	---
C/N/P	100/5/1	100/7/1	100/10/1
T [°C]	7.5	25	45

Tabella 4.2: Condizioni ottimali per la crescita del consorzio *Bulab 5738*

4.3.2 Beute e fermentatori

Le prove di crescita sono state condotte in due tipi di reattori, entrambi utilizzati in modalità *batch*: beute di tipo Erlenmayer (figura 4.7 a) e Fermentatore (figura 4.7 b), reattore di più ampio volume. Le beute utilizzate hanno un volume totale di circa 250 ml, ma sono state utilizzate con un volume di 100 ml per permettere una buona aerazione in fase di agitazione. Per evitare contaminazioni esterne nel collo della beuta si pone un tampone di cotone, che permette gli scambi gassosi, ma blocca eventuali inquinamenti esterni da parte di altri microorganismi indesiderati. Durante le prove di crescita le beute sono messe in un agitatore meccanico (230 giri/min), operante a temperatura controllata (30 °C).

Il fermentatore utilizzato è del tipo *LKB 1601 Ultroferm Fermentation System*, in vetro e presenta le seguenti caratteristiche: volume massimo di lavoro 4 litri, agitazione meccanica mediante turbina a sei pale con velocità regolabile, diffusore d'aria a flusso regolabile, 4 frangiflutti verticali e controllo elettronico di temperatura. Il fermentatore ha inoltre la possibilità di controllare e regolare il pH, ma nel corso degli esperimenti non si è presentata la necessità per via del sistema tampone già presente nel *medium* di crescita.

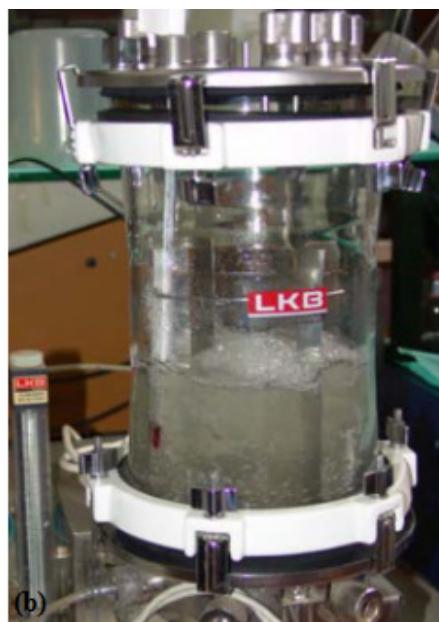


Figura 4.7: **(a)** Beuta tipo Erlenmeyer, **(b)** Fermentatore LKB 1601 Ultroferm Fermentation System
foto G. Saiu

4.3.3 *Medium* di crescita

Il *medium* di crescita utilizzato per le prove di crescita batterica è costituito principalmente da sali inorganici contenenti le sostanze nutrienti necessarie per la crescita microbica, con particolare attenzione ai contenuti di azoto e fosforo (Pawlowsky e Howell, 1973). Il *medium* è stato studiato per riuscire a degradare una quantità di carbonio pari a una concentrazione di glucosio pari a 2 g/l, garantendo tutti i macro e micronutrienti necessari per lo sviluppo delle cellule batteriche. Le fonti nutritive principali presenti sono il glucosio, zucchero utilizzato nella fase di acclimatazione come principale fonte di carbonio, e i sali inorganici che costituiscono le principali fonti di azoto e fosforo. Inoltre il *medium* contiene metalli in tracce e un sistema tampone, dovuto alla presenza di Na_2HPO_4 (Idrogeno-fosfato di sodio) e KH_2PO_4 (di-idrogeno-fosfato di potassio), per garantire il pH ottimale durante la fase di crescita. Nella tabella 4.3 sono riportati i sali e le concentrazioni relative delle soluzioni madri utilizzate; prelevando le quantità di soluzione presenti nella terza colonna e portando il tutto a volume (1 litro), si ottiene un *medium* adatto alla degradazione di una soluzione contenente fino a 2 g/l di glucosio.

Composto	Conc. (mg/l)	Volume da usare
NaCl	50	40
MgSO ₄	100	40
(NH ₄) ₂ SO ₄	500	40
FeC ₃	0.5	40
CaSO ₄	30	80
Na ₂ HPO ₄	873	80
KH ₂ PO ₄	527	40
Acqua distillata	100 [ml/l] di Medium	400

Tabella 4.3: Preparazione del *Medium* di crescita

Per ogni prova il *medium* di crescita è stato modificato adeguatamente in proporzione alla concentrazione di substrato organico presente, in modo che il rapporto dei componenti fosse tale da garantire il giusto apporto degli elementi e microelementi. Tutti i dettagli verranno riportati nella sezione delle prove sperimentali.

4.3.4 Materiali principali utilizzati

Il **Tween80** è prodotto a partire dal 'sorbitan' (polietossilato) e dall'acido oleico, la cui molecola è formata da due parti, una idrofilica composta da polieteri, ossia polimeri dell'ossido di etilene, e da una parte lipofilica dovuta all'acido oleico, il gruppo polisorbato appunto. Il Tween80 viene utilizzato anche nel campo alimentare come emulsionante di alcuni cibi. Ad esempio viene addizionato nel gelato in proporzione del

0,5% in volume, per renderlo più cremoso e maggiormente lavorabile. In tabella 4.4 vengono riassunte le principali caratteristiche di tale composto.

Nomenclatura/sinonimi	<i>Poliossietilene (20) monooleato, E433</i>
Numero CAS	9005-65-6
Formula molecolare	$C_{64}H_{124}O_{26}$
Aspetto fisico	Liquido viscoso di colore giallo chiaro
Peso molecolare	1.310 g/mol
Densità	1.06-1.09 g/ml
Punto di ebollizione	Maggiore di 100°C
Solubilità in acqua (mg/l a 25 °C)	Molto alta
Solubilità in altri solventi	Solubile in etanolo, olio di semi, etil acetate, metanolo, toluene
Principali rischi	Irritante

Tabella 4.4: Principali caratteristiche del Tween80

Il **Catecolo**, o Pirocatecolo, è un polifenolo che deriva dal fenolo per aggiunta di un gruppo -OH in posizione 2. È poco diffuso in natura, ma la sua molecola è spesso presente in numerose molecole biologiche. È attualmente prodotto come composto chimico per la sintesi di pesticidi, aromi e profumi. Il composto risulta incolore ed è presente in piccole quantità nella frutta e nella verdura, spesso assieme all'enzima catecolo ossidasi, è presente nell'olio di Argan ed è presente nel fungo *Agaricus bisporus*. In tabella 4.5 sono riportate alcune caratteristiche chimico fisiche del catecolo.

Nomenclatura/sinonimi	Pirocatecolo, 1,2-diidrossibenzene, Pirocatechina, 1,2-benzendiolo
Numero CAS	120-80-9
Formula molecolare	$C_6H_6O_2$
Aspetto fisico	Solido cristallino incolore
Peso molecolare	110 g/mol
Densità	1.34 g/ml
Punto di fusione	105 °C
Solubilità in acqua (mg/l a 25 °C)	450
Simboli di rischio chimico	
Frasei H†	301+311, 315, 319
Consigli P	301+310, 302+352, 305+351+338, 361, 405, 501

Tabella 4.5: Principali caratteristiche del catecolo

4.3.5 Reidratazione e acclimatazione dei consorzi batterici

Il consorzio batterico utilizzato, acquistato in forma liofilizzata, prima delle prove di crescita deve essere riattivato con una procedura di reidratazione. La crusca contenente la miscela di microorganismi è messa in acqua distillata sotto agitazione e leggermente riscaldata (30 °C) per circa 5-10 minuti. Si lascia quindi sedimentare la crusca e il surnatante è prelevato e centrifugato a 5000 *rpm* per 15 minuti, per recuperare i batteri in sospensione. Come già detto precedentemente i microrganismi appartenenti alla coltura batterica aerobica sono stati forniti liofilizzati su un supporto a base di crusca. Per poter essere usati nelle prove di crescita sono stati prima reidratati e successivamente acclimatati ad un substrato di crescita di facile biodegradazione. La sospensione microbica così riattivata viene centrifugata per recuperare dal fondo delle provette la biomassa, dopo eliminazione del surnatante.

La biomassa recuperata in questa fase è solitamente poca e deve essere accresciuta con dei cicli di crescita in condizioni controllate. In particolare la biomassa recuperata veniva inoculata in del *medium* contenente glucosio, come unica fonte di carbonio, e lasciata sviluppare per circa 10-12 ore. A seguito di ogni ciclo la sospensione veniva centrifugata per recuperare la nuova biomassa ottenuta grazie alla presenza della fonte di carbonio. Solitamente, per questioni di protocollo, prima di ogni prova sperimentale si ripetono tre cicli di 'acclimatazione' per ottenere biomassa attiva e in quantità sufficiente per le prove sperimentali successive.

Per seguire la crescita microbica si è fatto utilizzo di misure indirette tramite letture di torbidità con l'ausilio di spettrofotometri, leggendo l'assorbanza dei vari campioni a 600 nm.

4.4 Analisi chimiche

Per lo svolgimento di questa parte del lavoro di tesi si sono rese necessarie diverse tecniche analitiche, i cui principi di base sono stati introdotti nel capitolo due. Si è fatto principalmente utilizzo di spettrofotometri per seguire le varie fasi di crescita dei consorzi batterici, con letture di torbidità a 600 nm e in particolare, per approfondire le indagini legate alle prove sperimentali, si sono fatte analisi in cromatografia liquida (HPLC). Visti gli esigui volumi di lavoro utilizzati per le prove (100 ml) non è stato possibile effettuare prelievi di campione durante il transitorio della misura sperimentale. Le analisi chimiche si sono quindi limitate a valutare i prelievi effettuati al tempo iniziale (quindi prima dell'inoculo con i batteri) e a fine campagna sperimentale, con lo scopo di verificare l'eventuale rimozione dei composti inquinanti.

Principalmente si sono effettuate analisi cromatografiche, a seguito della seguente procedura: i campioni prelevati sono stati filtrati con filtri in PTFE di porosità pari a 0,20 μm direttamente in dei *vials* inertizzati da 2 ml, adatti ad analisi cromatografiche e successivamente sono stati analizzati con il metodo validato EPA 8310, i cui dettagli sono riportati in tabella 4.7. Tutti i campioni prelevati, sia al tempo iniziale (pre-

inoculo) che a fine prova (al raggiungimento della fase stazionaria), sono stati congelati per poter effettuare successivamente le analisi in un unico set di campioni per campagna sperimentale. Questo ha permesso di utilizzare la stessa taratura strumentale per tutti i campioni e operare nelle medesime condizioni.

Metodo	EPA 8310		
Colonna	Zorbax Eclipse plus C18 4.6x100mm, 3,5 µm particle size		
HPLC	Agilent 1200 infinity		
Detector	DAD: 230, 240, 254, 270, 350 nm e 400 nm per riferimento		
Solventi	Acqua (A) – Acetonitrile (B)		
Vol. Iniezione	5 µl		
Modalità pompa	Gradiente (%)		
	min	A	B
	0-2	60	40
	2-16	5	95
	16-18	60	40
Temperatura	25 °C		
Run time	18 min		

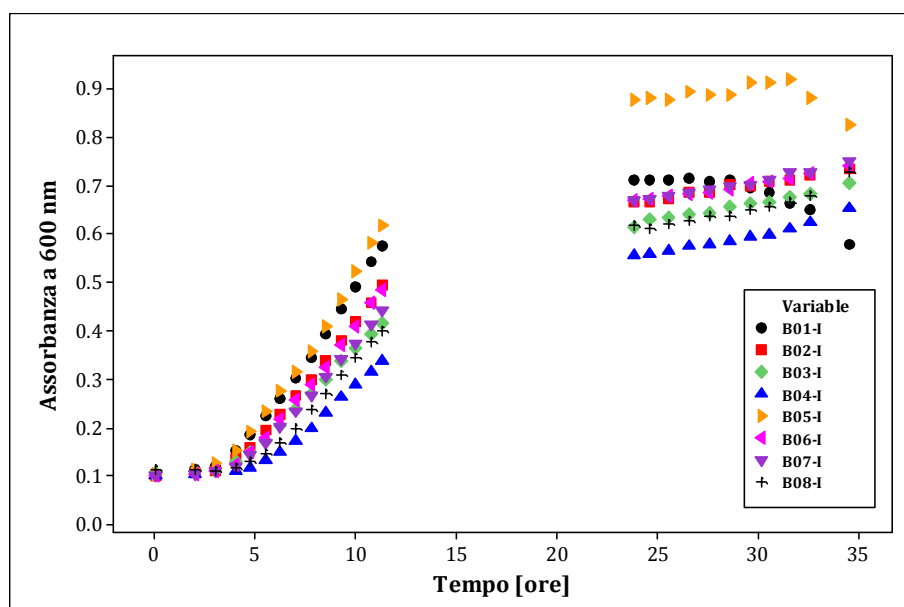
Tabella 4.7: dettagli metodo EPA 8310 analisi HPLC

4.5 Prove sperimentali con i consorzi batterici

Il comportamento del consorzio batterico è stato studiato al variare di tre fattori: concentrazione di pirene, concentrazione di fenantrene e concentrazione di catecolo. Si è ritenuto utile investigare una eventuale dipendenza del processo dalla presenza del catecolo dato che è un composto fenolico presente spesso negli intermedi di degradazione di composti organici con anelli aromatici (Cerniglia *et al*, 1994; Gibson *et al*, 1975). La campagna sperimentale consiste quindi in un piano fattoriale completo a 3 fattori (2^3) per via della presenza dei due inquinanti selezionati e del polifenolo, ed eseguito su due livelli di concentrazione.

I composti scelti, pirene, fenantrene e catecolo, sono stati fatti variare congiuntamente in concentrazioni comprese tra 5 e 15 mg/l, applicando i principi fondamentali del *Design of Experiments* (DoE) come variazione, replicazione e casualizzazione. Le prove sperimentali replicate, sono riportate nella tabella 4.8, per un totale di 16 esperimenti, tutti condotti in beute di tipo *Erlenmayer*.

Run	Pirene [mg/l]	Fenantrene [mg/l]	Catecolo [mg/l]
1	5	5	5
2	15	5	5
3	5	15	5
4	15	15	5
5	5	5	15
6	15	5	15
7	5	15	15
8	15	15	15

Tabella 4.8: dettagli piano fattoriale 2^3 Figura 4.8: Curve di crescita per una replica del piano fattoriale 2^3

Per monitorare la fase di crescita si è fatto utilizzo di misure di assorbanza a 600 nm, che sono state successivamente modellate con un'equazione di tipo sigmoideale. Per tutte le prove sperimentali, la popolazione al tempo iniziale era pari ad una concentrazione di inoculo di batteri che portava ad una lettura di torbidità pari a 0,1 di unità di assorbanza, a 600 nm. Da un'attenta analisi della figura 4.8, che riporta le curve di crescita per una replica completa del piano fattoriale, si rileva una seconda fase di crescita che mostra un andamento di tipo *diauxico*. Questo andamento è attribuibile alla presenza di più fonti di carbonio presenti nel *medium* colturale, che sono unicamente il catecolo, il fenantrene ed il pirene. Si potrebbe quindi ipotizzare un consumo sequenziale dei substrati, a partire da quelli di più semplice degradazione, come il catecolo, seguito poi dal consumo di fenantrene e pirene. Nel merito della degradazione

dei composti inquinanti e del polifenolo si parlerà più diffusamente nei successivi paragrafi. Si precisa che nelle curve di crescita riportate in figura 4.8 e in appendice A.2, il *gap* tra i dati sperimentali, coincide con le ore notturne dove non è stato possibile raccogliere i dati.

Relativamente alla modellazione della crescita microbica, il modello di Gompertz non è in grado di modellare la crescita *diauxica* e neppure la fase endogena, ma risulta adeguata per descrivere la fase di acclimatazione e la prima fase esponenziale. Si è quindi utilizzata l'equazione 2.3 per stimare la velocità di crescita nel primo tratto esponenziale (μ_1), mentre si è calcolata la velocità di crescita del secondo tratto per mezzo di una regressione lineare (μ_2) con l'equazione 2.3b, che ben si adattava ai punti sperimentali acquisiti. Per questo secondo tratto si è ipotizzata una cinetica di ordine zero.

$$\frac{dA}{dt} = \mu_1 \cdot A(\log A_\infty - \log A) \quad (eq. 2.3)$$

$$\frac{dA}{dt} = \mu_2 \quad (eq. 2.3b)$$

Come si può vedere nel grafico riportato in figura 4.9 (prova sperimentale 'Run07-I'), relativamente alla popolazione del consorzio microbico espresso come assorbanza a 600 nm, la curva di regressione segue i punti sperimentali e gli intervalli di confidenza della previsione del modello mostrano come l'eventuale errore di stima sia molto contenuto, soprattutto nella fase esponenziale, che è quella di maggior interesse per il calcolo della velocità di crescita. Tutte le regressioni e i relativi grafici, quantomeno per una replica del piano fattoriale, sono riportate in appendice A.2.

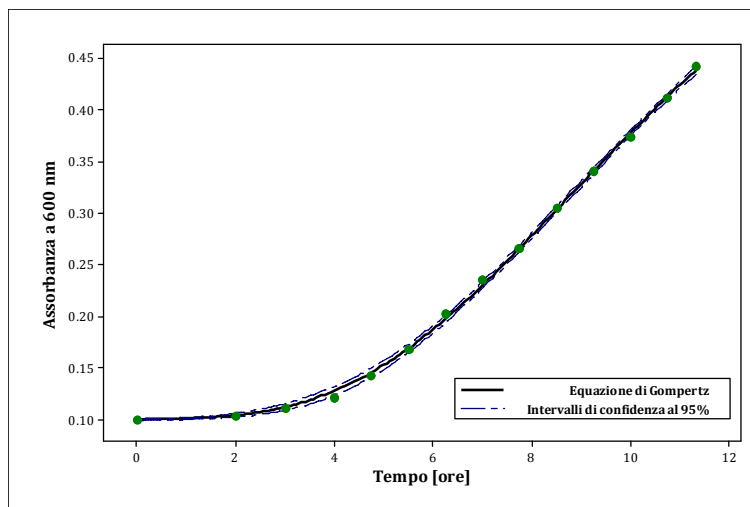


Figura 4.9: Curva di regressione, intervalli di confidenza e punti sperimentali (Run 07-I)

In tabella 4.9 vengono riportati i parametri principali stimati dalla regressione non lineare (algoritmo di *Levenberg-Marquardt*), che riporta la fase lag (λ) e le due velocità di crescita μ_1 e μ_2 relative ai due tratti di crescita. Nei casi in cui la crescita microbica avesse raggiunto un plateau e non si fosse evidenziata una seconda fase di crescita, oppure nei casi in cui fosse già iniziata la fase anabolica, per la seconda velocità di crescita è stato posto un valore pari a zero per poter effettuare l'analisi statistica. Dai dati riportati in tabella 4.9 si può rilevare inoltre la differenza, almeno in ordini di grandezza, tra le velocità di crescita nelle due fasi, dove nella prima fase la coltura cresce molto più velocemente, probabilmente anche per il fatto che alcuni substrati organici presenti, sono facilmente degradabili.

<i>Run</i>	λ [h]	μ_1 [h ⁻¹]	μ_2 [h ⁻¹]
01-I	3.93775	0.07294	0.0000
02-I	4.01294	0.06252	0.00639
03-I	4.16928	0.05638	0.00758
04-I	5.34434	0.05069	0.00839
05-I	4.11486	0.07925	0.0000
06-I	4.37582	0.06498	0.00675
07-I	4.39583	0.05902	0.00754
08-I	5.28789	0.06260	0.00927
01-II	3.88736	0.07385	0.0000
02-II	3.97566	0.06245	0.00652
03-II	4.30350	0.05752	0.00692
04-II	5.30830	0.05245	0.00795
05-II	4.03412	0.07863	0.00345
06-II	4.49460	0.08017	0.01167
07-II	4.40283	0.06106	0.00815
08-II	5.22947	0.06108	0.00825

Tabella 4.9: Parametri λ , μ_1 stimati con l'eq. di Gompertz, μ_2 con regressione lineare (Le lettere romane 'I' e 'II' indicano le due repliche sperimentali)

4.6 Analisi del piano fattoriale

In questo paragrafo si analizzerà l'impatto sulla crescita microbica dovuto ai tre fattori scelti, utilizzando i diversi parametri biologici stimati. Con l'algoritmo di Yates (Nelson *et al.*, 2003) sarà possibile calcolare gli effetti dei diversi fattori sul sistema, basandosi sui diversi output, in questo caso tempo di acclimatazione e le due velocità di crescita, calcolate nei due tratti delle curve di crescita. Successivamente verranno presentati anche i risultati delle analisi chimiche effettuate e verranno elaborati i dati anche con queste ulteriori informazioni.

4.6.1 Analisi statistica per il parametro λ , fase lag

In questo primo paragrafo verranno valutati gli effetti dovuti alla fase di acclimatazione in cui i batteri solitamente producono gli enzimi necessari alla degradazione dei nuovi substrati. Si ribadisce che le fonti di carbonio presenti nelle soluzioni delle varie prove

sono solamente i due IPA, pirene, fenantrene ed il catecolo, e che nei cicli di acclimatazione effettuati per sviluppare la biomassa attiva e necessaria per l'inoculo delle beute utilizzate nelle prove sperimentali, si è utilizzato come sola fonte di carbonio il glucosio anidro.

Gli effetti calcolati, messi in ordine decrescente e in valore assoluto in un diagramma a barre, vanno a formare il diagramma (o carta) di Pareto, figura 4.10. Nella carta di Pareto è inoltre riportata una soglia ottenuta con un test di significatività statistica, *t-test*, che ci permette di individuare quali fattori ed effetti combinati sono statisticamente significativi (significatività statistica $\alpha=0.05$).

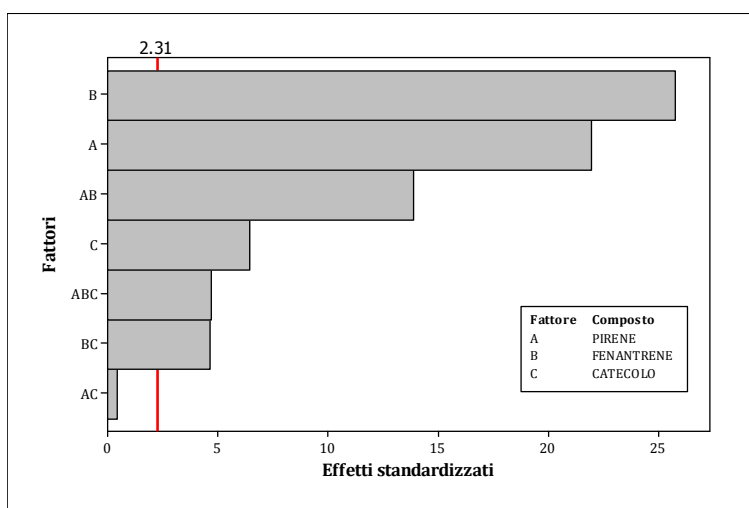


Figura 4.10: Carta di Pareto per il parametro λ

Dalla figura 4.10 risulta evidente come tutti i composti utilizzati e alcune loro interazioni risultano significative per l'adattamento del consorzio batterico prima di potersi sviluppare e generare nuova biomassa. In particolare l'impatto più importante è dato dal fenantrene, seguito dal pirene. Risultano inoltre significativi l'interazione doppia pirene-fenantrene, il catecolo, e anche se in misura minore si rileva l'interazione tripla dei tre fattori. Dal grafico dei singoli effetti riportati in figura 4.11 possiamo capire meglio in che maniera i fattori influiscano sulla fase di acclimatazione. Risulta evidente come gli IPA allunghino la fase di acclimatazione dei batteri in maniera statisticamente significativa, a causa della loro 'refrattarietà' alla biodegradazione. Il catecolo invece risulta ben tollerato e influisce sul tempo di acclimatazione in maniera decisamente meno importante rispetto ai due IPA, come verrà meglio evidenziato nei successivi paragrafi.

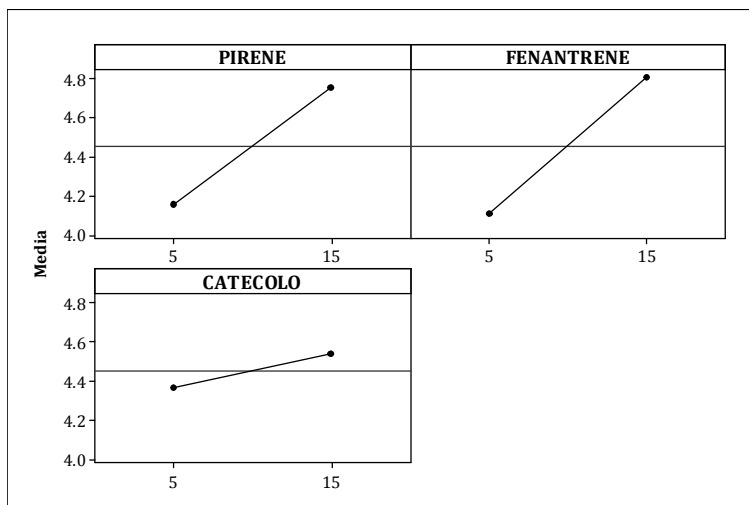


Figura 4.11: Diagramma dei singoli effetti per il parametro λ

Nella tabella 4.10 sono riportati i risultati dell'analisi di varianza (ANOVA), che oltre a confermare questi risultati presentati in maniera quali-quantitativa dai grafici, darà ulteriori informazioni. Dall'analisi risulta, come evidenziato in tabella 4.10 nella colonna *p-value*, che i parametri risultano statisticamente significativi visti i valori di *p-value* praticamente nulli.

Sorgente	gdl	SS	MS	F ₀	p-value
Pirene	1	1.4301	1.4301	483.43	0.000
Fenantrene	1	1.9658	1.9658	664.52	0.000
Catecolo	1	0.1218	0.1218	41.19	0.000
Pirene Fenantrene	1	0.5676	0.5676	191.88	0.000
Pirene Catecolo	1	0.0006	0.0005	0.20	0.668
Fenantrene Catecolo	1	0.0644	0.0644	21.77	0.002
Pirene Fenantrene Catecolo	1	0.0649	0.0649	21.94	0.002
Errore residuo	8	0.0236	0.0029		
Errore puro	8	0.0236	0.0029		
Totale	15	4.2389			

Tabella 4.10: analisi di varianza per il parametro λ

Relativamente all'interazione doppia pirene-fenantrene, si riportano le curve di isolivello in figura 4.12, la cui evidente marcata curvatura indica la forte interazione tra i due parametri. Come mostrato nel grafico, per valori fissi di catecolo, i valori di concentrazione più alti di pirene e fenantrene portano a tempi di acclimatazione più lunghi, come era lecito aspettarsi.

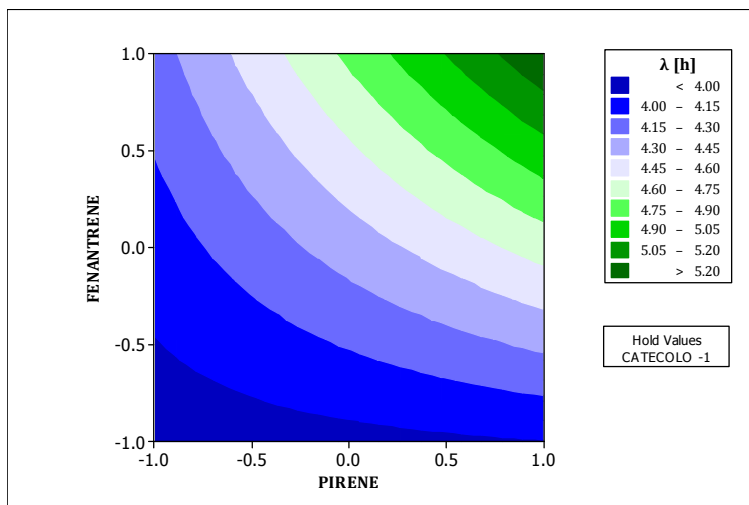


Figura 4.12: Curve di isolivello per l'interazione pirene-fenantrene (parametro λ)

4.6.2 Analisi statistica per il parametro μ_1 , velocità di crescita

In questo paragrafo verrà analizzato il piano fattoriale utilizzando come risposta la velocità di crescita stimata nel primo tratto esponenziale delle curve di crescita. Questi risultati ci daranno informazioni sul comportamento della popolazione in funzione dei composti scelti, per le condizioni sperimentali esplorate.

Come chiaramente mostrato dalla carta di Pareto in figura 4.13 il fenantrene è il composto che ha il maggior impatto sulla velocità di crescita del consorzio batterico e come meglio esplicitato nella figura dei singoli effetti, figura 4.14, ne rallenta la formazione della biomassa. Anche il pirene porta ad un rallentamento della crescita microbica, ma in maniera meno significativa, come confermato anche dal *p-value* calcolato e riportato nella tabella ANOVA (tabella 4.11). Un comportamento opposto, ma che conferma le supposizioni iniziali fatte in fase di progettazione della campagna sperimentale, è quello del catecolo, che nella carta di Pareto figura come il secondo effetto più impattante sul sistema, ma ha un effetto positivo sullo sviluppo della biomassa. Infatti, come mostrato in figura 4.14, la presenza del catecolo aumenta la velocità complessiva di crescita dei microorganismi, migliorando la tollerabilità degli inquinanti.

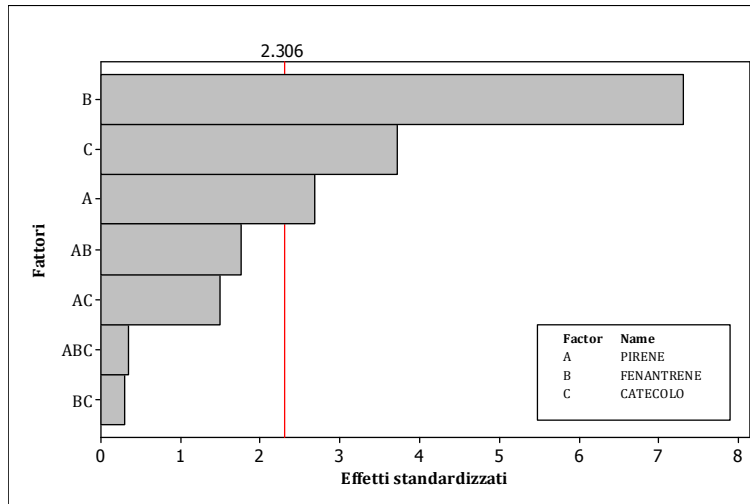


Figura 4.13: Carta di Pareto per la velocità di crescita μ_1

L'analisi statistica condotta con il test ANOVA è riportata in tabella 4.11 e conferma i risultati ottenuti con l'algoritmo di Yates. Non risultano interazioni doppie statisticamente significative, eseguendo un t-test con significatività statistica $\alpha=0.05$.

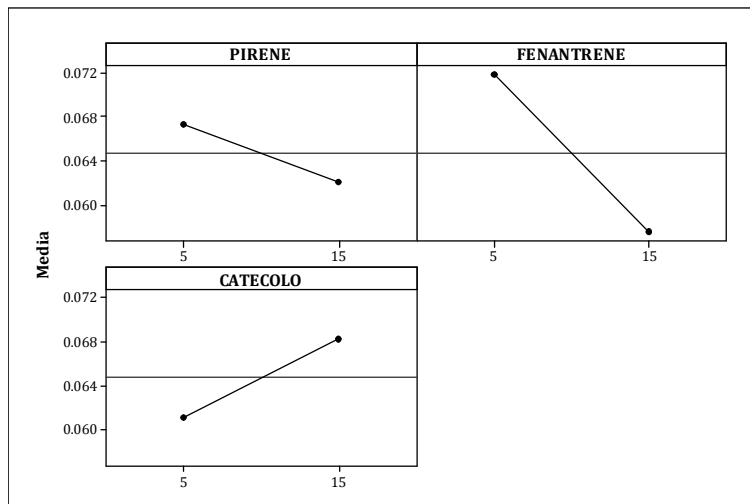


Figura 4.14: Diagramma dei singoli effetti per il parametro μ_1

Sorgente	gdl	SS	MS	F ₀	p-value
Pirene	1	0.0001087	0.0001087	7.16	0.028
Fenantrene	1	0.0008121	0.0008121	53.51	0.000
Catecolo	1	0.0002101	0.0002101	13.85	0.006
Pirene Fenantrene	1	0.0000468	0.0000468	3.09	0.117
Pirene Catecolo	1	0.0000343	0.0000343	2.26	0.171
Fenantrene Catecolo	1	0.0000013	0.0000013	0.09	0.778
Pirene FenantreneCatecolo	1	0.0000017	0.0000017	0.11	0.744
Errore residuo	8	0.0001214	0.0000152		
Errore puro	8	0.0001214	0.0000152		
Totale	15	0.0013367			

Tabella 4.11: analisi di varianza per il parametro μ_1

Volendo stimare la velocità di crescita in base agli effetti statisticamente significativi rilevati, fenantrene, pirene e catecolo, si può utilizzare il modello di regressione riportato in equazione 4.2, le cui X_i corrispondono alle concentrazioni dei composti pirene, fenantrene e catecolo.

$$\hat{y} = \hat{\mu}_1 = 0.064724 - 0.002607 \cdot x_{pir} - 0.007124 \cdot x_{fen} + 0.003624 \cdot x_{cat} \quad eq. 4.2$$

Per tale modello di regressione si ha $R^2 = 90.92\%$, $R^2_{adj} = 82.97\%$ ed infine il parametro $S = 0.003896$. Si può quindi concludere che il modello polinomiale scelto per l'intervallo di concentrazioni esplorato risulta essere adeguato. Si riportano infine in figura 4.15 i grafici delle curve di isolivello per fenantrene e pirene, tracciati per due livelli di concentrazione di catecolo, 5 e 15 mg/l. Se valutiamo il grafico a sinistra della figura 4.15, relativo alle basse concentrazioni di catecolo, risulta evidente come i due IPA rallentino la crescita del consorzio batterico all'aumentare della loro concentrazione e la marcata curvatura ne indica la loro forte interazione. Approfondendo l'analisi delle curve di isolivello e considerando il grafico a destra di figura 4.15, si può notare come la presenza di alti valori di catecolo, 15 mg/l, porti ad una maggiore tollerabilità del pirene, ottenendo valori di velocità di crescita più alti per alte concentrazioni di pirene. Anche in questo caso risulta visibile, in maniera più debole, l'interazione tra i due parametri, con delle curve di isolivello meno marcate.

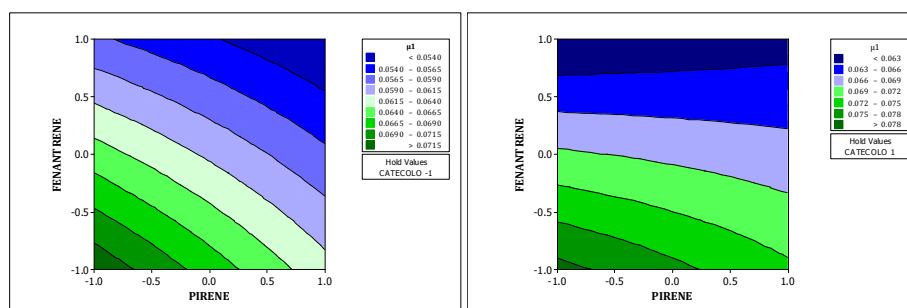


Figura 4.15: Curve di isolivello per pirene e fenantrene, rispettivamente per il catecolo fissato a 5 mg/l (Sn) e 15 mg/l (Dx)

4.6.3 Analisi statistica per il parametro μ_2 , velocità di crescita

Analogamente al precedente paragrafo verrà effettuata l'analisi statistica sulla velocità di crescita calcolata per il secondo tratto di crescita, che seppur presente nella maggior parte delle curve di crescita ottenute, non ha un profilo strettamente esponenziale ma presenta una pendenza positiva quasi lineare. Per questo fatto si è deciso di calcolare la pendenza per mezzo di una regressione lineare sul tratto in questione. Il diagramma di Pareto, riportato in figura 4.16, mostra che gli effetti statisticamente significativi sono dovuti ai soli pirene, fenantrene e alla loro interazione doppia. L'effetto del catecolo in questa fase non risulta più statisticamente significativo, probabilmente perché è già stato degradato e non è più presente in soluzione. Il diagramma dei singoli effetti mostra come il comportamento dei due inquinanti sia cambiato, ossia entrambi vengono tollerati dal consorzio batterico e ne fanno crescere la velocità di crescita all'aumentare della loro concentrazione. Questo aspetto è probabilmente legato alla capacità dei microorganismi di adattarsi al nuovo substrato, che inizialmente aveva un effetto inibitorio, ma poi diventa una valida fonte di carbonio per la loro crescita.

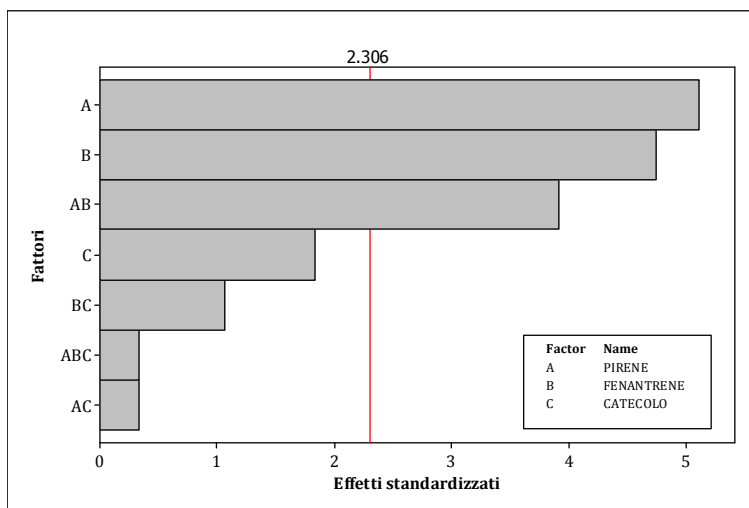


Figura 4.16: Carta di Pareto per la velocità di crescita μ_2

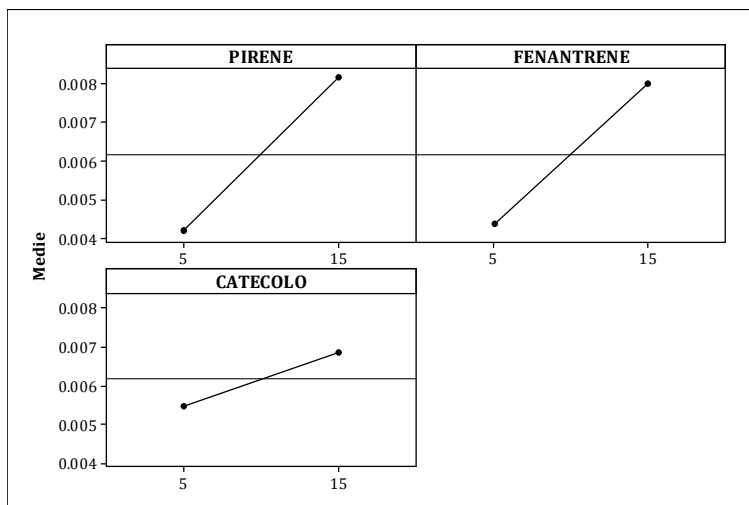


Figura 4.17: Diagramma dei singoli effetti per il parametro μ_2

L'analisi di varianza è riportata in tabella 4.12 e conferma i risultati appena presentati con dei diagrammi più qualitativi. I valori di p -value per fenantrene e pirene sono molto bassi e confrontabili (0.001), indicando un elevato valore di significatività, mentre il catecolo supera la soglia scelta per la significatività statistica e non viene considerato di interesse in questa parte della crescita microbica. Anche il valore del p -value (0.004) calcolato per l'interazione doppia è molto basso, dando conferma della significatività statistica di tale interazione doppia.

In figura 4.18 vengono riportate le curve di isolivello per il fattore μ_2 nel piano pirene-fenantrene calcolato per una concentrazione di catecolo alta (15mg/l). Come si può notare, le curve evidenziano una marcata curvatura dovuta all'interazione dei due composti e si rileva inoltre come la velocità di crescita sia più elevata per valori crescenti di pirene e fenantrene. Questo aspetto non viene rilevato nell'analisi sia del tempo di acclimatazione (λ), che nell'analisi della velocità di crescita rilevata nel primo tratto di crescita (μ_1), che mostrano una tendenza opposta per l'effetto pirene e fenantrene sulla velocità di crescita.

Volendo stimare la velocità di crescita in base agli effetti statisticamente significativi rilevati, fenantrene, pirene e catecolo, si può utilizzare il modello di regressione riportato in equazione 4.3, le cui X_i corrispondono alle concentrazioni dei composti pirene e fenantrene.

$$\hat{y} = \hat{\mu}_1 = 0.062 - 0.0020 \cdot x_{pir} - 0.0018 \cdot x_{fen} + 0.0015 \cdot x_{pir} x_{fen} \quad eq. 4.3$$

Per tale modello di regressione si ha $R^2 = 89.56\%$, $R^2_{adj} = 80.42\%$ ed infine il parametro $S = 0.001544$. Si può quindi concludere che il modello polinomiale scelto per l'intervallo di concentrazioni esplorato risulta essere adeguato.

Sorgente	gdl	SS	MS	F ₀	p-value
Pirene	1	0.0000622	0.0000622	26.09	0.001
Fenantrene	1	0.0000535	0.0000535	22.46	0.001
Catecolo	1	0.0000080	0.0000080	3.36	0.104
Pirene Fenantrene	1	0.0000367	0.0000367	15.38	0.004
Pirene Catecolo	1	0.0000003	0.0000003	0.11	0.749
Fenantrene Catecolo	1	0.0000027	0.0000027	1.14	0.318
Pirene Fenantrene Catecolo	1	0.0000003	0.0000003	0.11	0.748
Errore residuo	8	0.0000191	0.0000024		
Errore puro	8	0.0000191	0.0000024		
Totale	15	0.0001826			

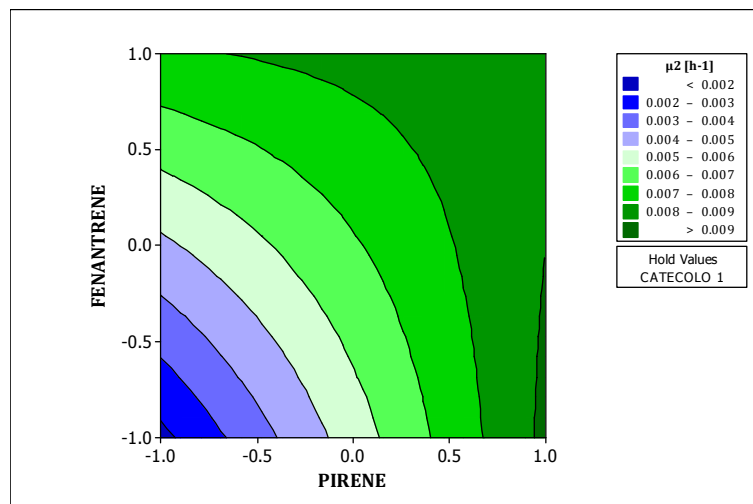
Tabella 4.12: analisi di varianza per il parametro μ_2 

Figura 4.18: Curve di isolivello per pirene e fenantrene (catecolo 15 mg/l)

4.7 Capacità degradative del consorzio batterico

Dall'analisi statistica effettuata nei precedenti paragrafi si è potuto approfondire il comportamento del sistema nei confronti degli inquinanti e della presenza del composto fenolico aggiunto, il catecolo, ottenendo informazioni anche sulla tollerabilità degli IPA selezionati. In questo paragrafo verrà approfondito un aspetto ritenuto più di interesse ai fini ambientali, l'effettiva capacità di degradazione degli inquinanti ad opera dei soli microorganismi.

I campioni prelevati prima dell'inoculo e a fine prova sono stati analizzati in cromatografia liquida (HPLC), eseguendo le analisi anche sulle repliche per poter procedere con l'analisi ANOVA. Si è scelto di lavorare con questa tecnica analitica per la relativa facilità nella preparazione del campione, per l'affidabilità dei risultati e per la velocità del metodo analitico scelto.

Come introdotto nella parte descrittiva è stato utilizzato il metodo validato EPA 8310, che è stato adattato alla strumentazione utilizzata in laboratorio. I risultati in termini di consumo percentuale dei singoli composti, che è riferito all'intervallo di tempo in cui si sono svolte le prove sperimentali (circa 35 ore), sono riportati in tabella 4.13 per entrambe le repliche del piano fattoriale 2³.

	Catecolo	Fenantrene	Pirene
Run	Consumo percentuale ($C_0 - C_f / C_f$) 100		
01-I	100,0	38,6	27,6
01-II	100,0	40,1	18,3
02-I	100,0	76,6	75,7
02-II	100,0	83,1	73,8
03-I	100,0	49,2	53,2
03-II	100,0	44,6	55,3
04-I	100,0	52,5	55,3
04-II	100,0	44,8	62,6
05-I	100,0	70,9	47,5
05-II	100,0	69,5	39,9
06-I	100,0	40,4	74,8
06-II	100,0	48,3	75,4
07-I	100,0	60,0	55,6
07-II	100,0	52,8	56,7
08-I	100,0	55,1	61,4
08-II	100,0	49,0	61,2

Tabella 4.13: Analisi HPLC per catecolo, fenantrene e pirene espresse come consumo percentuale (C_0 : concentrazione iniziale, C_f : concentrazione finale)

Da una prima analisi qualitativa dei dati riportati in tabella 4.13, il catecolo viene sempre completamente degradato dal consorzio batterico, non trovandosi più tracce della sua presenza nei campioni prelevati a fine prova. Relativamente al fenantrene si rileva una rimozione massima nella prova sperimentale 'run 02-II' superiore all'80%

(corrispondente a livello basso di concentrazione iniziale di fenantrene, 5 mg/l; livello basso di concentrazione di pirene, 5 mg/l; e livello alto di concentrazione di catecolo, 15 mg/l). Il valore di rimozione medio per tutti gli esperimenti si attesta al 55%, mentre la rimozione percentuale più bassa per il fenantrene risulta essere per la prova sperimentale *'run 01-I'* (rimozione del 38,8 %), quando tutti i composti sono a livelli bassi (5 mg/l). Relativamente al pirene, si può vedere sempre in tabella 4.13, che si raggiunge una rimozione percentuale massima del 75,7 nella prova sperimentale *'run 02-I'*, (corrispondente a livello di concentrazione iniziale di fenantrene, 5 mg/l, livello basso di concentrazione di pirene, 5 mg/l e livello alto di concentrazione di catecolo, 15 mg/l). Relativamente al pirene il livello di rimozione medio è pari al 55,0%, però per tale inquinante si rileva un minimo del 18,3% per la prova sperimentale *'run 01-I'* (corrispondente a livello di concentrazione iniziale di fenantrene, 5 mg/l, livello basso di concentrazione di pirene, 5 mg/l e livello basso di concentrazione di catecolo, 5 mg/l). L'analisi statistica esposta nei paragrafi successivi, approfondirà con maggior dettaglio queste considerazioni puramente qualitative.

In figura 4.19 viene riportato il cromatogramma di un'analisi eseguita in cromatografia liquida (HPLC) ed è relativa ad uno standard ad elevata purezza, contenente i composti: pirene, fenantrene, catecolo e Tween80. Questa analisi preliminare è stata effettuata con lo scopo di ricavare i tempi di eluizione dei composti. Grazie al gradiente di concentrazione scelto per il metodo analitico applicato è stato possibile risolvere molto bene i picchi dei composti cercati, ottenendo la separazione in tempi relativamente rapidi.

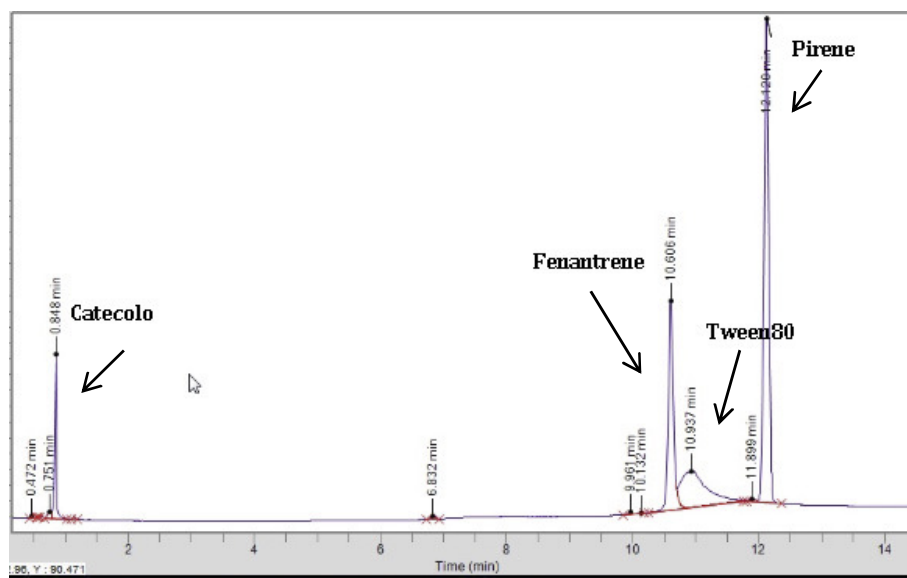


Figura 4.19: Cromatogramma HPLC di uno standard di riferimento contenente pirene, fenantrene, catecolo e Tween80

Di seguito vengono riportati i cromatogrammi con i relativi spettri di assorbimento UV per i quattro composti oggetto di studio. Gli spettri UV sono caratteristici per ogni molecola analizzata e sono stati di aiuto per l'identificazione dei composti in analisi, vista anche la formazione di qualche metabolita, che è stato rilevato a tempi di ritenzione prossimi a quelli del catecolo, come verrà evidenziato più avanti. Nelle figure da 4.19 a 4.23 si riportano tali spettri di assorbimento UV, ottenuti dall'analisi HPLC con rilevatore a serie di diodi (DAD).

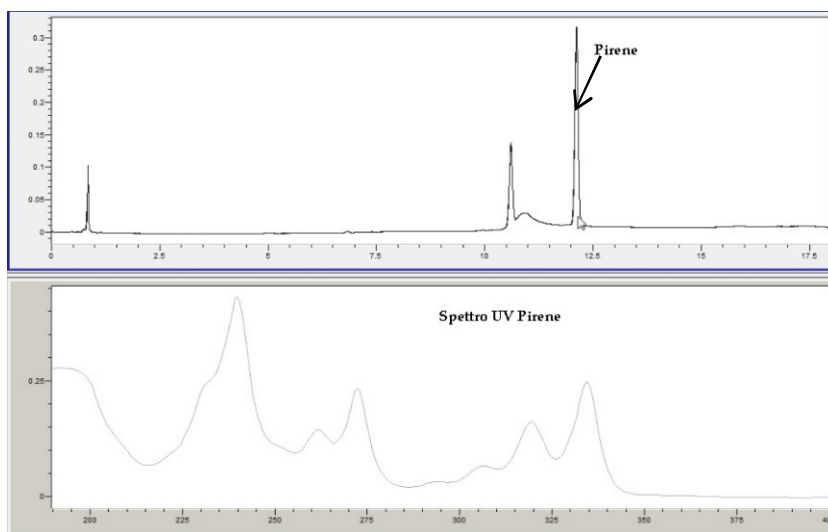


Figura 4.20: Cromatogramma standard di riferimento e spettro UV per pirene

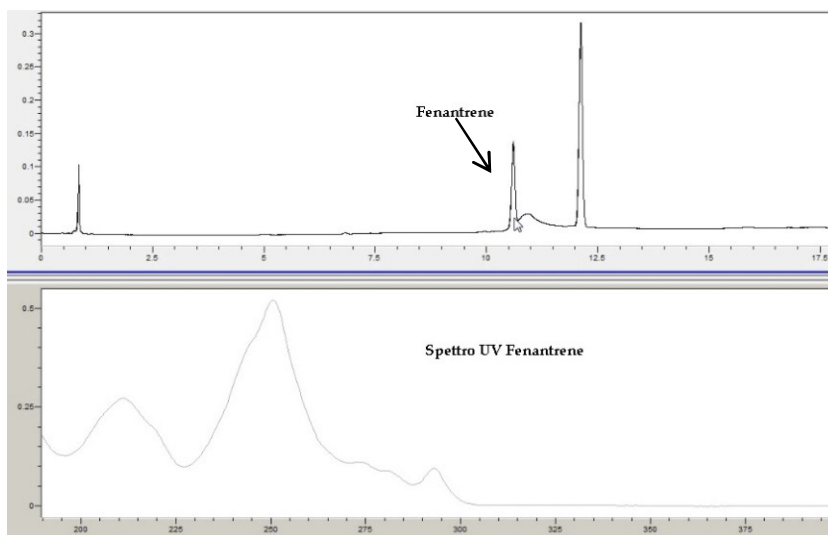


Figura 4.21: Cromatogramma standard di riferimento e spettro UV per fenantrene

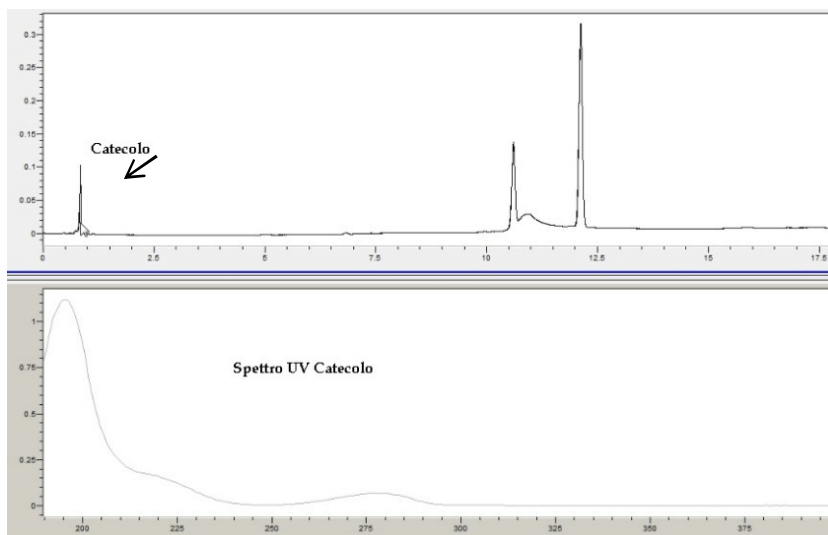


Figura 4.22: Cromatogramma standard di riferimento e spettro UV per catecolo

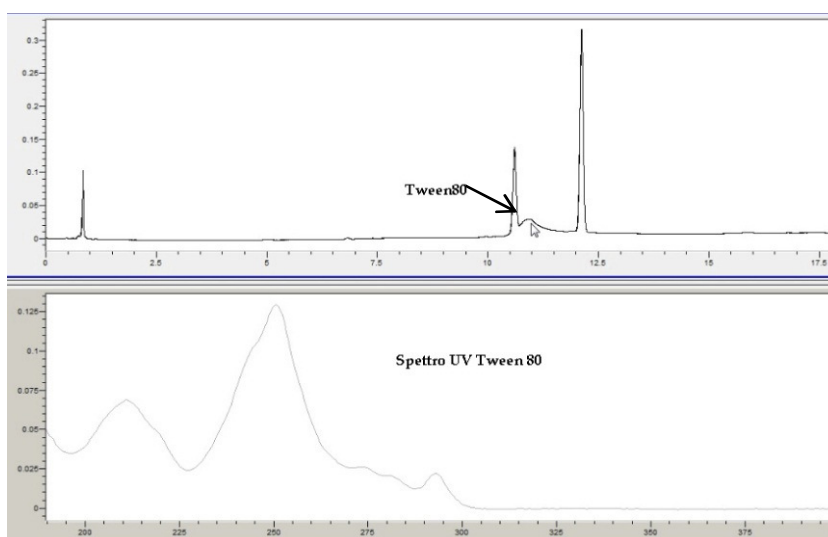


Figura 4.23: Cromatogramma standard di riferimento e spettro UV per Tween80

In figura 4.24 vengono riportati i risultati delle analisi HPLC per una prova sperimentale scelta a titolo di esempio (*run 08-I*), dove si sono riportati i cromatogrammi sovrapposti relativi all'inizio prova e fine prova sperimentale (arco temporale di circa 35 ore). Si può osservare che le aree dei picchi di fenantrene e pirene sono sensibilmente diminuite rispetto al tempo iniziale (diagramma in nero), ad opera della degradazione del consorzio batterico, mentre per il catecolo si scende sotto i limiti di determinazione e non è possibile quindi valutarne l'eventuale presenza residua, cromatogramma a fine prova (diagramma in Blu di figura 4.24). Nel tracciato in blu,

sempre in figura 4.24, è possibile rilevare un picco di una sostanza che è stata generata durante la prova, che si trova prima del tempo di ritenzione del catecolo, attribuibile a qualche sottoprodotto di degradazione. Tale composto attualmente non è stato identificato e necessita ulteriori approfondimenti analitici.

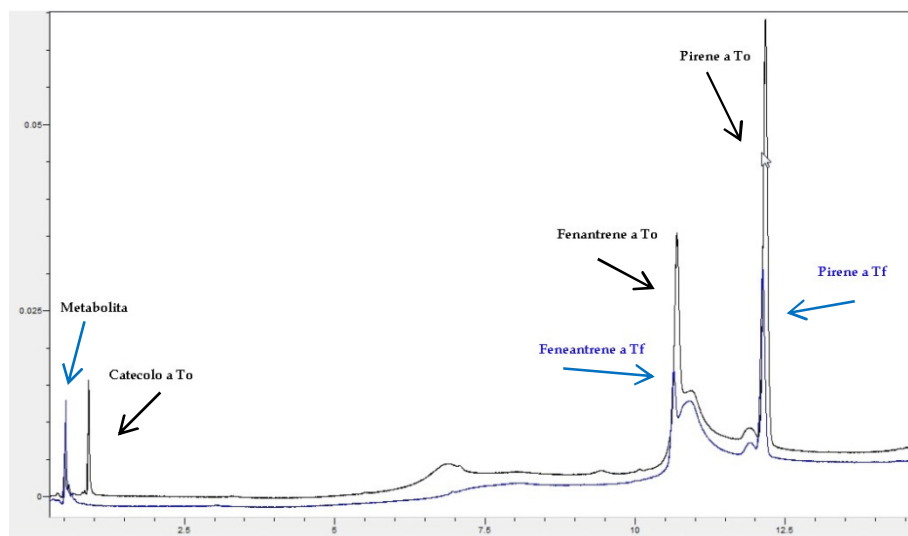


Figura 4.24: Cromatogrammi sovrapposti per analisi HPLC (Run 08-I). In nero il tracciato del campione al tempo iniziale, in blu il tracciato al tempo finale

4.7.1 Risultati delle analisi in HPLC

I risultati delle analisi cromatografiche saranno analizzati con le stesse procedure statistiche introdotte per la caratterizzazione delle curve di crescita, sempre per il piano fattoriale completo 2^3 presentato. La percentuale di rimozione dei vari composti, in particolare per il fenantrene e il pirene, verranno analizzate per via statistica e verrà riportato il modello polinomiale di stima per la rimozione degli inquinanti. Il modello di previsione è utilizzabile quando sono note le condizioni iniziali, relative alle concentrazioni dei tre composti oggetto di studio, ed è valido per l'intervallo di concentrazioni esplorato in questa campagna sperimentale.

L'analisi statistica del piano fattoriale 2^3 è stata effettuata utilizzando come risposta la percentuale di rimozione del pirene (tabella 4.13). In figura 4.25 si riporta il diagramma di Pareto dal quale si rileva che l'effetto maggiormente significativo è dovuto proprio al pirene e alla sua interazione doppia con il fenantrene, seguito dall'effetto del catecolo. Sia dal digramma di Pareto che dall'analisi statistica (ANOVA), riportata in Tabella 4.14, si evince che seppur in maniera inferiore, sia l'interazione tripla pirene-fenantrene-catecolo che l'interazione doppia pirene-catecolo, risultano statisticamente significative per $\alpha=0.05$. Per quanto riguarda l'interazione fenantrene-catecolo, in un'ottica di approccio conservativo e vista la sua prossimità alla soglia di significatività statistica

presa in considerazione, si preferisce scartarla e riservarsi ad ulteriori approfondimenti prima di considerarla un'interazione possibile. Anche il contributo dovuto al fenantrene risulta sotto la soglia di significatività statistica, non dando quindi effetti apprezzabili sulla degradazione del pirene. In figura 4.26 viene inoltre riportato il grafico delle interazioni doppie, che conferma l'interazione marcata tra pirene e fenantrene. Per tale interazione viene riportato anche il diagramma delle curve di isolivello, figura 4.27.

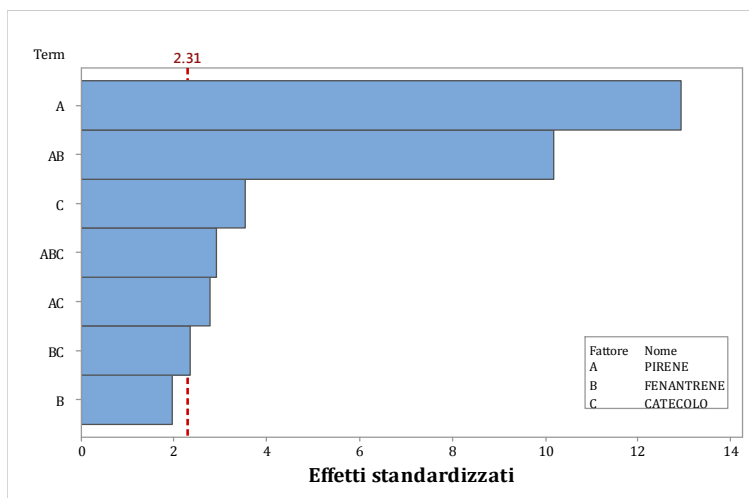


Figura 4.25: Diagramma di Pareto per degradazione di pirene

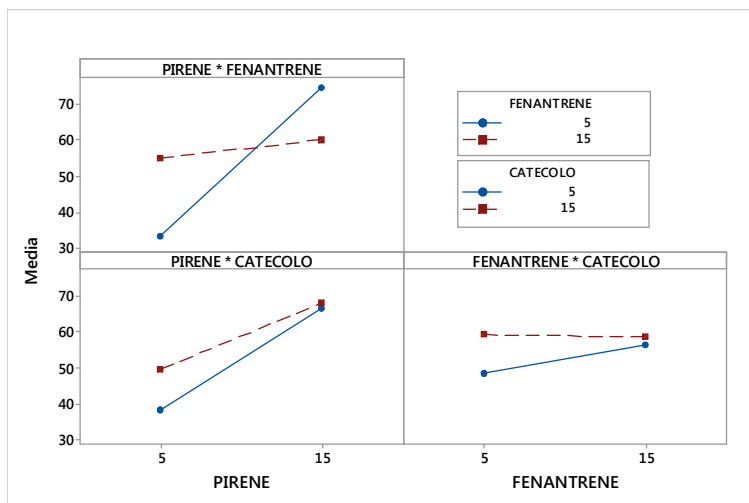


Figura 4.26: Diagramma delle interazioni doppie per degradazione pirene

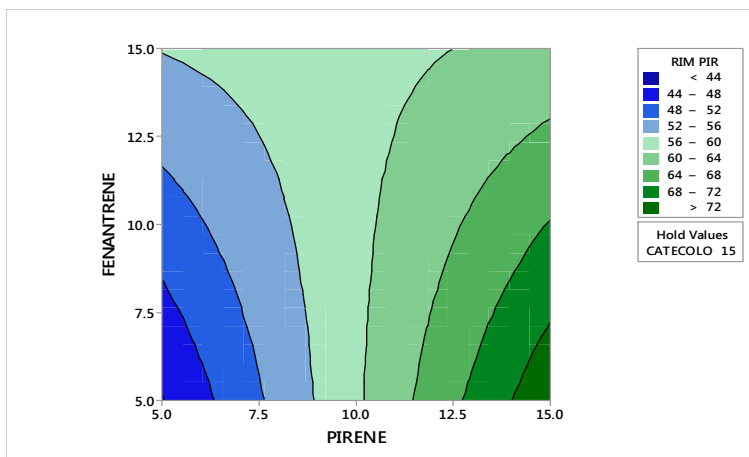


Figura 4.27: Curve di isolivello per interazione doppia pirene-fenantrene
Grafico per livello alto di catecolo (15 mg/l)

In tabella 4.14 viene riportata l'analisi statistica ANOVA. Come si può vedere i valori dei p -value per le varie sorgenti sono sempre sotto la soglia del 5%, ad eccezione del fenantrene, per cui si rileva un p -value pari a 0,086. Questa evidenza ci dice che anche per il fenantrene il suo contributo, seppur non statisticamente significativo con un test effettuato ad una soglia del 5%, risulterebbe di interesse per una soglia del 10%.

Sorgente	gdl	SS	MS	F ₀	p-value
Pirene	1	2162,80	2162,80	167,45	0,000
Fenantrene	1	49,40	49,40	3,82	0,086
Catecolo	1	161,06	161,06	12,47	0,008
Pirene Fenantrene	1	1342,26	1342,26	103,92	0,000
Pirene Catecolo	1	99,59	99,59	7,71	0,024
Fenantrene Catecolo	1	70,69	70,69	5,47	0,047
Pirene Fenantrene Catecolo	1	109,60	109,60	8,49	0,019
Errore puro	8	103,33	12,92		
Totale	15	4098,72			

Tabella 4.14: analisi di varianza per la rimozione percentuale del pirene

Volendo stimare la degradazione percentuale del pirene ($D_{p\%}$) in base agli effetti statisticamente significativi, si può utilizzare il modello di regressione riportato nell'equazione 4.3, le cui X_i corrispondono alle concentrazioni dei composti pirene, fenantrene e catecolo. Per tale regressione si ha $R^2=97,48\%$, $R^2_{adj}=95,27\%$ ed infine $S=3,59$. Questi parametri che valutano la bontà della regressione, fanno ritenere valido il modello di regressione scelto.

$$\hat{y} = \widehat{D_{p\%}} = 55,89 + 11,63 \cdot x_p - 9,16 \cdot x_p x_f + 3,17 \cdot x_c \quad eq. 4.3$$

Passiamo ora ad analizzare i risultati ottenuti per la degradazione del fenantrene, partendo al solito dal diagramma di Pareto, riportato in figura 4.28. Tale diagramma mostra come l'effetto più importante sia legato all'interazione doppia tra pirene e catecolo. Seguono poi l'interazione tripla pirene/fenantrene/catecolo e l'effetto del fenantrene, i restanti effetti sono statisticamente non significativi e non vengono presi in considerazione per la scrittura del modello di stima. Il grafico 4.29 delle interazioni doppie conferma la forte interazione pirene-catecolo, dovuta alla visibile differenza di risposta dei due composti, che è ancor meglio evidenziato dalla figura 4.30, curve di isolivello. Il diagramma delle curve di isolivello mostra che per livelli bassi di fenantrene (5 mg/l) si ottengono i valori massimi di degradazione per valori medio alti della coppia pirene/catecolo (Fig. 4.30 - Sn). A livelli alti di fenantrene (15 mg/l) la presenza di catecolo risulta fondamentale per raggiungere alti livelli della rimozione di fenantrene (fig. 4.30 - Dx), che altrimenti sarebbe limitata dalla presenza del pirene.

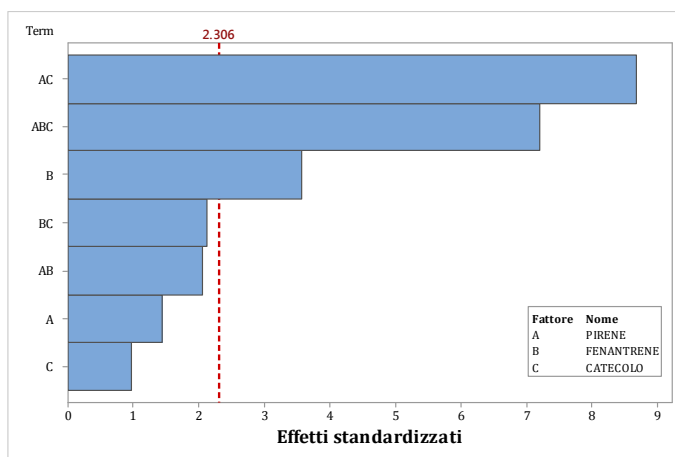


Figura 4.28: Diagramma di Pareto per degradazione di fenantrene

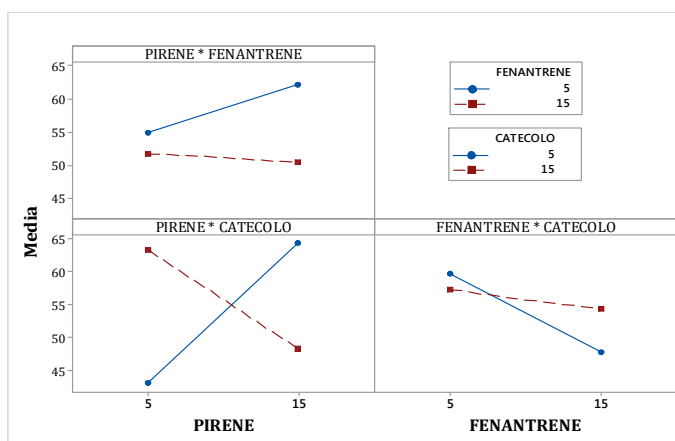


Figura 4.29: Diagramma delle interazioni doppie per degradazione fenantrene

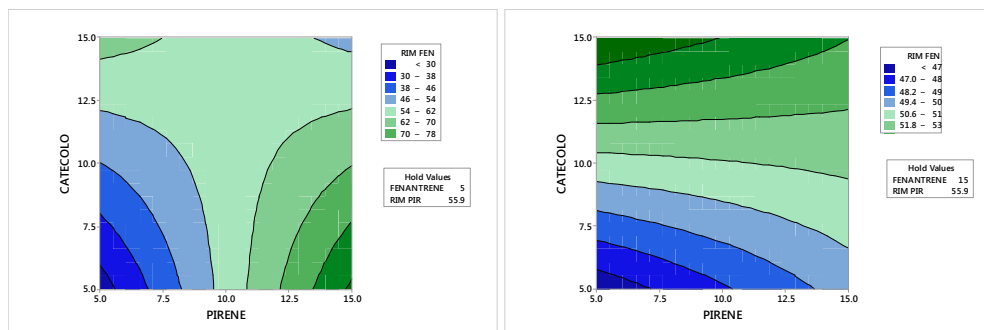


Figura 4.30: Curve di isolivello per interazione doppia catecolo-pirene.
Sn: 5 mg/l fenantrene, Dx: 15 mg/l fenantrene

Dalle elaborazioni statistiche effettuate sui risultati appena commentati è stato possibile effettuare l'analisi di varianza (ANOVA) che è riportata in tabella 4.15. La tabella conferma le informazioni qualitative appena discusse, dando un maggior dettaglio sull'importanza dei fattori grazie anche ai *p-value* calcolati. Infine, si riporta il modello di regressione che permette di stimare la degradazione percentuale del fenantrene ($D_{f\%}$) in base agli effetti statisticamente significativi, equazione 4.4, le cui X_i corrispondono alle concentrazioni dei composti pirene, fenantrene e catecolo. Per tale regressione si calcolano i parametri R^2 , pari al 95,00%, il valore 'corretto' R^2_{adj} , pari al 90,63 % ed infine il parametro S, che risulta pari a 4,16. Questi parametri che valutano la bontà della regressione, fanno ritenere valido il modello scelto per il range di concentrazioni esplorato.

$$\hat{y} = \widehat{D_{f\%}} = 54,73 - 9,05 \cdot x_p x_c + 7,51 \cdot x_p x_f x_c - 3,72 x_f \quad eq. 4.4$$

Sorgente	gdl	SS	MS	F ₀	p-value
Pirene	1	36,39	36,39	2,10	0,185
Fenantrene	1	221,53	221,53	12,78	0,007
Catecolo	1	16,48	16,48	0,95	0,358
Pirene Fenantrene	1	73,24	73,24	4,22	0,074
Pirene Catecolo	1	1309,96	1309,96	75,55	0,000
Fenantrene Catecolo	1	78,62	78,62	4,53	0,066
Pirene Fenantrene Catecolo	1	902,03	902,03	52,02	0,000
Errore puro	8	138,72	17,34		
Totale	15	2776,98			

Tabella 4.15: analisi di varianza per la rimozione percentuale del fenantrene

4.8 Biorisanamento e consorzi batterici, conclusioni

Grazie all'utilizzo del *Design of Experiments* si sono potute analizzare nel dettaglio le capacità di tollerabilità del consorzio batterico nei confronti degli inquinanti selezionati, fenantrene e pirene. È stato inoltre possibile, grazie alle analisi cromatografiche, verificare le capacità di degradazione del consorzio nei confronti degli IPA. Si è poi valutato l'impatto della presenza del composto polifenolico (catecolo) e l'influenza apportata sia sul parametro velocità di crescita del consorzio batterico, sia sulla degradazione degli inquinanti, tenendo conto delle condizioni sperimentali adottate.

A seguito delle prove di crescita descritte, si è proceduto alla stima dei parametri legati alla crescita microbica, principalmente tempo di acclimatazione e velocità di crescita, con dei metodi di regressione adeguati per i dati rilevati. Dalle prove eseguite, con particolare riferimento alle curve di crescita per ogni esperimento, si è rilevato un andamento di tipo *diauxico*, ossia la presenza di due fasi di crescita distinte e separate da una fase stazionaria. Questo andamento fa ipotizzare che il consorzio batterico, in una prima fase si adatti alle nuove fonti di carbonio, iniziando a degradare le sostanze meno tossiche, come il polifenolo. Si rileva una successiva stasi nella produzione di biomassa, attribuibile all'adattamento ai composti più recalcitranti, fenantrene e pirene. Segue poi un secondo tratto di crescita, attribuibile alla parziale degradazione dei due IPA.

L'analisi statistica dei dati per i parametri biologici stimati, ci mostra come in un primo momento, valutando sia il tempo di acclimatazione (λ) che la velocità di crescita del primo tratto esponenziale (μ_1), il catecolo, il pirene e il fenantrene risultano effetti statisticamente significativi per la crescita del consorzio batterico. La differenza principale sta nel fatto che il catecolo favorisce la crescita dei microorganismi, mentre, sia il pirene che il fenantrene ne riducono lo sviluppo, quantomeno in un primo momento. Superata la prima fase, nel secondo tratto di crescita rilevato, per cui si è stimata la velocità di crescita μ_2 , il comportamento si inverte e dall'analisi statistica si evince che la crescita del consorzio batterico è favorita dalla presenza di pirene e fenantrene. Questo aspetto è probabilmente dovuto all'iniziale degradazione del catecolo, che ha portato ad una maggiore presenza di biomassa e alla contemporanea produzione di enzimi adatti a degradare i composti poliaromatici. Questo fatto è dovuto alle naturali capacità di adattamento dei microrganismi a nuovi substrati organici e alla presenza di più specie batteriche, che aumentano la probabilità di riuscita nel processo di degradazione.

Anche le analisi condotte in cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) confermano i risultati relativi alla degradazione. Si è riscontrata la completa degradazione del catecolo da tutti i campioni sottoposti a prova sperimentale, mentre il fenantrene e il pirene risultano degradati parzialmente, quantomeno nell'intervallo temporale delle prove che è stato di 35 ore. Dalle analisi in HPLC si rileva che il fenantrene viene degradato mediamente del 55%, con un valore massimo raggiunto

dell'83% nella prova sperimentale '*run 2-II*'. Relativamente al pirene, esso viene degradato parzialmente, con una rimozione massima pari a circa il 76% nella prova sperimentale '*run 2-I*' e anch'esso viene degradato del 55%, come media espressa su tutti e 16 gli esperimenti. Ovviamente i livelli di rimozione dei composti organici sono legati alle condizioni sperimentali, che sono riassunte nella tabella 4.8. La stima della rimozione di pirene e fenantrene può essere effettuata con buona approssimazione, nell'intervallo di concentrazioni qui esplorato, dai modelli di previsione riportati nelle equazioni 4.3 e 4.4.

Si osserva che gli esperimenti dove si riscontra il massimo consumo di pirene e fenantrene, sono relativi alle condizioni sperimentali per cui il catecolo risultava a livello alto di concentrazione, 15 mg/l (livello alto nel piano fattoriale). Vista la significatività statisticamente rilevata dai test per il catecolo, si evidenzia la sua importanza nella degradazione dei composti inquinanti. Questo aspetto andrebbe comunque maggiormente esplorato, conducendo delle ulteriori prove sperimentali ed effettuando dei prelievi temporali che permetterebbero di valutare il consumo dei vari composti nel tempo e di individuare eventuali metaboliti e gli enzimi che entrano in gioco durante la degradazione degli inquinanti.

Relativamente al surfattante, il Tween80, si può concludere che ha svolto un ruolo fondamentale: principalmente ha permesso di aumentare la solubilità apparente sia del fenantrene che del pirene, consentendo di creare una campagna sperimentale che ha potuto esplorare livelli di concentrazione per gli IPA che hanno raggiunto i 15 mg/l in soluzioni acquose. Questi valori di concentrazione, che sono sicuramente superiori di almeno un ordine di grandezza rispetto alla solubilità massima dei due composti in acqua in condizioni di temperatura ambiente, non sono per ovvie ragioni raggiunti nelle acque superficiali o sotterranee eventualmente inquinate, ma possono essere raggiunti in acque derivanti da trattamenti di bonifica di matrici inquinate, come terreni. Questi processi possono dar luogo ad acque cariche di inquinanti, che devono quindi essere successivamente trattate a loro volta prima di essere smaltite a loro volta.

Capitolo 5

Biorisanamento e microalghe

In questo capitolo sarà trattato il lavoro svolto con l'ausilio delle microalghe, presentando inizialmente lo stato dell'arte, proseguendo con una panoramica di carattere generale sui microorganismi utilizzati. Saranno in seguito illustrati nel dettaglio gli esperimenti condotti. Infine, saranno presentati i risultati e tratte le conclusioni. L'obiettivo di questo capitolo è affrontare lo studio di un metodo alternativo di biorisanamento che rappresenta una nuova promettente possibilità, o quantomeno un'integrazione, rispetto alle tecnologie esistenti.

5.1 Stato dell'arte

Il continuo aumento dei consumi di energia determina un costante incremento delle emissioni di anidride carbonica a livello globale, mentre la sempre minore disponibilità di combustibili fossili conduce a un graduale aumento dei costi di produzione. La comunità scientifica sta facendo uno sforzo sempre più importante per la ricerca di fonti rinnovabili di energia che rappresentino una valida e sostenibile alternativa ai derivati del petrolio.

Già nella metà degli anni 50 Maier pensò all'impiego delle alghe per la produzione di metano partendo dalla frazione di carboidrati contenuta nelle cellule. L'idea fu poi sviluppata da Oswald e Golueke nel 1960 mediante la digestione anaerobica di alghe prodotte in lagune. La biomassa algale è costituita principalmente da carboidrati, proteine e grassi e rappresenta una fonte di energia rinnovabile di particolare interesse (Demirbaş, 2010). Sono già presenti carburanti biologici, detti *biofuels* in alternativa al gasolio e sono già prodotti bioetanolo e biodiesel (Kirrolia *et al.*, 2013) che sono in grado di alimentare le attuali vetture con piccole modifiche ai motori esistenti. I *biofuels* sono denominati in modo diverso in funzione dei processi produttivi e delle materie prime utilizzate. Nello specifico, se prodotti dalle microalghe, sono definiti di terza generazione (*third generation biofuels*, TGBs).

Le microalghe, secondo la specie, hanno un contenuto elevato in lipidi, in particolare triacilgliceroli non polari che costituiscono la materia prima di base per la produzione di biodiesel (Rodolfi *et al.*, 2009). Le biomasse algali possono anche rappresentare una fonte di combustibili liquidi quali etanolo e metanolo, e gassosi come metano e idrogeno. Per la conversione energetica si possono usare differenti tecnologie, quali, per esempio, la digestione anaerobica, la fermentazione, la combustione diretta, la gassificazione, la pirolisi e la liquefazione. I combustibili prodotti possono essere utilizzati per la produzione di energia elettrica e termica (Dragone *et al.*, 2010, Costa *et al.*, 2011). Il biodiesel è il combustibile sul quale si sono concentrati i maggiori sforzi da parte della comunità scientifica essendo considerato il primo possibile sostituto dei derivati del petrolio. Il biodiesel inoltre, viste le sue caratteristiche chimiche, è molto

interessante anche dal punto di vista ambientale (Huang *et al.*, 2010, Mata *et al.*, 2010, Demirbaş, 2011, Ahmad *et al.*, 2011).

C'è da dire però, che la produzione di biocombustibili da biomasse algali, è ancora dispendiosa dal punto di vista energetico, piuttosto complicata per i trattamenti a valle delle colture algali e necessita ancora di tempo e ricerca per diventare appetibile per il mercato industriale (Cheng *et al.*, 2001, Lam *et al.*, 2012).

Le microalghe, oltre che per la produzione di biocombustibili, sono state considerate anche una valida possibilità per il trattamento di acque di scarico (Scragg *et al.*, 2002, Craggs *et al.*, 1997, Tredici *et al.*, 1992), data la loro capacità di svilupparsi rapidamente in ambienti ostili per molti altri microorganismi. La velocità di crescita delle biomasse algali è superiore a quella delle piante terrestri, esse possono svilupparsi sia in acqua dolce sia salata e la produttività in olio è molto più elevata delle piante, rendendone interessante lo studio dell'impiego in campo energetico (Chisti, 2007).

Le microalghe possono degradare elevate concentrazioni di nitrati, fosfati e carbonio nelle acque reflue, originando biomasse destinate, come già detto, alla produzione di biocombustibili, ma anche di prodotti ad alto valore aggiunto, oppure possono essere utilizzate in acquacoltura per l'alimentazione di rotiferi (Thépot *et al.*, 2016). Diversi autori hanno già dimostrato la possibilità di rimuovere azoto e fosforo da acque di scarico, utilizzando *Chlorella sp.* (Wang *et al.*, 2010) o *Desmodesmus communis* (Samori *et al.*, 2013). Un'altra potenzialità delle alghe è la possibilità di crescere in condizioni autotrofiche, eterotrofiche, mixotrofiche, fotoeterotrofiche in funzione delle diverse condizioni ambientali (Mata *et al.*, 2010). Questo rende le alghe competitive nei confronti di altri consorzi batterici e può migliorare l'efficienza globale della depurazione. Quest'aspetto è di complessa interpretazione perché entrano in gioco fattori fisico-chimici, biologici e non solamente le capacità di assorbimento dei nutrienti operate dalla microalghe (Converti *et al.*, 2009, Queiroz *et al.*, 2011, Lam *et al.*, 2012).

5.2 Le microalghe

Le microalghe sono microrganismi fotosintetici che non condividono un'origine comune, ma seguono diverse linee evolutive. Esse non appartengono allo stesso regno delle piante, nonostante ci siano molte similitudini con esse, riguardanti produzioni di sostanze e impiego delle strategie di difesa contro parassiti e predatori. Ci sono anche alcune similitudini morfologiche, ma predominano le differenze: le piante hanno radici, foglie, rami, il loro apparato riproduttivo è avvolto da cellule sterili e inoltre possiedono un vero e proprio tessuto vascolare. Per contro, le alghe non hanno tutte queste caratteristiche morfologiche, ma si presentano molto differenti sia per le diverse dimensioni, che variano da microscopiche cellule isolate (le microalghe o il picoplancton), a grossi conglomerati di cellule o colonie ramificate, raggiungendo le giganti fronde di 60 metri delle alghe laminari (alghe brune). Il termine alghe si riferisce sia alle macroalghe, che alle microalghe e ad oggi si stima che siano state scoperte oltre dieci milioni di specie algali, la maggior parte delle quali appartiene alle

microalghe. Quasi tutte le alghe sono organismi fotosintetici, dipendenti unicamente dal loro apparato fotosintetico, che sfrutta la luce come fonte di energia e la CO₂ come fonte di carbonio per la produzione di carboidrati e ATP.

Le alghe possono, in linea generale, essere divise in quattro categorie dipendenti dal loro metabolismo:

- ✚ Alghe eterotrofiche obbligate;
- ✚ Alghe fototrofiche;
- ✚ Alghe mixotrofiche facoltative;
- ✚ Alghe mixotrofiche obbligate.

La riproduzione può avvenire per via asessuata, per divisione cellulare o per frammentazione di una colonia, o ancora con produzione di spore. Inoltre, la riproduzione può anche essere di tipo sessuato per mezzo di unione di gameti.

La microalga presa in considerazione è la *Nannochloropsis oculata*, che cresce solitamente in ambienti marini e fa parte del fitoplancton per via della sua esigua dimensione cellulare, che va dai 2 ai 4 µm. Questa microalga è formata da una semplice cellula di tipo eucariota, è un'alga fotosintetica e cresce velocemente anche per via della sua semplice struttura (Horsman *et al.*, 2008). Il ceppo di *Nannochloropsis oculata* che è stato utilizzato per le prove sperimentali è stato fornito dalla Fondazione Onlus Centro Marino Industriale (IMC) di Torregrande, Oristano. Presso il Centro Marino si trovano anche i fotobioreattori impiegati per gli esperimenti.

La figura 5.1 riporta una fotografia al microscopio ottico delle microalghe utilizzate. Si può notare in una cellula algale la presenza di una stadia micrometrica indicante le dimensioni e la presenza di una zona più chiara nella parte centrale delle cellule, che rimanda alla forma di un occhio. Questa peculiarità giustifica l'origine etimologica del termine '*oculata*'.

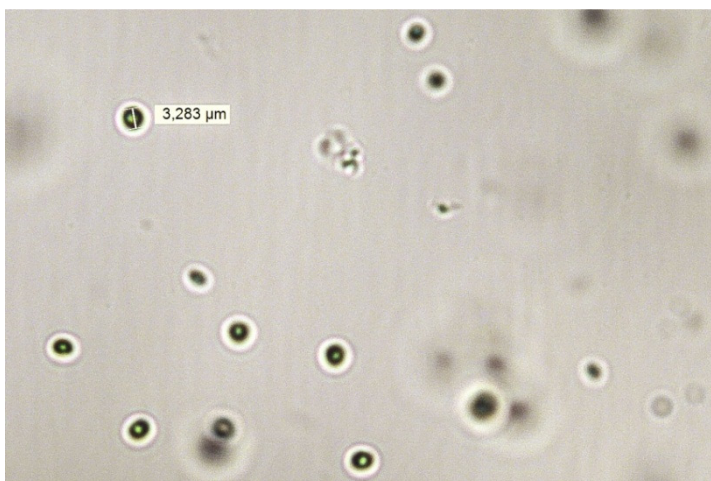
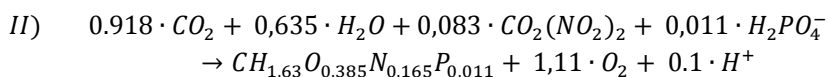
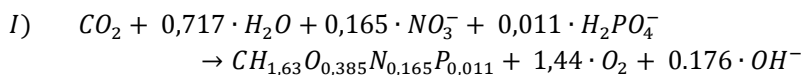
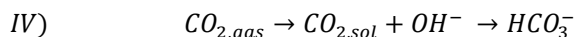
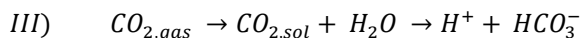


Foto 5.1: *Nannochloropsis oculata* vista al microscopio ottico (1000 x)

Di seguito sono riportate le principali reazioni chimiche coinvolte nella formazione delle cellule algali dai principali nutrienti (C, N, P). In particolare si riportano le formule relative al consumo di nitrati (Reazione I) e urea (Reazione II).



La differenza principale sta nella produzione di idrossilioni nel caso della degradazione dei nitrati (reazione I) e la produzione di idrogenioni nella reazione di degradazione dell'urea (reazione II). Questo diverso metabolismo può portare a una variazione di pH nelle soluzioni algali durante la crescita per cui occorre monitorare continuamente l'andamento del pH per ottenere risultati ottimali. Infatti, tutte le specie algali hanno un pH ottimale per lo sviluppo. In particolare nel caso dell'urea, per via delle reazioni tra gli ioni H^+ formati e il bicarbonato (HCO_3^-) presente in soluzione, si formano H_2O e CO_2 . Nel caso dei reattori con iniezione di aria, la CO_2 tende a fuoriuscire dalla soluzione, perché viene *strippata* più facilmente. In un ipotetico scenario di cattura della CO_2 , è dunque preferibile la presenza di nitrati, che tendono a formare lo ione OH^- , durante il metabolismo fotosintetico delle alghe; gli ioni OH^- , infatti, si possono legare con la CO_2 aumentandone la solubilità (reazioni III e IV) e aumentando la disponibilità di tale molecola per le microalghe.



5.3 Materiali

5.3.1 Medium e colture algali

Le colture algali utilizzate sono state costantemente mantenute a temperatura, luce e flusso d'aria controllati presso i laboratori dell'IMC, e contenute in beute di *Erlenmeyer*, il cui contenuto era costituito da acqua marina addizionata con *medium* di Guillard di tipo F2 (Guillard *et al.*, 1962-1975). Tutte le prove sperimentali sono state condotte con queste colture che venivano di volta in volta inoculate in appositi bioreattori sviluppati per l'accrescimento delle alghe (volume utile 6 l). Una volta raggiunta la concentrazione di microrganismi (in termini di peso secco) sufficiente per l'inoculo delle successive prove di crescita, le alghe erano utilizzate in bioreattori più grandi (volume utile 120 l) con i quali sono stati condotti gli esperimenti descritti in seguito.

Essendo l'obiettivo di questa tesi il biorisanamento con tecniche alternative, si è simulato un effluente contenente gli inquinanti, studiato per essere il più possibile simile a un effluente derivante da acquacoltura e quindi con una concentrazione elevata di azoto e fosforo. L'acqua quindi può essere depurata per mezzo delle microalghe e riutilizzata nel processo stesso come reintegro. La biomassa algale potrebbe in seguito essere utilizzata per l'accrescimento di rotiferi, che possono a loro volta entrare nella catena alimentare degli impianti. L'effluente di scarico sintetico era costituito da una soluzione formata da acqua marina (salinità 35,0 ‰), *medium* di Guillard F2 e diversi quantitativi di azoto (sotto forma di urea e/o nitrati) e fosforo a diversi livelli di concentrazione (Fornitore *AppliChemPanreac* per tutti i reagenti), il cui dettaglio sarà discusso in seguito. Il *medium* di Guillard, aggiunto all'acqua di mare, conteneva anche metalli in tracce e una miscela di vitamine che ha permesso di garantire la presenza di tutti gli elementi necessari allo sviluppo algale. La composizione dettagliata del *medium*, con le concentrazioni ottenute nell'acqua di mare dopo la sua aggiunta, è riportata nella tabella 5.1.

Composto	Conc [mol l ⁻¹]	Vitamine	Conc [mol l ⁻¹]
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	3,62 · 10 ⁻⁵	TiaminaHCl	2,96 · 10 ⁻⁷
Na ₂ SiO ₃ * 9H ₂ O	1,06 · 10 ⁻⁴	Biotina	2,05 · 10 ⁻⁹
FeCl ₃ * 6H ₂ O	1,17 · 10 ⁻⁵	Cianocobalamina	3,69 · 10 ⁻¹⁰
Na ₂ EDTA * 2H ₂ O	1,17 · 10 ⁻⁵		
MnCl ₂ * 4H ₂ O	9,10 · 10 ⁻⁷		
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	2,60 · 10 ⁻⁸		
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	7,65 · 10 ⁻⁸		
CoCl ₂ * 6H ₂ O	4,20 · 10 ⁻⁸		
CuSO ₄ * 5H ₂ O	3,93 · 10 ⁻⁸		

Tabella 5.1: *Medium* di Guillard F2

5.3.2 Parametri monitorati

Per seguire la crescita algale sono state impiegate sia misure di densità ottica, utili per avere una stima immediata della biomassa, sia misure del peso secco. Queste ultime analisi sono state eseguite in seguito sugli stessi campioni sottoposti alle letture di densità ottica. Le letture di densità ottica sono state eseguite mediante uno spettrofotometro a doppio raggio (UV-VIS Jasco V-530), che ha permesso anche l'acquisizione degli spettri UV-Visibile tra 300 e 800 nm per ogni campione, con campionamenti effettuati a intervalli di 4 ore durante le ore diurne. L'andamento della crescita delle microalghe è stato seguito a due lunghezze d'onda: i valori letti in corrispondenza di 680 nm sono correlabili al contenuto della clorofilla alfa, mentre la biomassa algale è riconducibile alla lunghezza d'onda di 750 nm. Come riportato nella figura 5.2, non si è rilevato un andamento lineare tra assorbanza a 750 nm e contenuto di biomassa in termini di peso secco, se non per bassi valori di concentrazione algale.

L'equazione 5.1, che è stata ottenuta per via empirica, correla bene i dati a disposizione e permette la stima del peso secco dai valori di densità ottica a 750 nm. Nell'equazione sono presenti i termini densità ottica (DO), peso secco (DW) espresso in [g/l] e le costanti di regressione a, b e c (rispettivamente: 2,124, 1,007, 2,271).

$$DW = a \cdot (1 - b \cdot \exp(-c \cdot DO)) \quad (5.1)$$

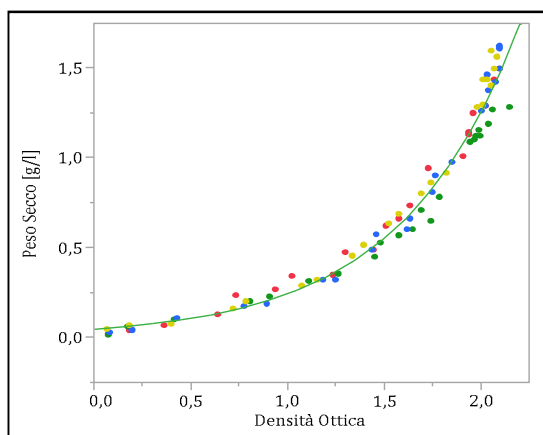


Figura 5.2: Curva di regressione Densità Ottica-Peso secco

Durante gli esperimenti sono stati monitorati e registrati anche il pH, la temperatura, la conducibilità elettrica e la quantità di anidride carbonica presente in soluzione, tramite appositi sensori e software dedicato. Prima di eseguire le campagne sperimentali si è proceduto anche alla caratterizzazione del profilo di illuminazione lungo lo sviluppo dei fotobioreattori, per mezzo di un sensore *LI-COR quantum*, (modello LI-190), ottenendo la cosiddetta *photosynthetically active radiation (PAR)*. Maggiori dettagli sono stati riportati nel paragrafo 5.3.4 dedicato ai fotobioreattori.

5.3.3 Analisi chimiche

Come anticipato nel precedente paragrafo, oltre alle letture della densità ottica, si è proceduto a posteriori con l'analisi del peso secco (dry-weight) secondo la metodica prevista nel testo *Standard Methods* (Clasceri et al., 1999). Sono stati prelevati e analizzati due campioni per giorno, per tutta la durata delle prove, che è stata di circa nove giorni per ciascun esperimento. La procedura prevede la filtrazione di 40 ml di campione su membrane tipo *Whatman* da 0.45 µm di porosità, il lavaggio del filtro con 20 ml di acqua distillata una volta terminata la filtrazione della sospensione algale per rimuovere l'eccesso di sale e infine l'essiccamento fino a peso costante del filtro alla temperatura di 105 °C. Il peso secco si ottiene semplicemente per differenza di peso della membrana filtrante prima e dopo la filtrazione, essendo noto il volume filtrato.

Tutti i filtri sono stati condizionati portandoli a peso costante prima di compiere le filtrazioni.

Il liquido filtrato a $0.45\ \mu\text{m}$ è stato utilizzato per le analisi di nitrati, urea e fosforo. nitrati e fosforo sono stati determinati con un cromatografo ionico della ThermoScientific™ (Dionex™ ICS-2000). Data l'elevata presenza di sostanze interferenti presenti nell'acqua di mare, tutti i campioni sono stati pretrattati con cartucce filtranti Dionex™ ON GUARD II Ag 1ml, che permettono la rimozione degli ioni *Cl*⁻, *Br*⁻ e *I*⁻, che interferiscono con le analisi di azoto e fosforo e possono ridurre nel tempo la vita della colonna cromatografica oltre che sovrapporsi ai picchi degli analiti cercati.

Per la determinazione dell'urea, è stata utilizzata una metodica colorimetrica proposta da Mulvenna (1991), sviluppata specificamente per acque di mare e modificata allo scopo. I campioni in precedenza filtrati, sono trattati a pH acido con *Diacetylmonoxime* e *Thiosemicarbazide*, incubati a 85 °C per 20 minuti, raffreddati con un bagno di acqua e ghiaccio per 5 minuti e infine l'assorbanza a 520 nm è stata misurata con uno spettrofotometro Varian Cary®50 UV-VIS. Nella fase di calibrazione è stato inoltre calcolato il limite di quantificazione per l'urea, che è risultato pari a 1.5 [mg/l] e l'incertezza della misura, che per nel *range* di calibrazione 0-150 [mg/l], è risultata pari a ± 1.5 [mg/l] (come valore massimo). Per il calcolo sono state utilizzate le procedure di calcolo statistico dell'Unichim, che adottano un approccio metrologico.

5.3.4 Fotobioreattori

Per le prove sperimentali sono stati utilizzati fotobioreattori su scala di laboratorio (volume di lavoro di 6 litri) e su scala pilota (volume di lavoro 120 litri), messi a disposizione da Sardegna Ricerche e installati presso il centro IMC di Oristano.

Entrambe le taglie dei fotobioreattori sono di tipo a colonna anulare, costituiti da due cilindri di Plexiglas® e sigillati sul fondo per permettere il contenimento della coltura. Nella parte superiore sono chiusi, non ermeticamente, per permettere la fuoriuscita dei gas iniettati. Sul fondo della sezione anulare è posto un diffusore che permette l'insufflazione di aria e anidride carbonica. All'interno della sezione anulare, che non è a contatto con il *medium* colturale, sono poste le lampade (tipo LUMILUX *Cool Daylight*) che simulano la luce diurna, regolabili per numero e dotate di timer per accensione e spegnimento.

Nei fotobioreattori da laboratorio (6 litri) sono presenti 4 lampade di potenza nominale pari a 22,5 Watt l'una, mentre nei fotobioreattori di scala pilota sono presenti 6 lampade da 58,0 Watt. Per entrambi i reattori, come già accennato, è stata misurata la radiazione fotosintetica attiva (PAR) in termini di densità di flusso fotonico (DFF), espressa in $[\mu\text{mol}\ \text{s}^{-1}\ \text{m}^{-2}]$. I valori di DFF stimati per i diversi schemi reattoristici sono riassunti nella tabella 5.2, per le due differenti configurazioni utilizzate, ossia con 2 o 4

lampade accese. I reattori sono stati denominati F o R a seconda della capacità, rispettivamente 6 o 120 litri, come riportato sempre nella tabella 5.2.

Reattore	Volume [litri]	n. lampade	DFP [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$]	DFP [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$]
F_1/F_2	6	2/4	Con 2 lampade: 179 [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$], pari a 38,9 [Wm^{-2}]	Con 4 lampade: 267 [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$], pari a 58,0 [Wm^{-2}]
R_1/R_2	120	2/4/6	Con 2 lampade: 116 [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$], pari a 25,2 [Wm^{-2}]	Con 4 lampade: 170 [$\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$], pari a 36,9 [Wm^{-2}]

Tabella 5.2: Dettagli della luce irradiata delle due taglie di reattori per le condizioni operative adottate (le 6 lampade non sono state utilizzate)

Entrambi i reattori sono corredati di un sistema per la regolazione del flusso d'aria e hanno la possibilità di insufflare CO_2 , da bombole ad elevata purezza e controllare il pH della sospensione per mezzo di un dispositivo a programmazione di tipo elettronico (PLC). Per tutte le prove descritte in questo lavoro di tesi, si è scelto di operare nelle seguenti condizioni: temperatura $T = 22.0\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,60 \pm 0.2$, flusso d'aria volumetrico $Q_{\text{air}} = 2,0\text{ l/min}$ e CO_2 con un flusso volumetrico pari a $Q_{\text{CO}_2} = 0,2\text{ l/min}$. Nella figura 5.3 è riportata una ricostruzione 3D dell'apparato pilota utilizzato, nella quale si possono vedere le diverse componenti dell'impianto quali: coppia dei fotobioreattori a mescolamento perfetto da 120 litri, serbatoio di accumulo per le microalghe prodotte, serbatoio di alimentazione di acqua salata, sezione di pompaggio dell'aria, insufflaggio di CO_2 , pompa di calore per il controllo di temperatura e centralina elettronica con i PLC per la regolazione di luce, temperatura, pH e flussi di gas. Nella figura 5.5 è riportata la foto dei reattori da 120 litri. Nella tabella 5.3 vengono riportati i dettagli della geometria dei due fotobioreattori, come da dati di targa del produttore.

Reattore	Altezza Totale	Cilindro esterno		Cilindro interno		Camera di coltura	
		Diametro	Altezza	Diametro	Altezza	Spessore	Volume
F1/F2	80	15	68	9	68	2,7	6 (l)
R1/R2	227,5	50	195	40	205	4,5	120 (l)

Tabella 5.3: Dettagli dimensioni fotobioreattori (cm)



Figura 5.3: Riproduzione 3D dell'impianto pilota utilizzato per le prove sperimentali

Per la caratterizzazione fluidodinamica dei reattori sono state condotte prove di tipo stimolo-risposta, con stimolo di tipo impulsivo, per opera di un elettrolita (KCl 3 M). Monitorando la conducibilità della soluzione in uscita dai fotobioreattori, per mezzo di una sonda conduttimetrica tarata, si sono potute ricostruire le curve di distribuzione dei tempi di permanenza (RTD). Le prove sono state condotte per diverse portate di flusso d'aria/ CO_2 e diverse portate di liquido in ingresso, avendo configurato opportunamente i reattori in modalità CSTR. Le prove hanno dimostrato, come riportato nel grafico della figura 5.4, la perfetta sovrapponibilità delle curve dei tempi di permanenza teoriche, con le prove sperimentali effettuate sui reattori utilizzati. Questo ci permette di dire che i reattori hanno un comportamento ideale, paragonabile a un reattore a miscelamento perfetto, grazie alla turbolenza generata dall'insufflazione dell'aria. Si fa notare che come mostrato in figura 5.4, la conducibilità non raggiunge lo zero per via dell'*offset* dato dai sali presenti nell'acqua marina. Inoltre, come è lecito aspettarsi, la curva non parte esattamente dal tempo zero per via della non perfetta idealità del sistema, anche se si raggiunge il picco di concentrazione in qualche decina di secondi.

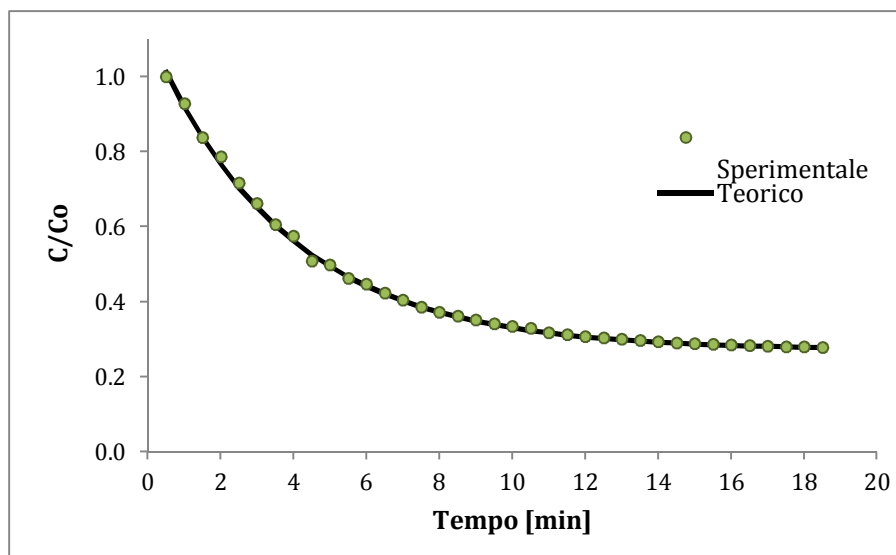


Figura 5.4: Curva dei tempi di permanenza teorica sovrapposta ai punti sperimentali (stimolo impulsivo)



Figura 5.5: Fotobioreattori con biomassa algale in fase di crescita (Sn) e in fase di disinfezione con ipoclorito di sodio (Dx) - foto G. Saiu

5.4 Studio del comportamento della *Nannochloropsis oculata*

In questo paragrafo, con lo scopo principale di valutare l'impatto di diversi parametri sulla crescita algale e la presenza di alti carichi di inquinanti, sarà descritto il set-up sperimentale che, come per tutti gli esperimenti condotti, si basa su di un approfondito studio bibliografico che poi viene seguito dalla pianificazione mediante l'approccio del *Design of Experiment*.

Dato che il contenuto delle cellule algali e la composizione dei lipidi prodotti durante la crescita sono parametri influenzati da diversi fattori, quali specie algale, temperatura, irraggiamento, disponibilità di nutrienti e concentrazione di CO₂ (Hu, 2004, Hu *et al.*, 2008, Guschina *et al.*, 2006), per il lavoro di questa tesi si è stabilito di studiare l'impatto di alcuni di questi parametri sulla *Nannochloropsis oculata*, che presenta interessanti capacità in termini di accumulo di lipidi e può essere utilizzata efficacemente in acquacultura (Vandermeulen & Gordin 1990; Lefebvre, Hussenot & Brossard 1996) o come fonte di prodotti ad alto valore aggiunto (Kromkamp *et al.*, 2009).

Per studiare la crescita della *Nannochloropsis oculata* e per verificare le sue capacità degradative nei confronti di azoto e fosforo, si è deciso di variare congiuntamente i seguenti fattori: intensità luminosa irradiata alle alghe durante la crescita, quantità di anidride carbonica immessa nel sistema e concentrazione di nitrati e di urea (Flynn *et al.*, 1993, Bernard *et al.*, 2012, Trobajo 2014, Tamburic *et al.*, 2014, Campaña-Torres *et al.*, 2009). Per limitare il numero di esperimenti, vista la lunghezza e complessità delle prove sperimentali, si è deciso di usare un piano frazionario che permette di ottenere un buon compromesso tra numero di esperimenti e perdita di informazioni. In particolare si è utilizzato un piano fattoriale su due livelli e quattro fattori, che necessita di metà delle prove sperimentali rispetto a un piano completo, il cosiddetto *full factorial*. In questo caso il piano frazionario è solitamente indicato con la notazione (2^{4-1}_{IV}), dove in apice sono riportati il numero di fattori (quattro) e la frazione del piano ($1/2$), mentre a pedice viene riportata la 'risoluzione' (IV) del piano fattoriale, parametro importantissimo che indica il livello di possibili 'confondimenti' (*confoundings*). Per altri dettagli sui piani fattoriali si rimanda al paragrafo introduttivo e per una lettura più approfondita a Montgomery (2013).

Nella tabella 5.4 sono riportati i livelli scelti per i parametri di input per il piano sperimentale adottato, che ha comportato l'esecuzione delle otto prove di crescita riportate nella tabella 5.6, ripetute sia sui reattori scala laboratorio che su quelli pilota. La matrice contenente il set-up sperimentale dettagliato è stata ottenuta con la combinazione standard dei fattori, utilizzando la relazione generatrice riportata nella tabella 5.5. Le prove sono state condotte sui reattori delle due taglie con un'illuminazione continua e portando la crescita algale sino al regime stazionario, senza reintegrare nessun liquido nel *medium* di crescita. Il volume delle sospensioni microbiche nel reattore non cambia in maniera significativa. Le uniche variazioni presenti nel sistema sono dovute al prelievo dei campioni per le analisi. Le prove sono

state condotte a temperatura costante di $T=22^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,60$, con piccole variazioni quando non era inserito il sistema di controllo della CO_2 , concentrazioni di CO_2 medie misurate pari a $1,65 \div 2,60 \text{ mg/l}$ e una concentrazione mediamente costante di ossigeno pari a $8,70 \text{ mg/l}$ (valore prossimo alla saturazione per acqua marina).

Per via dei volumi in gioco (reattori da 6 e 120 litri), i tempi per la coltivazione delle microalghe necessarie per gli inoculi (circa una settimana), la durata delle singole prove (circa dieci giorni) e il tempo per la pulizia e disinfezione dei reattori, la campagna sperimentale è durata diversi mesi.

Fattore / Livello	Basso	Alto	Unità di misura
A= Lampade	2	4	Numero†
B=N _a NO ₃	60	120	mg/l
C=Urea	0	120	mg/l
D=CO ₂	0	1	ass/pres††

Tabella 5.4: Livelli scelti per i fattori del piano fattoriale

Termini				
Generatrice (<i>generators</i>)	D=ABC			
Relazione di definizione (<i>Defining relation</i>)	I=ABCD			
Struttura dei confondimenti (<i>Alias structure</i>)	I+ABCD D+ABC	A+BCD AB+CD	B+ACD AC+BD	C+ABD AD+BC

Tabella 5.5: Generatrice del piano frazionario, relazione di definizione e struttura degli alias

Fattore Run	Luce (n°)	Nitrati [mg/l]	Urea [mg/l]	CO ₂ [ass/pres]††
1	2	60	0	0
2	4	60	0	1
3	2	120	0	1
4	4	120	0	0
5	2	60	120	1
6	4	60	120	0
7	2	120	120	0
8	4	120	120	1

Tabella 5.6: Piano fattoriale adottato

† Il numero di lampade è stato variato da due a quattro in base alla prova sperimentale

†† La dicitura si riferisce alla presenza o assenza del controllo del pH tramite aggiunta di CO₂ pura (ass= assente, pres=presente)

5.5 Modellazione della crescita algale

Come introdotto nel capitolo 2, la modellazione della crescita algale è stata effettuata per mezzo di un'equazione di tipo sigmoidale, l'equazione di Gompertz (eq.2.3). Dai dati sperimentali e con l'ausilio di codici scritti in Matlab®, sono stati stimati i parametri biologici per le diverse condizioni sperimentali, con particolare riferimento alla velocità di crescita μ [die⁻¹]. Nella figura 5.6 si riporta a titolo di esempio la densità ottica OD rilevata per le condizioni sperimentali dell'esperimento 'run 4' come riportato nella tabella 5.6, (punti verdi) insieme con le previsioni del modello di Gompertz (linea a tratto continuo). Si può osservare che la curva di regressione segue molto bene i punti sperimentali e gli intervalli di confidenza della previsione del modello (linee tratteggiate) mostrano come l'eventuale errore di stima sia molto piccolo, soprattutto nella fase esponenziale, che è quella di maggior interesse per il calcolo della velocità di crescita.

$$\frac{dA}{dt} = \mu \cdot A(\log A_{\infty} - \log A) \quad (2.3)$$

In figura 5.7 si riportano i valori dell'analisi del peso secco per un altro esperimento di crescita e la curva di regressione ottenuta per le condizioni sperimentali 'run8', tabella 5.6. In questo caso, essendo i punti sperimentali affetti da un errore più elevato dovuto all'analisi gravimetrica, essi danno luogo a delle iperboli fiduciarie leggermente più ampie rispetto ai risultati relativi alla densità ottica mostrati in precedenza. Si può comunque notare che anche in questo caso la curva di regressione segue molto bene i punti sperimentali. Per completezza si riporta che per la regressione dei punti sperimentali di densità ottica (run4), si trova un valore di MSE pari a $4,1 \times 10^{-4}$, contro un MSE, relativo alla regressione dei punti del peso secco, pari a $1,3 \times 10^{-3}$. Analogamente per il parametro S (definito in eq. 2.38, cap. 2), associato alla regressione dei dati della densità ottica, si trova 0,020, contro uno 0,037 per il peso secco. Nelle tabelle 5.7 e 5.8 si riportano i valori stimati per le velocità di crescita a partire dal peso secco e il valore di peso secco massimo raggiunto per ogni esperimento su entrambe le scale di reattori.

Reattore	DFF	NaNO ₃ [mg/l]	Urea [mg/l]	CO ₂	Peso secco [g/l]	μ [d ⁻¹]
F1	267	120	0	0	0,578	0,290
F2	179	60	0	0	0,368	0,254
F1	267	60	0	1	0,366	0,112
F2	179	120	0	1	0,443	0,171
F2	179	60	120	1	0,412	0,227
F1	267	120	120	1	0,484	0,256
F1	267	60	120	0	1,097	0,304
F2	179	120	120	0	0,746	0,262

Tabella 5.7: Riepilogo prove, peso secco e velocità di crescita per i reattori da 6 litri

Reattore	DFF	NaNO ₃ [mg/l]	Urea [mg/l]	CO ₂	Peso secco [g/l]	μ [d ⁻¹]
R1	170	120	0	0	0,665	0,264
R2	116	60	0	0	0,353	0,190
R1	170	60	0	1	0,613	0,244
R2	116	120	0	1	0,492	0,245
R1	116	60	120	1	0,587	0,337
R2	170	120	120	1	0,867	0,338
R1	170	60	120	0	0,584	0,326
R2	116	120	120	0	0,406	0,312

Tabella 5.8: Riepilogo prove, peso secco e velocità di crescita per i reattori da 120 litri

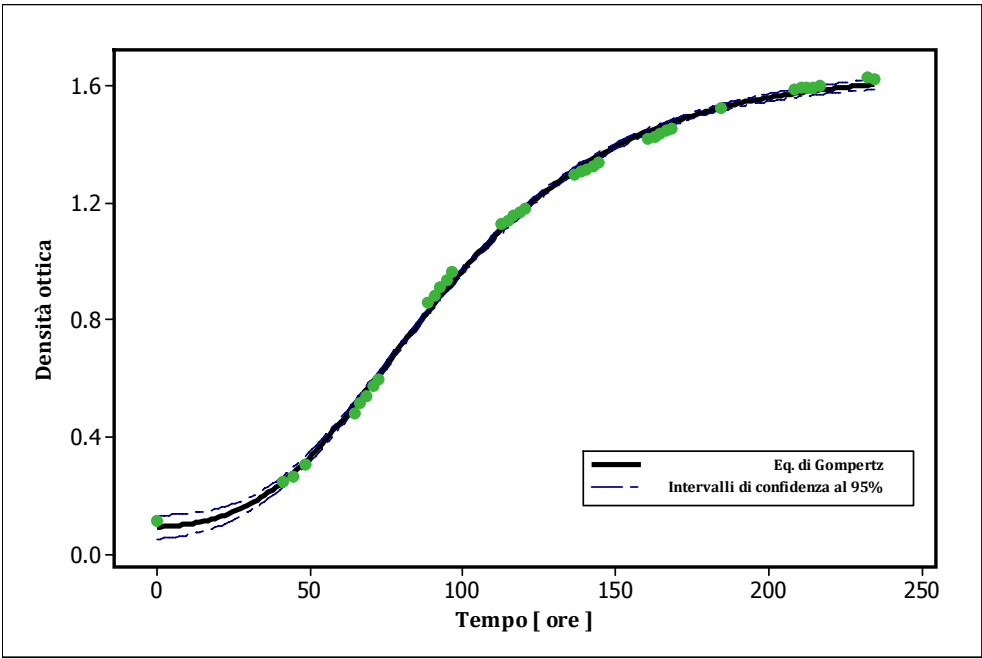


Figura 5.6: Interpolazione dei punti sperimentali (OD 750 nm) con eq. di Gompertz

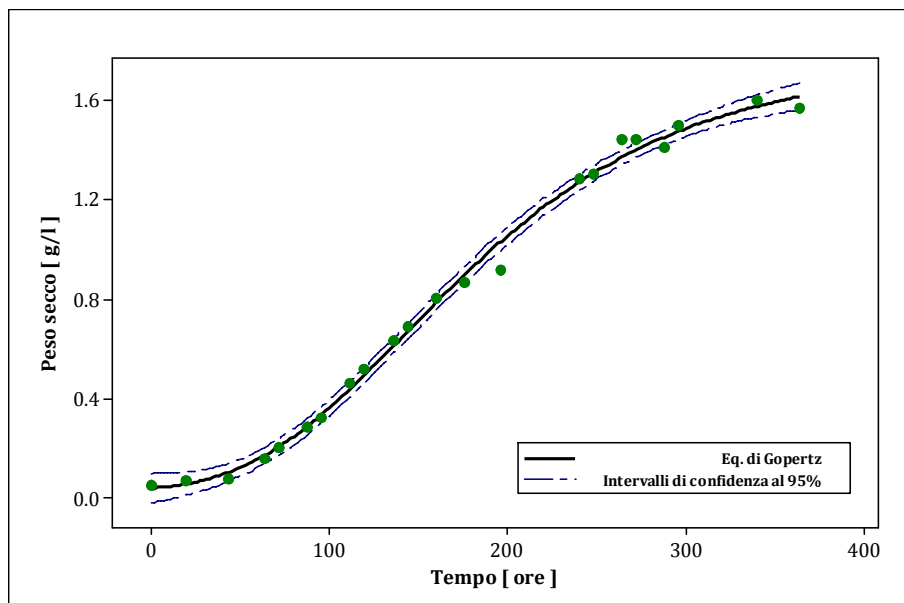


Figura 5.7: Interpolazione dei punti sperimentali (peso secco) con eq. di Gompertz

5.6 Analisi del piano fattoriale

L'impatto dei quattro fattori scelti sulla crescita algale (intensità luminosa, concentrazione dei nitrati e dell'urea e aggiunta di CO_2) è stato analizzato studiando le variazioni del parametro μ (velocità di crescita) utilizzando l'algoritmo di Yates (Nelson *et al.*, 2003). Si fa presente che si potrebbe utilizzare anche una procedura alternativa che per mezzo di una combinazione lineare delle risposte (Montgomery, 2013), si possono calcolare in maniera analoga gli *effetti*, partendo dagli output della campagna sperimentale (velocità di crescita in questo caso), permettendo di trarre significative informazioni sul sistema oggetto di studio.

Si ricorda che gli effetti calcolati, messi in ordine decrescente e in valore assoluto in un diagramma a barre, vanno a formare il diagramma (o carta) di Pareto, figura 5.8. Nella carta di Pareto è inoltre riportata una soglia ottenuta con un test di significatività statistica, che in questo caso si ottiene con il metodo di Lenth per via dell'assenza di repliche (Lenth, 1989). Questo test ci permette di discriminare i fattori e gli effetti combinati che danno un impatto significativo sul sistema.

I risultati riportati sulla carta di Pareto riguardano la campagna sperimentale condotta sui reattori da sei litri. La soglia di significatività tracciata corrisponde a un valore di $\alpha=10\%$ (errore di prima specie), valore più grande di quello solitamente utilizzato ($\alpha=5\%$) preso in considerazione del fatto che un valore così severo non ci avrebbe permesso di apprezzare l'impatto di alcuni effetti. Questa scelta è stata presa in

considerazione del numero di esperimenti a nostra disposizione e per cercare di rendere il test più informativo.

Come si può vedere dalla carta di Pareto, che riporta i primi risultati per la campagna sperimentale esplicitata nella tabella 5.5, la luce fornisce il contributo maggiore alla crescita algale, come ci si doveva aspettare. Si trova però, che è significativa anche l'interazione tra l'intensità luminosa e la concentrazione di nitrati, cosa che sarà esplorata meglio nel seguito (fattori A e AB). Per contro, sia l'urea che l'anidride carbonica addizionata al sistema non danno un contributo statisticamente significativo alla crescita algale (fattori C e D). Probabilmente la quantità di anidride carbonica presente nell'aria insufflata dalla pompa è sufficiente alle microalghe come fonte di carbonio e l'aggiunta, atta a regolare il pH della soluzione, non comporta miglioramenti sulla velocità di crescita. Anche l'aggiunta di urea non dà risultati statisticamente apprezzabili nelle condizioni sperimentali esplorate.

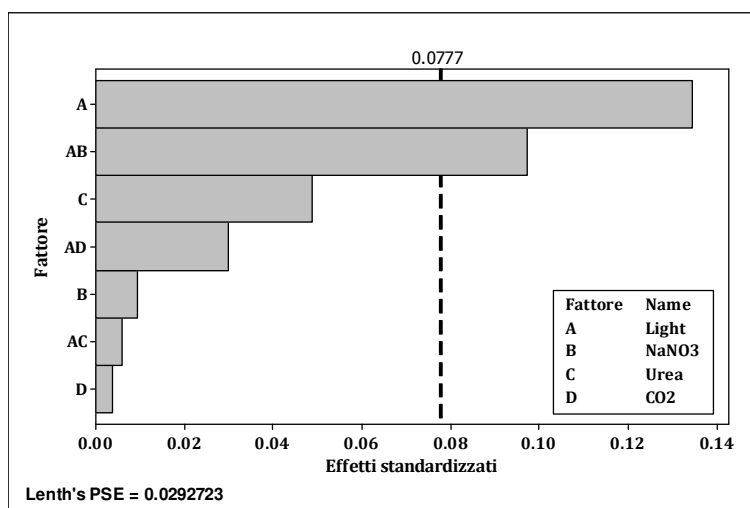


Figura 5.8: Carta di Pareto per gli effetti calcolati sul piano 2^{4-1} (adimensionale)

Analizzando con maggior dettaglio il piano sperimentale, poiché sia urea che l'anidride carbonica risultano fattori non statisticamente significativi dal test di Lenth, come descritto da Montgomery, possono essere omessi dall'analisi del piano. Questa valutazione ci permette di proiettare il piano fattoriale frazionario su di un piano fattoriale completo a due fattori (piano 2^2), che considera solamente l'impatto della intensità luminosa e della concentrazione di nitrati. Alla luce di queste considerazioni di origine statistica, il piano può considerarsi un fattoriale completo (*full factorial*). In figura 5.9 è riportato il nuovo grafico di Pareto, contenente gli effetti ricalcolati per i soli due parametri rilevati significativi e applicando un test di significatività con una soglia dimezzata, $\alpha=5\%$.

L'assenza di significatività trovata per i parametri urea e CO₂ nelle condizioni sperimentali esplorate, ha portato alla possibilità di valutare due repliche per

esperimento permettendo di eseguire il test dell'analisi della varianza (ANOVA), senza perdita significativa di informazioni e dando una conferma più robusta dei risultati ottenuti dal piano frazionario. Nella tabella 5.9 sono riportati i risultati del test ANOVA, dal quale risulta che l'intensità luminosa è confermata come fattore predominante ($p\text{-value} = 0.01$). La velocità di crescita cresce con l'intensità luminosa, come conferma anche la figura 5.10 degli effetti principali. L'interazione doppia intensità luminosa-carico di nitrati ($p\text{-value}: 0.028$) ha un effetto migliorativo da parte dell'intensità luminosa, mentre gli alti carichi di nitrati tendono a ridurre la velocità di crescita o comunque a non farla aumentare.

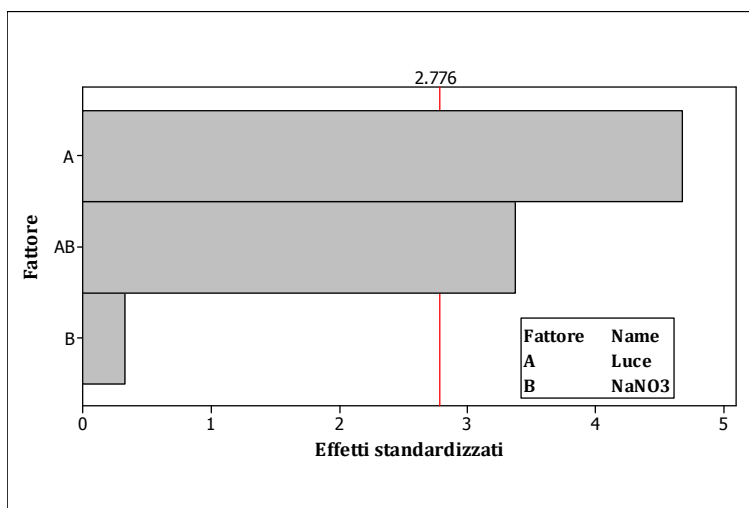


Figura 5.9: carta di Pareto ricalcolata per gli effetti sul piano 2^2 (adimensionale)

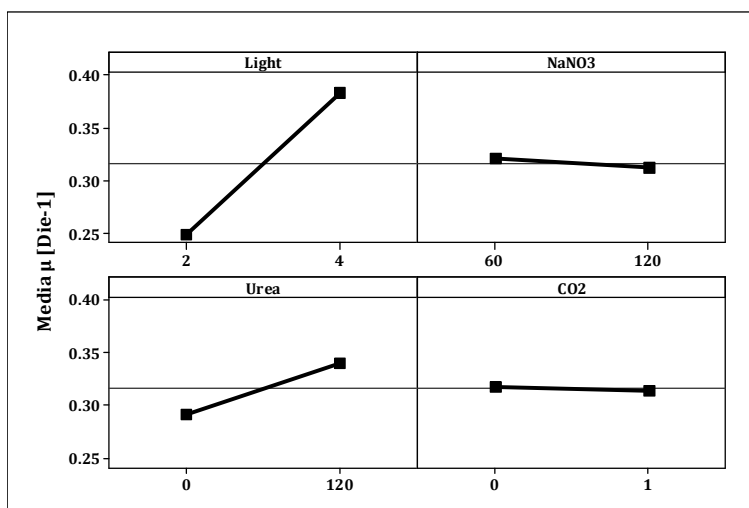


Figura 5.10: effetti dei fattori principali sulla velocità di crescita algale

Term	Effect	Coef	SE Coef	DoF	SSE	MSE	F-ratio	p-value
Constant	-	0.31642	0.01438	2	0.0362	0.0181	10.97	0.024
Light	0.13440	0.06720	0.01438	1	0.0361	0.0361	21.83	0.010
NaNO ₃	-0.00931	-0.00466	0.01438	1	0.0001	0.0001	0.10	0.762
Light/NaNO ₃	-0.04855	-0.04855	0.01438	1	0.0189	0.0189	11.40	0.028

Tabella 5.9: Test ANOVA sulla proiezione del piano fattoriale frazionario sul 'full factorial 2²'

In figura 5.11 sono riportate le curve di isolivello relative all'interazione doppia intensità luminosa/concentrazione di nitrati. Questo grafico evidenzia la presenza di non linearità tra i due fattori e si può vedere come la velocità di crescita sia maggiore per il valore massimo di intensità luminosa (per valore più basso di nitrati), mentre per valori alti di entrambi i fattori la velocità di crescita diminuisce, ad indicare un probabile effetto inibitorio dei nitrati ad alti carichi (120 mg/l).

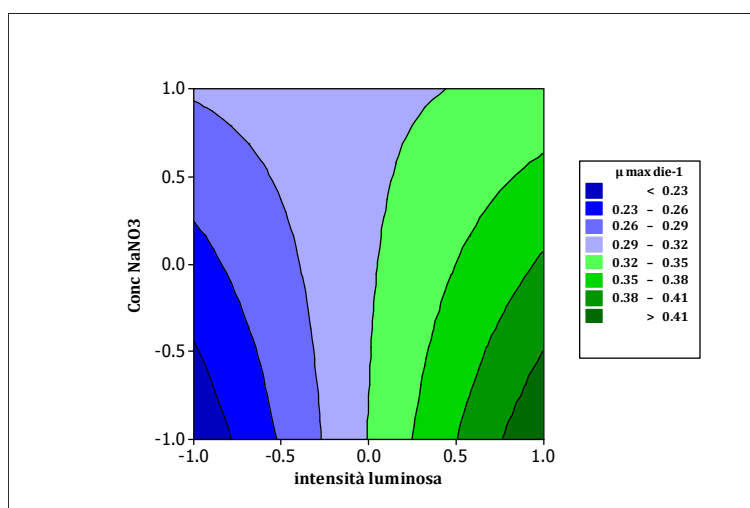


Figura 5.11: curve di isolivello per l'interazione doppia rilevata (normalizzato)

5.7 Degradazione di azoto e fosforo

Relativamente al consumo di azoto e fosforo, si riportano nella tabella 5.10 i valori di rimozione (indicati con 'R-xx'), espressi come consumo giornaliero per litro di sospensione microbica, e le loro percentuali di rimozione (indicati con '%C') per i vari composti monitorati, N-NO₃, urea e P-PO₄. Si ricorda che le percentuali di rimozione si riferiscono a un periodo di circa 9/10 giorni per ogni esperimento (definito 'run'), che corrisponde alla durata delle prove, che sono state condotte sino al raggiungimento del *Plateau*, dove non vi era più produzione di biomassa. Nelle figure da 5.12 a 5.14 vengono riportati i profili di degradazione per i diversi nutrienti analizzati, per tutte e otto le prove sperimentali del piano fattoriale adottato, relativamente ai reattori di scala laboratorio (6 litri).

I nitrati, al tempo iniziale, erano presenti nel *medium* in concentrazioni variabili tra 60 e 120 [mg/l], e sono degradati nell'arco di pochi giorni (dai 2 ai 6) in funzione delle condizioni sperimentali, raggiungendo valori di consumo giornaliero massimi nelle condizioni sperimentali 'run 3 e 4' (circa 30 mg/l/die). In queste condizioni sperimentali, tabella 5.5, l'urea è assente e la differente intensità luminosa porta a una più rapida degradazione dei nitrati in termini di tempo, a parità di rateo di consumo medio, per la prova sperimentale 'run 4', (nitrati al tempo iniziale 120 mg/l e intensità luminosa 36,9 Wm⁻²). Anche per la prova sperimentale 'run 8' (nitrati al tempo iniziale 120 mg/l, urea al tempo iniziale 120 mg/l, intensità luminosa 36,9 Wm⁻² e iniezione di CO₂ pura) si hanno valori di consumo paragonabili ai precedenti, anche se più bassi (-25%), in presenza di tutti i fattori a 'livelli alti' e quindi in presenza di un alto carico di azoto nella soluzione (nitrati e urea a livello alto). Si rammenta che il controllo del pH, compiuto con l'aggiunta di un flusso controllato di CO₂ e la presenza di urea, non hanno dato significativi risultati sulla crescita algale o sulla degradazione dei nitrati.

Per quanto concerne l'urea, quando presente (prove run 5÷8, sempre in concentrazione 120 mg/l al tempo iniziale), il *rateo* di rimozione più alto è stato trovato per l'esperimento 'run 6' (circa 9 mg/l/die), raggiungendo nell'arco di una decina di giorni rimozioni dell'ordine del 73%, che va però sommata alla contemporanea rimozione dei nitrati (figura 5.12). Infatti, nello specifico esperimento 'run 6', si avevano al tempo iniziale 60 [mg/l] di nitrati e 120 [mg/l] di urea. Si può vedere dai grafici in figura 5.13 e figura 5.15, e dai *rateo* di consumo, che l'urea è degradata meno rapidamente rispetto ai nitrati, probabilmente a causa della sua minore biodisponibilità e la necessità di essere prima scissa in una forma più semplice per poi essere utilizzata. Per mezzo di altre prove di crescita, compiute su periodi temporali più lunghi (circa 15 giorni), si è rilevato che le microalghe riescono a degradare in maniera completa i carichi di azoto nitrico (120 mg/l NaNO₃) e urea (120 mg/l) aggiunti al *medium* colturale. Il *trend* del consumo dell'urea per tale esperimento è riportato in figura 5.16.

Anche il fosforo, aggiunto come ortofosfati, è rimosso con percentuali che oscillano tra il 27% il 60%, sempre in funzione delle condizioni sperimentali, ottenendo il massimo consumo nell'esperimento 'run 6' (figura 5.14).

La stessa campagna sperimentale è stata condotta in parallelo anche utilizzando i fotobioreattori di scala pilota (120 litri), ma avendo dato i medesimi risultati non viene qua riportata, perché non aggiungerebbe molto alla trattazione. Tuttavia, per maggior completezza, tutte le curve di crescita, le relative curve di regressione con intervalli di confidenza e le analisi relative ai nitrati e al fosforo, sono riportate nell'appendice A.3.

Run	R-NO ₃ [mg/l/Die]	C% NO ₃	R-Urea [mg/l/Die]	C% Urea	R-PO ₄ [mg/l/Die]	C% PO ₄
1	14.9	99.3	-	-	0.27	30.8
2	20.0	100.0	-	-	1.01	35.0
3	30.0	100.0	-	-	0.19	26.6
4	29.9	99.7	-	-	0.39	36.2
5	12.0	100.0	4.8	57.7	0.57	48.4
6	10.5	100.0	9.0	72.6	0.53	59.5
7	19.4	96.9	5.2	44.7	0.23	52.1
8	24.0	100.0	3.8	47.8	0.21	40.6

Tabella 5.10: Consumo specifico inquinante e percentuale di rimozione per nitrati, urea e fosfati
(Dove è presente il trattino '-' si indica che l'urea non era presente nel medium)

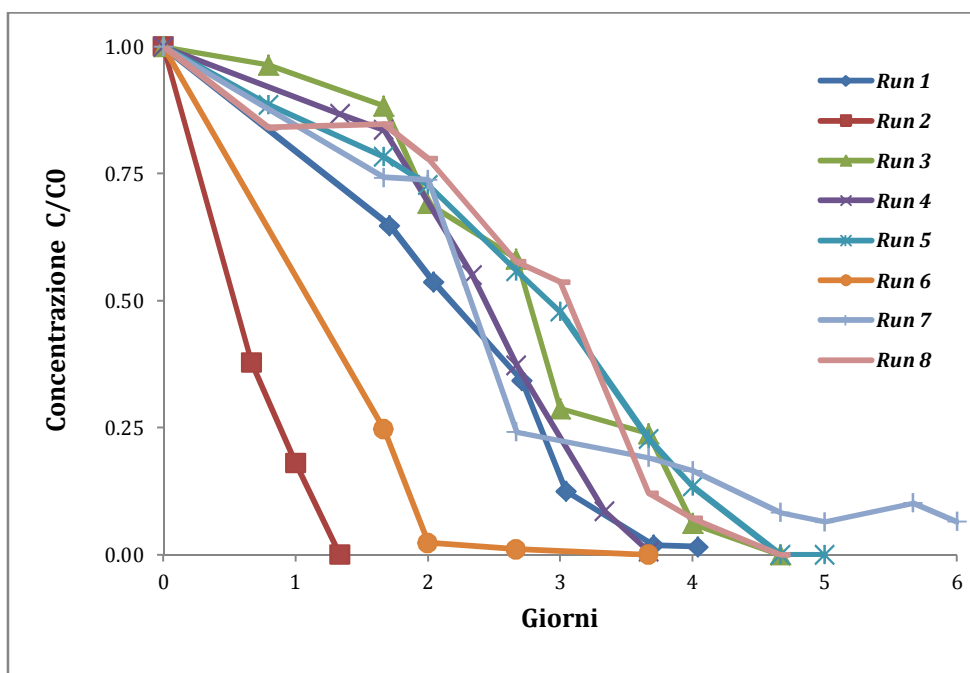


Figura 5.12: Curve di consumo dei nitrati per i reattori da 6 litri

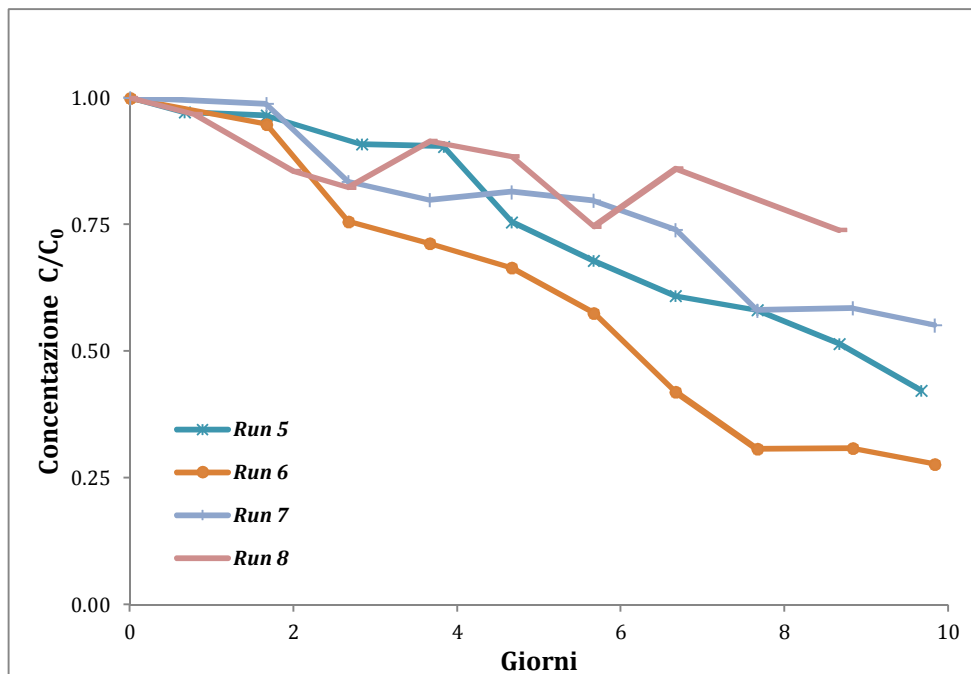


Figura 5.13: Curve di consumo dell'urea per i reattori da 6 litri

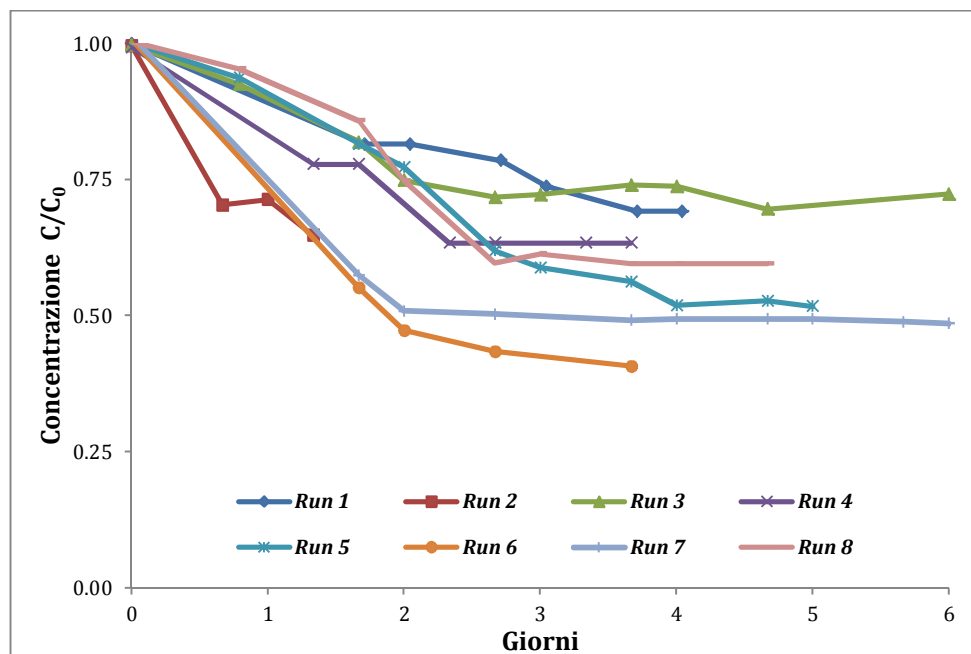


Figura 5.14: Curve di consumo del fosforo per i reattori da 6 litri

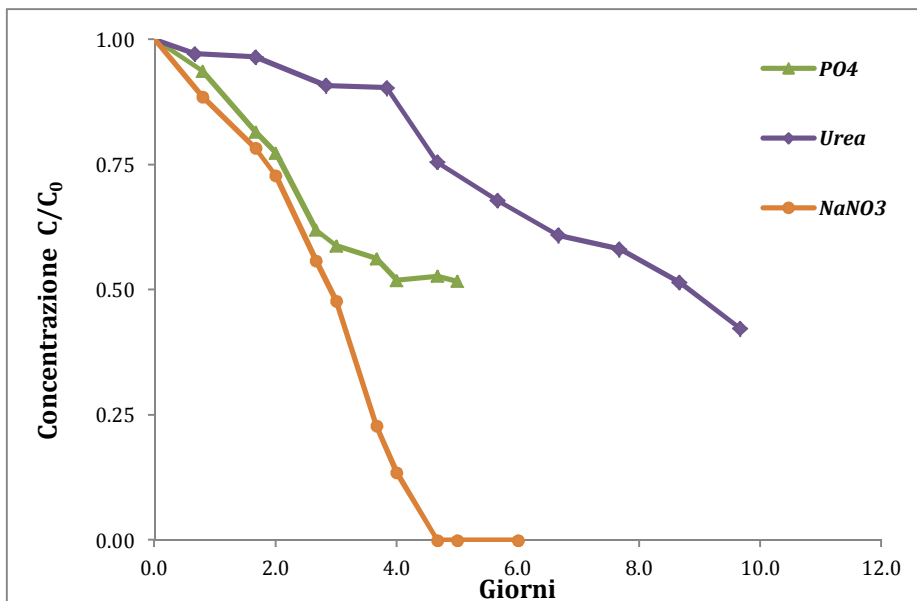


Figura 5.15: Curve di consumo per i nutrienti, run 6, reattore 6 litri

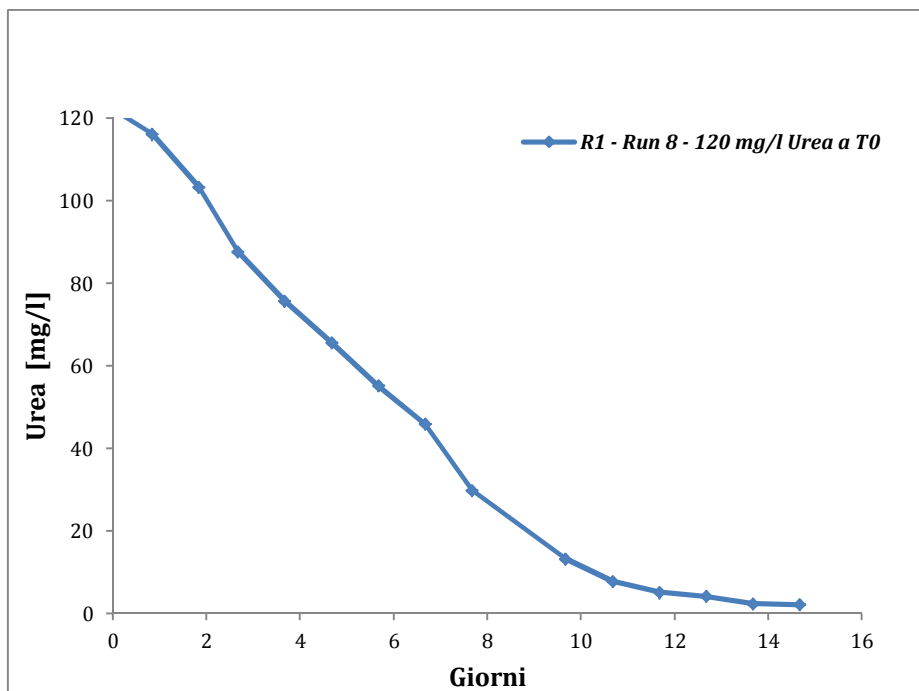


Figura 5.16: Curva di consumo per l'urea, condizioni sperimentali 'run 8'

5.8 Impatto del fotoperiodo e alti carichi di azoto

Con lo scopo di verificare l'effetto di un eventuale impatto sulla crescita algale dovuto a un fotoperiodo di irraggiamento e la capacità degradativa di alti carichi di nitrati, si è deciso di effettuare un'altra campagna sperimentale. In questo secondo ciclo di esperimenti sono state condotte alcune prove, alternando periodi di luce e di buio di 12 ore. Altre prove sono state invece eseguite con irradiazione di luce continua. Inoltre il *medium* è stato modificando aggiungendo quantità di azoto, come sale inorganico NaNO_3 , in concentrazioni pari a 500 e 1000 [mg/l].

5.8.1 Impatto della diversa scala di reattori sul calcolo della velocità di crescita

Prima degli esperimenti sopra citati, sono state eseguite delle prove per verificare la sovrapposibilità degli esperimenti condotti sui reattori di scala di laboratorio e quelli di scala pilota, eseguendo la prova sperimentale, definita in precedenza 'run 8', in doppio sui reattori scala laboratorio (6 litri) e su quelli pilota (120 litri), per verificare principalmente lo scostamento nei valori stimati della velocità di crescita.

Nelle tabelle 5.11, sono riportate tutte le statistiche calcolate per i reattori da 6 litri, comprese le velocità di crescita e i parametri relativi alla regressione non lineare. Nella tabella 5.12 è riportato il test *lack of fit*, il cui *p-value* associato è ben al di sopra della soglia statistica di rilevanza (*p-value*=0.885) indicando un elevato grado di bontà per l'equazione di regressione scelta.

Reattori da 6 litri			Regressione non lineare	
Parametri stimati		SE par.	SSE	0.08809
A	2,09	0.01030	DFE	62
μ [dei-1]	0,32	0.00037	MSE	0.00142
Lambda	5,45	3.9509	S	0.03767

Tabella 5.11 Stima dei parametri di regressione e statistiche associate

Sorgente	GdL	SS	MS	F	P
Errore	62	0.088009	0.001419		
Lack of fit	29	0.031776	0.001096	0.64	0.885
Pure Error	33	0.056233	0.001704		

Tabella 5.12: Test *lack of fit* reattori da 6 litri

Nelle tabelle 5.13 e 5.14, in maniera analoga sono riportate le statistiche per i reattori da 120 litri. Anche in questo caso il *p-value* associato al test *lack of fit* è ben al di sopra della soglia statistica di rilevanza (*p-value*=0.999). Le figure 5.17 e 5.18 riportano i grafici con le regressioni e i punti sperimentali per entrambe le tipologie di reattori.

Reattori da 6 litri			Regressione non lineare	
Parametri stimati		SE par.	SSE	0.28267
A	2.04	0.01942	DFE	62
μ [dei-1]	0.30	0.00066	MSE	0.004559
lambda	3.67	7.7741	S	0.067522

Tabella 5.13: stima dei parametri di regressione e statistiche associate

Sorgente	GdL	SS	MS	F	P
Errore	62	0.28267	0.004559		
Lack of fit	29	0.053505	0.001845	0.27	0.999
Pure Error	33	0.229166	0.006944		

Tabella5.14: test lack of fit reattori da 120 litri

Calcolando i valori per le singole prove, le velocità di crescita stimate con l’equazione di Gompertz, sono:

- Reattori da 6 litri $\mu_1=0.331$ (*die*⁻¹), $\mu_2=0.319$ (*die*⁻¹);
- Reattori di 120 litri $\mu_3=0,291$ (*die*⁻¹), $\mu_4=0,331$ (*die*⁻¹);

Si mette in evidenza come i valori stimati siano molto simili tra loro, nonostante i volumi dei reattori siano molto diversi.

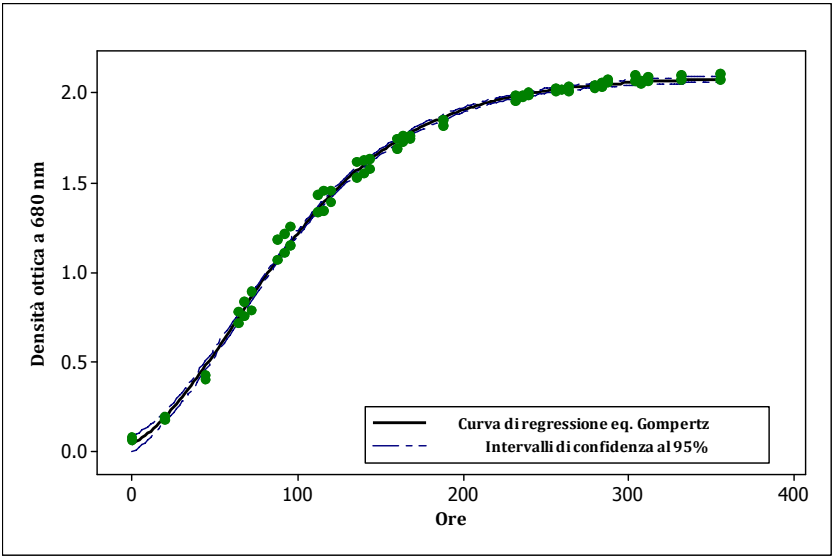


Figura 5.17: Regressione non lineare punti sperimentali per repliche sui reattori da 6 litri

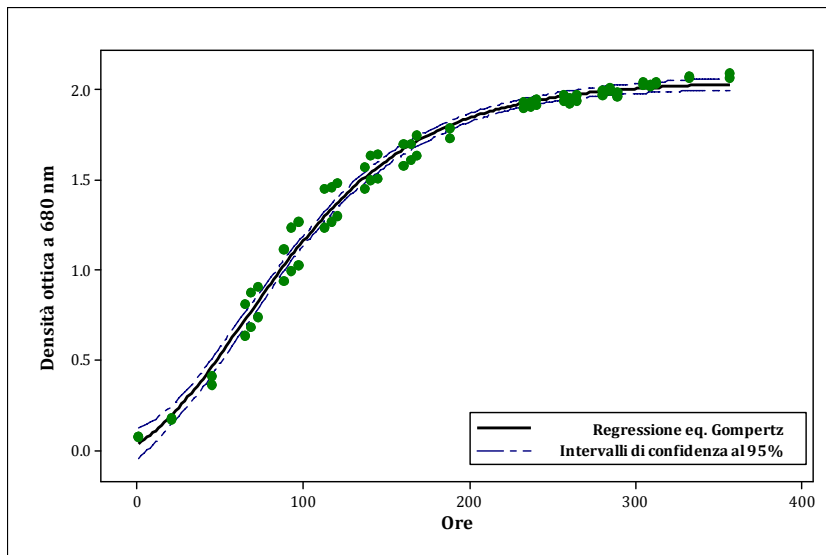


Figura 5.18: Regressione non lineare punti sperimentali per repliche sui reattori da 120 litri

5.8.2 Campagna sperimentale cicli di luce e alti carichi di azoto

L'obiettivo principale di queste prove sperimentali è quello di capire se è necessario, ai fini della depurazione delle acque da azoto e fosforo, rispettare i cicli di luce/buio che avvengono in natura, o se è possibile, nell'ottica di ottimizzare i tempi di rimozione degli inquinanti su scala industriale, adottare un irraggiamento ottimale continuo dei fotobioreattori. Inoltre, al momento dello svolgimento del lavoro, non sono stati trovati lavori scientifici relativi alla degradazione di nitrati da parte di microalghe a carichi così elevati in fotobioreattori di scala pilota. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando entrambe le due tipologie di reattori, scala laboratorio e pilota, tabella 5.15.

Il piano sperimentale utilizzato è un fattoriale completo senza repliche, 2^2 (*full factorial design*). Ovviamente i due fattori scelti sono il fotoperiodo e la concentrazione dei nitrati, che sono fatti variare congiuntamente. In Figura 5.19 si possono vedere gli andamenti della crescita delle colture algali per i diversi fotobioreattori, in termini di densità ottica. Queste curve sono state poi utilizzate per la stima della velocità di crescita algale e per analizzare il piano fattoriale. Tutte le curve sono state riprodotte anche con l'analisi del peso secco, che riesce a misurare direttamente la biomassa generata e ha permesso inoltre il calcolo della velocità di crescita in maniera diretta.

Nella figura 5.19 si può notare come la presenza continua della luce e una maggiore presenza di nitrati porti a una maggiore crescita algale, curve per gli esperimenti 'run 2 e 4', rispetto alle condizioni sperimentali 'run 1 e 3'. Nelle prove sperimentali con fotoperiodo di 12 ore giornaliere, il fattore che limita la crescita risulta essere proprio la luce, vista l'abbondante presenza di nitrati.

Run	Nitrati (mg/l)	Ciclo di luce (h)
1	500	12
2	500	24
3	1000	12
4	1000	24

Tabella 5.15: Piano fattoriale completo 2²

Dall'analisi del piano fattoriale emerge che né il fotoperiodo, né la presenza delle due concentrazioni scelte dei nitrati, influenzano in maniera statisticamente significativa la velocità crescita algale, sempre nell'intervallo di concentrazioni esplorato. Questo porterebbe a poter scegliere se usare luce naturale o artificiale, in base a considerazioni di tipo economico legate al processo.

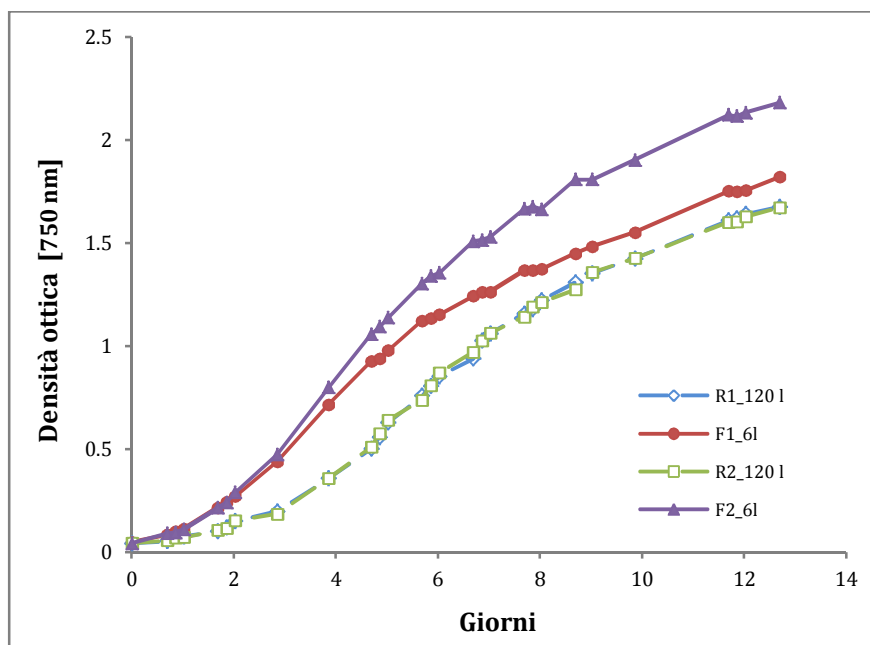


Figura 5.19: Curve di crescita grafico da sistemare..

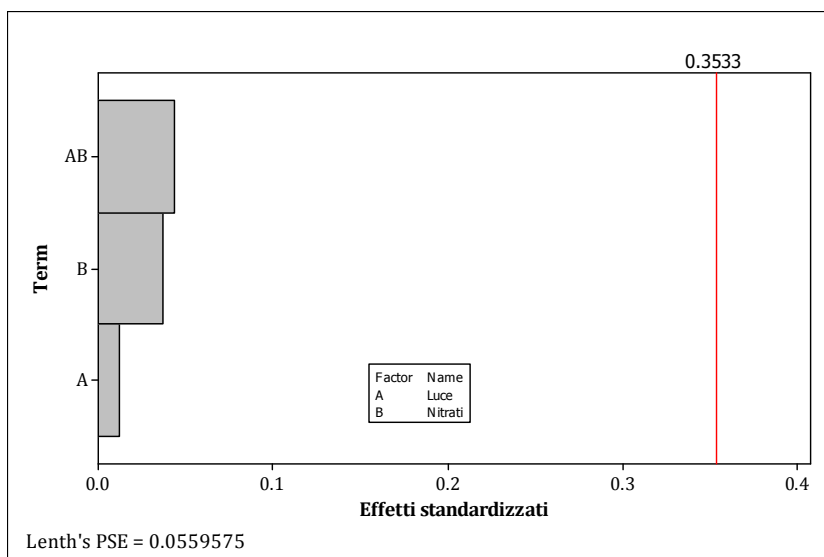


Figura 5.20: Carta di Pareto calcolata per gli effetti sul piano 2^2 (adimensionale)

5.9 Biorisanamento e microalghe, conclusioni

Grazie all'utilizzo del *Design of Experiments* si è potuto evidenziare che la crescita algale della *Nannochloropsis oculata* è statisticamente influenzata sia dall'intensità luminosa che dall'interazione doppia tra quest'ultima e la concentrazione dei nitrati. La presenza dell'urea e l'aggiunta di biossido di carbonio, invece, non sono risultati significativi ai fini della crescita algale e della degradazione dei nutrienti, quantomeno nell'intervallo di concentrazione scelto e per le condizioni sperimentali adottate, relative al piano frazionario 2^{4-1} .

In tutte le prove condotte la rimozione dei nitrati è sempre raggiunta nell'arco di 2-6 giorni, ottenendo un *rateo* di consumo dell'ordine dei $30 \text{ mg}/(\text{l die})$. L'urea è degradata completamente, ma i tempi per la sua rimozione dall'acqua marina sono più lunghi; a parità di concentrazione, rispetto ai nitrati, s'impiegano circa 14-15 giorni per una degradazione completa, con *rateo* di consumo che raggiungono i $9 \text{ mg}/(\text{l die})$. Relativamente al fosforo, aggiunto sotto forma di ortofosfato, nel periodo dei test si ottiene una sua parziale rimozione, raggiungendo consumi del 60%. Questo è principalmente dovuto al raggiungimento della massima crescita algale, *plateau*, per assenza di altri nutrienti, principalmente azoto. Si ricorda che le prove di crescita sono state condotte senza eseguire nessun tipo di reintegro di *medium*.

In base ai risultati appena esposti, in linea teorica, supposto di possedere due unità di fotobioreattori da 500 litri, tenendo come riferimento la capacità di rimozione di $30 \text{ mg}/(\text{l die})$, dovendo trattare un'acqua di scarico proveniente da un impianto di acquacoltura (processo di allevamento a ricircolo, (Pagand *et al.*, 2000) contenente 10

[mg l^{-1}] di azoto inorganico, si potrebbero trattare circa 3000 litri di acqua al giorno. Viste poi le caratteristiche di buona insolazione della Sardegna, la presenza di acqua salata e le caratteristiche del territorio, si potrebbe valutare come una possibile tecnica alternativa o quantomeno un'integrazione delle tecnologia attualmente utilizzata.

Si riporta per completezza, anche se non è stato l'obiettivo principale di questo lavoro di tesi, che nelle condizioni sperimentali scelte e per il ceppo in oggetto, la produzione algale risulta in linea o superiore a quella riportata da altri studi (Chiu *et al.*, 2009; Converti *et al.*, 2009; Campaña-Torres *et al.*, 2012; Olofsson *et al.*, 2014) e non si è a conoscenza di lavori recenti effettuati su reattori di scala pilota di questi volumi. Il valore più alto di biomassa algale prodotto, in termini di peso secco, risulta di $1,61 \text{ g/l}$, in presenza di una DFF di $267 \mu\text{moli}/(\text{s m})$, una concentrazione di NaNO_3 di 120 mg/l , urea pari a 120 mg/l e correzione di pH tramite aggiunta di CO_2 pura. Queste condizioni, per i reattori da 6 litri, hanno portato ad una produzione di biomassa di $2,54 \text{ g/die}$, mentre per i reattori da 120 litri si è rilevata una concentrazione algale pari a $1,50 \text{ g/l}$, ed una produzione di biomassa di $48,52 \text{ g/die}$. Sarebbe interessante per il futuro prevedere un lavoro di scale-up effettuando delle campagne mirate apposite.

Infine, si è rilevato che per la degradazione di alti carichi di nitrati ($500\text{-}1000 \text{ mg/l}$ di NaNO_3), provando a simulare cicli di luce naturali o irradiando costantemente le colture algali, non si hanno prove statisticamente significative di differenze nelle due condizioni. Questo porterebbe a pensare, per condizioni operative simili a quelle esplorate in questo lavoro di tesi e con lo scopo di degradare nitrati, che si potrebbe valutare la possibilità di un trattamento di effluenti su scala industriale, utilizzando la luce solare diurna. Per l'impiego di una costante irradiazione delle microalghe, naturale di giorno e artificiale la notte, si dovrebbe fare una valutazione di costi/benefici, che porterebbe portare al dimezzamento dei tempi di rimozione dei nitrati e del fosforo.

6 Conclusioni

In questo lavoro di dottorato si sono valutate diverse metodologie di biorisanamento volte a degradare composti tossici per l'ambiente, con particolare riferimento agli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e alla rimozione di alti carichi di azoto e fosforo da effluenti di scarico. Tutte le prove sperimentali condotte hanno utilizzato microorganismi naturali e non ingegnerizzati.

Il lavoro è stato incentrato sulle potenzialità di alcuni microorganismi, come funghi della famiglia '*White rot*' e particolari consorzi batterici, relativamente alla degradazione degli IPA. Lo studio è poi proseguito anche con l'ausilio di microalghe, utilizzate per la degradazione di effluenti contenenti alti carichi di azoto e fosforo.

La tesi inizia con un primo capitolo introduttivo, seguito da un secondo capitolo che riepiloga i metodi analitici e il metodo sperimentale adottato. Nel terzo capitolo vengono introdotti gli esperimenti condotti con l'ausilio del fungo *Pleurotus sajor caju*. In una prima fase si è verificata la tolleranza del fungo nei confronti di due IPA selezionati, il pirene e il crisene, e in una seconda fase sono state testate le effettive capacità di degradazione del fungo. La prima fase sperimentale consiste in una campagna di *screening* atta a valutare le migliori condizioni di crescita del fungo in presenza degli inquinanti scelti. Grazie alla progettazione statistica degli esperimenti si sono potute ottimizzare le prove sperimentali e massimizzare le informazioni ottenute. In particolare, si è valutato l'effetto di agenti promotori di solubilità, con l'utilizzo del Tween80 e della lecitina di soia, aggiunti nel mezzo di coltura con lo scopo di aumentare la biodisponibilità degli inquinanti e favorirne l'assorbimento da parte del fungo. Per stimolare la produzione di enzimi prodotti dal fungo si è valutato l'effetto dell'aggiunta di rame, in forma di solfato, addizionandolo in opportune concentrazioni nella fase iniziale degli esperimenti. Si è inoltre studiato l'effetto della presenza di differenti fonti di carbonio e azoto sul comportamento del fungo, sempre nell'ottica di migliorare le condizioni di crescita, la tolleranza e favorire la degradazione dei microinquinanti. Dalle campagne sperimentali condotte è principalmente emerso che la presenza di determinate concentrazioni di Tween80 e ioni rame, aggiunti al *medium* di coltura, siano di aiuto alla tollerabilità da parte del fungo nei confronti dei composti inquinanti e favoriscano lo sviluppo del micelio. La lecitina di soia e il peptone da caseine non sono risultati utili ai fini del miglioramento in termini di sviluppo del fungo e di tolleranza nei confronti degli inquinanti e, comunque, non si è rilevato un contributo statisticamente significativo dovuto alla loro presenza. Infine, si è potuto constatare che il pirene, composto tossico e persistente per l'ambiente, è stato ben tollerato dal fungo permettendo un buon sviluppo del micelio e non ostacolando particolarmente la sua crescita. Il crisene, composto anch'esso tossico e persistente, ma anche mutageno per alcuni organismi, non è risultato invece ben tollerato dal fungo, limitandone la crescita del micelio e talvolta inibendola completamente, quantomeno nell'intervallo di concentrazioni esplorato.

Sulla base dei risultati ottenuti da questi esperimenti condotti su piastre di Petri, si è pianificata un'altra campagna sperimentale, questa volta mirata alla verifica della effettiva degradazione del pirene, composto che è risultato meglio tollerato dal *Pleurotus s.c.*. Anche questa campagna sperimentale si è utilizzato il surfattante Tween80, il cui scopo era quello di svolgere un duplice effetto: aumentare la biodisponibilità degli inquinanti ed aumentarne la solubilità apparente; questo fatto è portato a poter lavorare su livelli di concentrazione decisamente più alti rispetto alla loro solubilità, raggiungendo livelli di concentrazione pari a 15 mg/l sia per pirene che per crisene. Come emerso da altre prove sperimentali l'aggiunta di ioni rame stimola la crescita del fungo, permettendo una produzione maggiore di enzimi, specialmente la laccasi. La campagna sperimentale eseguita in fase liquida (in beute agitate), ha permesso di prelevare campioni di sospensione microbica durante le prove di crescita, per effettuare successivamente analisi chimiche mirate ad ottenere informazioni sulla degradazione del policiclico aromatico. Sia le analisi in cromatografia liquida, che quelle condotte in gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa, hanno evidenziato come il pirene venga degradato quasi completamente dal *medium* e dalle cellule del fungo nell'arco di 15-18 giorni. Contestualmente alla fase di degradazione dell'inquinante, grazie alle analisi cromatografiche è stato possibile rilevare un metabolita principale, che viene generato proprio in corrispondenza della scomparsa del pirene. Attualmente, nonostante le diverse analisi effettuate, non si è pervenuti alla esatta formula di struttura del metabolita. Si può dire, però, che il metabolita prodotto sia meno tossico del pirene, e si può valutare che esso possa essere più facilmente degradabile vista la presenza nella molecola di gruppi OH⁻ e del ridotto numero di anelli condensati rispetto al pirene, che lo rendono più appetibile ai microorganismi.

Nel quarto capitolo si sono discusse le capacità di degradare IPA da parte di consorzi batterici, in particolare con la miscela definita commercialmente *Bulab 5738*. In questa parte del lavoro si sono condotti esperimenti volti allo studio della degradazione di fenantrene e pirene. La campagna sperimentale è stata progettata con l'approccio statistico del *Design of Experiments*, valutando anche se la presenza del composto polifenolico catecolo, potesse migliorare la degradazione dei due inquinanti. Si vuole mettere in evidenza che tutte le prove sperimentali sono state condotte senza l'aggiunta di ulteriori fonti di carbonio, che non fossero i due microinquinanti e il polifenolo. Anche per l'esecuzione di questi esperimenti, si è utilizzato un *surfattante*, il Tween80, i cui livelli di concentrazione adottati sono stati valutati preventivamente alla campagna sperimentale in oggetto. Le prove si sono effettuate variando congiuntamente le concentrazioni dei tre composti, catecolo, fenantrene e pirene, per ottenere informazioni sulle loro eventuali interazioni. Dai dati acquisiti durante la campagna sperimentale si sono potute ottenere informazioni sui parametri di crescita del consorzio batterico, come tempo di latenza, velocità di crescita e concentrazione residua degli inquinanti. Infine, dalle analisi cromatografiche è stato possibile valutare l'effettiva degradazione degli inquinanti. Da una valutazione delle curve di crescita è emerso un andamento di tipo *diauxico*, ossia la presenza di due fasi di latenza e di due fasi di crescita distinte. Questo andamento fa ipotizzare che il consorzio batterico in una

prima fase si adattano alle nuove fonti di carbonio, iniziando a degradare le sostanze meno tossiche, probabilmente a partire dal polifenolo, dando luogo alla prima fase esponenziale di crescita. Successivamente, si osserva una fase di stasi, attribuibile all'adattamento da parte dei batteri ai composti più recalcitranti, fenantrene e pirene, seguita infine da una seconda fase di crescita (meno marcata), che è attribuibile alla degradazione dei microinquinanti organici. Dall'analisi statistica effettuata sui parametri biologici si rileva che, nella parte iniziale della curva di crescita, il catecolo, quando presente in alte concentrazioni (15 mg/l), aumenta la velocità di produzione di biomassa, mentre i composti policiclici, fenantrene e pirene, la riducono. Nel secondo tratto di crescita la situazione si inverte poiché risulta che sia fenantrene che pirene aumentano la produzione di biomassa in termini di velocità di crescita. Questo fatto conferma l'ipotesi già presa in considerazione, ossia l'acclimatazione da parte del consorzio batterico agli inquinanti, necessaria per produrre gli enzimi utili alla degradazione dei composti policiclici. Grazie alle analisi in cromatografia liquida (HPLC) è stato possibile avere la conferma del processo degradativo operato dalla miscela di batteri, che nell'arco di poche decine di ore (circa 35) sono riusciti a degradare una buona parte degli inquinanti (la media di tutte le prove si attesta al 55%). In particolare, il pirene ha raggiunto percentuali di rimozione del 76%, in corrispondenza della prova sperimentale dove al tempo iniziale le concentrazioni erano di 5 mg/l per il fenantrene, 5 mg/l per il pirene e 15 mg/l per il catecolo. La degradazione del fenantrene ha raggiunto valori pari all'83%, in corrispondenza della prova sperimentale dove al tempo iniziale le concentrazioni erano di 5 mg/l per il fenantrene, 5 mg/l per il pirene e 15 mg/l per il catecolo. Durante questa fase di degradazione si è generato anche un metabolita, che però non è stato identificato e necessiterebbe di ulteriori approfondimenti. Da una prima analisi di questo metabolita, considerato il tempo di ritenzione rilevato dall'analisi HPLC, che risulta più breve rispetto a quello del catecolo, e valutato inoltre lo spettro di assorbimento UV, si potrebbe ipotizzare una molecola che risulta meno tossica dei due inquinanti e paragonabile al polifenolo, ossia di facile biodegradazione per i microorganismi.

Nel quinto capitolo sono discusse le prove di crescita effettuate utilizzando la specie algale *Nannochloropsis oculata*. Tali prove sono state progettate con i criteri del *Design of Experiments* e sono state eseguite su due taglie di fotobioreattori, ovvero su scala di laboratorio (6 litri) e su scala pilota (120 litri). Le prove sono state condotte su acque marine inquinate artificialmente al fine di valutare le capacità di degradazione da parte di questa particolare microalga nei confronti di differenti fonti di azoto, sotto forma di urea e nitrati, e di fosforo, come ortofosfati. Dall'analisi statistica effettuata sui dati rilevati durante le campagne sperimentali, si è avuta la conferma oggettiva dell'influenza dell'intensità luminosa sulla crescita algale e si è potuto quantificare l'effetto di tale parametro sulla crescita delle microalghe. Si è inoltre rilevata l'interazione tra la concentrazione di nitrati e l'intensità luminosa fornita al sistema, che è risultata statisticamente significativa. Come è stato dettagliatamente illustrato dall'analisi statistica nel capitolo di pertinenza, si è riscontrato che questi due fattori influiscono sulla crescita algale e sulla degradazione degli inquinanti; grazie poi al

modello di previsione ottenuto dall'analisi statistica, note le condizioni sperimentali di partenza, si può stimare la crescita algale e/o la degradazione degli inquinanti, relativamente alle condizioni sperimentali esplorate. Si è inoltre testata l'influenza dell'aggiunta di CO₂ pura, come fonte aggiuntiva di carbonio a quella già presente nell'aria insufflata in continuo all'interno dei reattori. Dai risultati dell'analisi statistica, quantomeno per le condizioni sperimentali oggetto di questo studio, l'aggiunta di CO₂ pura non ha contribuito significativamente alla crescita algale o alla degradazione degli inquinanti. Entrando nel dettaglio dei risultati, una prima serie di esperimenti è stata condotta su concentrazioni iniziali di nitrati (come NaNO₃) pari a 60 e 120 mg/l. Dalle analisi cromatografiche si è rilevato che essi vengono degradati completamente nell'arco di 2/6 giorni, raggiungendo un *rateo* di consumo massimo pari a 30 mg/l/die, nelle condizioni sperimentali in cui la concentrazione di nitrati al tempo iniziale era pari a 120 mg/l e l'intensità luminosa era pari a 36,9 Wm⁻². L'altra fonte di azoto utilizzata è l'urea, che seppur sia stata completamente degradata dalle microalghe, ha richiesto un periodo di tempo più lungo per la completa rimozione, se comparata ai nitrati. Infatti, per concentrazioni iniziali di urea pari a 120 mg/l, la rimozione completa si è ottenuta in circa 14 - 15 giorni, raggiungendo un *rateo* di consumo massimo di circa 9 mg/l/die, nelle seguenti condizioni sperimentali: nitrati 60 mg/l, urea 120 mg/l, intensità luminosa 36,9 Wm⁻² e insufflazione di aria non integrata da CO₂. Relativamente al fosforo, aggiunto sotto forma di ortofosfati (PO₄⁻²), nel periodo dei test (circa 9 giorni) si ottiene il massimo livello di degradazione (60%) nelle seguenti condizioni sperimentali: nitrati 60 mg/l, urea 120 mg/l, intensità luminosa 36,9 Wm⁻² e insufflazione di aria non integrata da CO₂. Si precisa che per tutte le prove sperimentali condotte non è stato effettuato nessun reintegro alle soluzioni di prova (eccezion fatta per l'aria), ossia si è lavorato in modalità discontinua (*batch*). In una seconda fase si sono effettuati esperimenti su carichi di nitrati di 500 e 1000 mg/l (come NaNO₃) per testare le capacità depurative delle microalghe in condizioni di carichi elevati di azoto. Si è potuto constatare che nell'arco di 15 giorni tutto l'azoto viene completamente rimosso dalla soluzione di acqua marina inquinata. Infine, si sono condotte delle prove per valutare l'influenza dell'irraggiamento continuo di luce, o degli eventuali cicli di luce/buio che più rappresentano le condizioni naturali di crescita. Dagli esperimenti non si sono rilevate differenze statisticamente significative per le due condizioni testate e si può concludere che, se si volesse accelerare il tempo di rimozione dell'azoto da soluzioni contenenti carichi particolarmente alti di azoto (sino a 1000 mg/l come NaNO₃), la *Nannochloropsis oculata*, quantomeno per le condizioni sperimentali oggetto di studio, è in grado di lavorare con una adeguata illuminazione in continuo, permettendo di dimezzare i tempi per la degradazione degli inquinanti e rimuovendo il carico di azoto in circa due settimane.

Bibliografía

Acevedoa F., Pizzul L., del Pilar Castillo M., Cuevasd R., Diez M. C., 2011, *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus Anthracophyllum discolor*, *Journal of Hazardous Materials*, 185, 212-219.

Adami G., Barbieri P., Piselli S., Predonzani S., Reisenhofer E., 2000, *Detecting and characterizing sources of persistent organic pollutants (PAHs and PCBs) in surface sediments of an industrialized area* (harbour of Trieste, Northern Adriatic Sea). *Journal of Environmental Monitoring*, 2: 261-265.

Ahmad A. L., Mat Yasin N.H., Derek C. J. C., Lim J. K., *Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review*, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, 584-593, 2011.

Bernard O., B. Rémond, *Validation of a simple model accounting for light and temperature effect on microalgal growth*, *Bioresource Technology*, 123, 520-527, 2012.

Bettin F., Osorio da Rosa L., Montanari Q., Calloni R., Aparecida Gaio T., Malvessi E., Moura da Silveira M., Pinheiro Dillon A. J., 2011, *Growth kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from Pleurotus sajor-caju PS-2001*, *Process Biochemistry*, 46, 758-764.

Brown R.R., (1967). *Biochemical aspect of oxidative coupling of phenols. Oxidative Coupling of Phenols*, New York, Marcel Dekker, 167-201.

Bumpus, J.A., M. Tien, D. Wright, and S.D. Aust (1985) *Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus*. *Science* 224: 1434-1436.

Boonchan, S., M. L. Britz, and G. A. Stanley. 1998. *Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnol. Bioeng.* 59:482-494.

Boonchan S., Margaret L. Britz M., Stanley G., 2000, *Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures*, *Applied And Environmental Microbiology*, 1007-1019.

Campaña-Torres A., L. R. Martínez-Córdova, M. Martínez-Porchas, J. A. López-Elías, M. A. Porchas-Cornejo, *Productive response of Nannochloropsis oculata, cultured in different media and efficiency as food for the rotifer Brachionus rotundiformis*, *ΦΥTON*, 81, 45-50, 2012.

Cerniglia C.E. and Heitkamp M.A., 1989, *Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic environment*. Ed. Varanasi. Boca Roton, CRC Press, 41-68.

Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., Dodge, R.H., 1994, *Metabolism of benz[a]anthracene by the filamentous fungus Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3931-3938.

Cheng J. L., G. R. Timilsina, *Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review*, Renewable Energy, 36, 3541-3549, 2021.

Chiu Sheng-Yi, Kao Chien-Ya, Tsai Ming-ta, Ong Seow-Chin, Chen Chiun-Hsun, Lin Chih-sheng, *Lipid accumulation and CO₂ utilization of Nannochloropsis oculata in response to CO₂ aeration*, Bioresource Technology, 100, 833-838, 2009.

Clasceri L., Greenberg A., Eaton A. (1999) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. Amer Public Health Assn, p.1931.

Chávez, F.P., Lunsdorf, H., Jerez, C.A., 2004. *Growth of polychlorinated-biphenyldegrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic polyphosphate*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 3064-3072.

Chisti Y., *Biodiesel from microalgae*, Biotechnology Advances, 25, 294-306, 2007.

Cho, J., Zein, M.M., Suidan, M.T., Venosa, A.D., 2007, *Biodegradability of alkylates as a sole carbon source in the presence of ethanol or BTEX*. Chemosphere 68, 266-273.

Connell DW, Wu RSS, Richardson BJ, Leung K, Lam PSK, Connell PA, 1998, *Occurrence of persistent organic contaminants and related substances in Hong Kong marine areas: an overview*. Mar Pollut Bull, 36, 376-384.

Converti A., A.A. Casazza, E.Y. Ortiz, P. Perego, M. del Borghi, *Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production*, Chem. Eng. Process.: Process Intensif. 48 (2009) 1146-1151.

Craggs R.J., P.J. McAuley, V.J. Smith, *Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated raceway*, Water Res., 31 (1997), pp. 1701-1707.

Demirbas A., F. Demirbas, *Algae Energy, Algae as a New Source of Biodiesel*, Springer-Verlag London, 2010.

Dittmer J.K., Patel N.J., Dhawale W.S. and Dhawale S.S., 1997, *Production of multiple laccase isoforms by Phanerochaete chrysosporium grown under nutrient sufficiency*. FEMS Microbiol. Lett. 147, 65-70.

Douglas A., Holler J., Crouch S., Sabbatini L., 2009, *Chimica analitica strumentale*, Edises, seconda edizione

Dragone G., Fernandes B., António A. Vicente, José A. Teixeira, *Third generation biofuels from microalgae, Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2010.

Eaton R. W. And Chapman P. J., 1992, *Bacterial metabolism of baphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions*. J. Bacteriol. 174, 7542.

Erickson D.C., Loehr R.C., Neuhauser E.F., (1993). *PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils*. Water Research, 27, 911-919.

Fakoussa R.M., Hofrichter M., 1999, *Biotechnology and microbiology of coal degradation*. Applied Microbiology and Biotechnology, 52, 25-40.

Flynn K. J., K. Davidson, J.W. Leftley, *Carbon-nitrogen relations during batch growth of Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) under alternating light and dark*, Journal of applied phycology, 5, 465-473, 1993.

Gibson, D.T., Jerina, D.M., 1975, *Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium*. Science 189, 296-297.

Gibson D.T., Subramanian V., 1984, *Microbial degradation of aromatic hydrocarbons*, DA Wolfe, New York, 181-252.

Glenn J.K., Morgan M.A., Mayfield M.B., Kuwahara M., Gold M.H., (1983). *An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete Phanerochete chrysosporium*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 114, 1077-1083.

Grinberg S. J., et al, 1996, *Quantifying the biodegradation of phenanthrene by Pseudomonas stutzeri P16 in the presence of non ionic surfactant*. Appl. Environ. Microb. 62, 2387.

Guillard R. R. L., Ryther J. H., *Studies of marine planktonic diatoms I. Cyclotella nana (Hustedt) and Detonula confervacea (Cleve)*, Can. Journal of Microbiology, 8, 229-239, 1962.

Guillard R. R. L., *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*, W. L. Smith, M. H. Chanley (Eds.), Culture of Marine Invertebrate Animals, Plenum Press, New York, 26-60, 1975.

Guillén F., Martínez A.T., Martínez M.J., Rodríguez E., Nuero. O., 2004, *Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four pleurotus species: the role of laccase and versatile peroxidase*. Soil Biology & Biochemistry, 36:909-916.

Guschina I.A., J. L. Harwood, *Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae*, Progress in lipid Research, 45, 160-186, 2006.

Gore M. G., 2000, *Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach*, Oxford University Press; 2 edition

LiY., M.Horsman, N.Wu, C.Q. Lan, N. Dubois Calero, *Biofuels from microalgae*, Biotechnol. Progress, 24, 815-820, 2008.

Hu Q., *Environmental effects on cell composition*. In Richmond A, Editor. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Blackwell Science Ltd, 83-93, 2004.

HuQ., M. Sommerfield, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, A. Darzins, Microalgal triacylglycerols as a feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. Plant Journal, 54, 621-639, 2008.

Hadibarata Tony, Tachibana Sanro, Itoh Kazutaka, 2009, *Biodegradation of chrysene, an aromatic hydrocarbon by Polyporus sp. S133 in liquid medium*, Journal of Hazardous Materials, 164, 911-917.

Hadibarata T., Yusoff A.R.M., Aris A., Kristanti R. A., 2012, "Identification of naphthalene metabolism by white rot fungus *Armillaria* sp. F022", Journal of Environmental Science 24(4) 728-732.)

Hanson, J.R., 2008, The Chemistry of Fungi, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK

HuangG., F. Chen, D. Wei, X. Zhang, G. Chen, Biodiesel production by algal biotechnology, Applied Energy, 87, 38-46, 2010.

Janbandhu, A., Fulekar, M.H., 2011. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. J. Hazard. Mater. 187, 333-340.

Jones K.C., Stratford A., Waterhouse K., 1989, Organic contaminants in Welsh soils: Polynuclear aromatic Hydrocarbons, Environmental Science Technology, 13, 540-550.

Juhasz, A. L., M. L. Britz, and G. A. Stanley. 1996. Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*. Biotechnol. Lett. 18:577-582.

Katayama et al, 2010, Bioavailability of xenobiotics in the soil environment, Environmental Contamination Toxicology, 203, 1-83.

Keit L. H et al, 1979, Priority Pollutants, A perspective view, Environmental Science Technology 13:416

Kirrolia A., N. R. Bishnoi, R. Singh, Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 20, 642-656, 2013.

Kromkamp, J.C., Beardall, J., Sukenik, A., Kopecky, J., Masojidek, J., van Bergeijk, S., Gabai, S., Shaham, E., Yamshon, A., Short-term variations in photosynthetic parameters of

Nannochloropsis cultures grown in two types of outdoor mass cultivation systems, *Aquat. Microb. Ecol.* 56, (2–3), 309–322, 2009.

Kurt S., Buyukalaca S., 2010, Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes, *Bioresource Technology*, 101, 3164–3169.

Kuwara M., Glenn J.K., Morgan M.A., Gold M.H., 1984, Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, 169, 247–250.

Lam M.K., K.T. Lee, Potential of using organic fertilizer to cultivate *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, *Appl. Energy* 94 (2012) 303–308.

Lam M. K., K. T. Lee, Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward, *Biotechnology Advances*, 30, 673–690, 2012.

LANCIOTTI E., 1996, *Introduzione alla microbiologia*. Seconda Edizione. Bologna: Zanichelli.

Lebkowska M, Zborowska E, Karwowska E, Miaskiewicz-Peska E, Muszynski A, Tabernacka A, Naumczyk J, Jeczalik M, 2011, Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: Field scale processes in Poland. *Ecol Engineering* 37: 1895–1900

Lefebvre S., Hussenot J. and Brossard N. (1996) Water treatment of land-based fish farm effluents by outdoor culture of marine diatom. *Journal of Applied Phycology* 8, 193–200.

Levenspiel O., 1999, *Chemical Reaction Engineering*, 3rd edition, John Wiley & Sons, New York

Lenth R.V., 1989, "Quick and Easy Analysis of Unreplicated Factorials," *Technometrics*, 31, 469–473

Luthy R.G., Dzombak D.A., Peters C.A., Roy S.B., Ramaswami A., Nakles D.V., Nott B.R. (1994). Remediating tar-contaminated soils at manufactured gas plant sites. *Environmental Science Technology*, 28, A266–A276.

Martins F.F., Ferreira T.F, Azevedo D.A., Coelho M.A.Z., 2012, Evaluation of Crude Oil Degradation by *Yarrowialipolytica*, *Chemical Engineering Transactions*, 27, 223–228

Mata T.M., A.A. Martins, N.S. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications: a review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14 (2010) 217–232.

Mata-AlvarezJ., J. Dosta, M.S. Romero- Güiza, X. Fonoll, M. Peces, S. Astals, A critical review on anaerobic co-digestion achievements between 2010 and 2013, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 412-427, 2014.

Meletiadiis et al, 2001, Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media, *Journal Of Clinical Microbiology*, 478-484.

Mersch-Sundermann V., Mochayedi S., Kevekordes S. (1992). Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37. *Mutation Research*, 278:1-9.

Mishra Abha , S. Kumara, A. K.Pandeyb, 2011, Laccase production and simultaneous decolorization of synthetic dyes in unique inexpensive *medium* by new isolates of white rot fungus, *International Biodeterioration& Biodegradation*, 65, 487-493.

Mrozik, A., 2003. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish J. Environ. Studies* 12, 15–25.

Mueller, J. G., P. J. Chapman, B. O. Blattmann, and P. H. Pritchard. 1990. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1079–1086.

MulvennaP.F. &SavidgeG.(1991) The Queen's University of Belfast, Marine Biology Station, Portaferry, Co.

Morris S. C., Nicholls P. J., 1978, An evaluation of optical density to estimate fungal spore concentrations in water suspension. *Phytopathology* 68: 1240- 1242.

Moscoso F., Teijiz I., Deive F., Sanoroman M., 2012, Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale, *Bioresour Technol*, 119, 270-276.

MontgomeryD.C., Design and analysis of experiments, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2013.

Nelson R. et al.(2003) Introductory Statistics for Engineering Experimentation. USA, Elsevier Science, p.354.

OlofssonM., LamelaT., NilssonE., BergéJ.P., del PinoV., UronenP., LegrandC., Combined Effects of Nitrogen Concentration and Seasonal Changes on the Production of Lipids in *Nannochloropsis oculata*, *Marine Drugs*, 12, 1891-1910, 2014.

Pagand P, Blancheton J.P., Lemoalle J., Casellas C., The use of high rate algal ponds for the treatment of marine effluent from a recirculating fish rearing system, *Aquaculture Research*, 31 (2000), 729-736.

Pannu J.K., Singh A., Ward O.P., 2004, Vegetable oil as a contaminated remediation amendment: application of peanut oil for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Process Biochemistry*, 39, 1211-1216.

PAWLOWSKY U. & HOWELL J.A., 1973. Mixed culture biooxidation of Phenol. Determination of kinetics parameters. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XV, 889-896.

Queiroz M.I., Hornes M.O., A.G. da Silva-Manetti, E. Jacob-Lopes, Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothecum microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater, *Appl. Energy* 88 (2011) 3438– 3443.

Richards F.J., 1969, The quantitative analysis of growth, *Plant Physiology*, Vol. V, pag. 3-76.

Roch F., Alexander M., 1995, Biodegradation of hydrophobic compounds in the presence of surfactants, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, 1151-1158.

Rodarte-Morales A.I., Fejoo G. Moreira M.T., Lema, J.M., 2011, Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white rot fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 1839-1846.

Rodolfi L., G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, M. R. Tredici, Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor, *Biotechnology and Bioengineering*, 102, 1, 100-112, 2009.

Rubilar O., Tortella G., Cea M., Acevedo F., Bustamante M., Gianfreda L., Diez M. C., 2011, Bioremediation of a Chilean Andisol contaminated with pentachlorophenol (PCP) by solid substrate cultures of white-rot fungi. *Biodegradation*, 22, 31-41.

Salas C., Lobos S., Larrain J., Salas L., Cullen D., Vacuna R., 1995, Properties of laccase isoenzymes produced by the basidiomycetes *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 21, 323-333.

Samorì G., C. Samorì, F. Guerrini, R. Pistocchi, Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: part I, *Water Res.* 47 (2013) 791–801.

Sayler G. S. and Ripp S., 2000, Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 286.

Scragg A.H., A.M. Illman, A. Carden, S.W. Shales, Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular reactor, *Biomass and Bioenergy*, 23, 67-73, 2002.

Seber G.A.F. & Wild C.J.(2003) Nonlinear regression. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. Chapter 7.

Seo Jong-Su, Keum Young-Soo and Li Qing X. (2009) Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6, 278-309.

Simpson C.D., Mosi A.A., Cullen W.R., Reimer K.J., 1996, Composition and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surficial marine sediments from Kitimat Harbour, Canada. *Sci Total Environ* 181:265–278

Singh, H. (1991) Role of yeasts and fungi in wastes and wastewaters treatment. Ph.D. dissertation, Greenwich University, Hilo, HI

Soden D.M. and Dobson A.D.W., 2001, Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*, 147: 1755-1763.

Tabernacka, A., Naumczyk, J., Jeczalik, M., 2011, Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: field scale processes in Poland. *Ecol. Eng.* 37, 1895–1900. *ogy*, 13, 416-423

Tamburic B., S. Guruprasad, Dale T. Radford, M. Szabo, R. McC Lilley, A.W. D. Larkum, J. B. Franklin, D. M. Kramer, S. I. Blackburn, J. A. Raven, M. Schliep, P. J. Ralph, The effect of Diel Temperature and Light cycles on the Growth of *Nannochloropsis oculata* in a Photobioreactor Matrix, *Plos one*, 9, 1. 1-13, 2014.

Tiehm A., 1994, Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microb.* 60, 258.

Tredici M.R., M.C. Margheri, G.C. Zittelli, S. Biagiolini, E. Capolino, M. Natali, Nitrogen and phosphorus reclamation from municipal wastewater through an artificial food-chain system, *Bioresour. Technol.*, 42 (1992), pp. 247–253.

Trobajo R., C. Ibáñez, E. Clavero, Joan Salvadó, S. E. Jørgensen, Modelling response of microalgae to CO₂ addition, *Ecological Modelling*, 294, 42-50, 2014.

Valentin Thépot, Arnold Mangott, Igor Pirozzi, Rotifers enriched with a mixed algal diet promote survival, growth and development of barramundi larvae, *Latescalcarifer* (Bloch), *Aquaculture Reports*, Volume 3, May 2016, Pages 147–158.

Vandermeulen H. and Gordin H., 1990, Ammonium uptake using *Ulva* (Chlorophyta) in intensive fishpond systems: mass culture and treatment of effluent. *Journal of Applied Phycology* 2, 363-374.

Vieira Costa J. A., M. Greque de Moraes, The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae, *Bioresource Technology*, 102, 2-9, 2011.

Walter, U., M. Beyer, J. Klein, and H. J. Rehm. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. *UW1*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:671–676.

WangL., MinM., LiY., ChenP., ChenY., LiuY., WangY., RuanR., 2010, Cultivation of green Algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 16, 1174–1186.

Weissenfiels W.D., Klewer H.S., Langhoff J., 1992, Adsorption of PAHs by soil particles: influence of biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 689-696.

Wiseman A., King D.J., 1982, Microbial oxygenases and their potential application, Halstead Press, 151-178.

Xiao P., Moria T., Kameic I., Kiyotad H., Takagie K., Kondoa R., 2011, Novel metabolic pathways of organochlorine pesticides dieldrin and aldrin by the white rot fungi of the genus *Phlebia*. *Chemosphere*, 85, 218-224.

Zhuo R., Ma L., Fan F., Gong Y., Wan X., Jiang M., Zhang X., Yang Y., 2011, Decolorization of different dyes by a newly isolated white-rot fungi strain *Ganoderma* sp.En3 and cloning and functional analysis of its laccase gene. *Journal of Hazardous Materials*, 192, 855-873.

Zhong, Y., Luan, T., Lin, L., Liu, H., Tam, N.F.Y., 2011. Production of metabolites in the biodegradation of phenanthrene, fluoranthene and pyrene by the mixed culture of *Mycobacterium* sp. and *Sphingomonas* sp. *Bioresour. Technol.* 102, 2965–2972.

Contributi scientifici

Giuliano Saiu, Francesca Poggi, Stefania Tronci, Massimiliano Grosso, Antonio Lallai, Enzo Cadoni, Nicoletta Curreli. *Detection of parameters enhancing the performance of white-rot fungi for degradation of poly-aromatic hydrocarbons through design-of-experiment methodologies*, Chemical Engineering Transaction, Vol. 43, 271-276, 2015.

Giuliano Saiu, Stefania Tronci, Massimiliano Grosso, Enzo Cadoni, Nicoletta Curreli. *Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Pleurotus sajor caju*. Chemical Engineering Transaction, Vol. 49, 487-492, 2016.

Giuliano Saiu, Agata Pistis, Anuta Chindris, Massimiliano Grosso, Maura Baroli, Efisio Antonio Scano. *Study of the growth parameters of the Nannochloropsis oculata for the nitrogen and phosphorus removal from wastewater through design of experiment approach*. Chemical Engineering Transaction, Vol. 49, 553-558, 2016.

Partecipazioni a conferenze internazionali

Efisio Antonio Scano, Agata Pistis, Carla Asquer, **Giuliano Saiu**, Claudio Tugulu and Francesco Floris. *Biogas from agro-industrial residues, combustion products evaluation by means of the thermodynamic equilibrium analysis approach*. International Congress and Expo on Biofuels and Bioenergy. Agosto 2015, Valencia, Spagna.

Claudio Tugulu, Agata Pistis, Francesco Floris, **Giuliano Saiu** and Efisio Antonio Scano. *Intermediate pyrolysis of pine wood sawdust. Simulation of the char gasification process by means of the thermodynamic equilibrium approach*. International Journal of Chemical and Environmental Engineering, 5th International Renewable Energy and Environment Conference, 11-13 July 2016, Madrid, Spain.

Claudia Prasciolu, Valentina Perra, Francesco Desogus, Stefania Tronci, Nicoletta Curreli, **Giuliano Saiu**, Massimiliano Grosso. *Modelling and optimization of Poly-Aromatic-Hydrocarbons biodegradation by Bulab 5738 – CET*. (Articolo in fase di revisione al momento della stampa della Tesi).

Correlatore nelle seguenti Tesi di Laurea Specialistica:

Sviluppo di tecniche di Design of Experiment per lo studio della tolleranza e della crescita di consorzi batterici aerobici esposti a pirene e fenantrene in soluzioni acquose. Tesi di laurea di Valentina Perra, anno accademico 2014-2015, Università degli Studi di Cagliari.

Studio della tolleranza di consorzi batterici esposti a idrocarburi poliaromatici tramite tecniche di Design of Experiments. Tesi di laurea di Claudia Prasciolu, anno accademico 2014-2015, Università degli Studi di Cagliari.

Appendice 1

Grafici capitolo 3 - Funghi

Con lo scopo di dare al lettore una concreta idea delle differenze nell'adattamento del fungo dovuto al *medium* di crescita scelto e alla presenza degli inquinanti, si riportano alcune immagini delle piastre di Petri con il fungo in crescita, in relazione alla campagna sperimentale descritta nel capitolo 3. Le immagini sono relative al quindicesimo giorno dall'inoculo in condizioni controllate, dove si sono fatte variare congiuntamente le concentrazioni di: pirene, crisene, CuSO₄, lecitina, Tween80 e peptone. Le immagini mostrano una replica di tutti gli esperimenti del piano fattoriale frazionario 2⁶⁻². Come si rileva dalle immagini, non sempre il micelio cresce in maniera perfettamente regolare e per tale motivo si è scelto di non utilizzare misure di tipo lineare per la stima della popolazione microbica, come il diametro medio del micelio sviluppato. Questa motivazione ha portato ad elaborare ed adottare una procedura automatizzata per valutare l'area complessiva della coltura in fase di crescita, che tiene conto anche della crescita irregolare, come descritto nel capitolo 3.

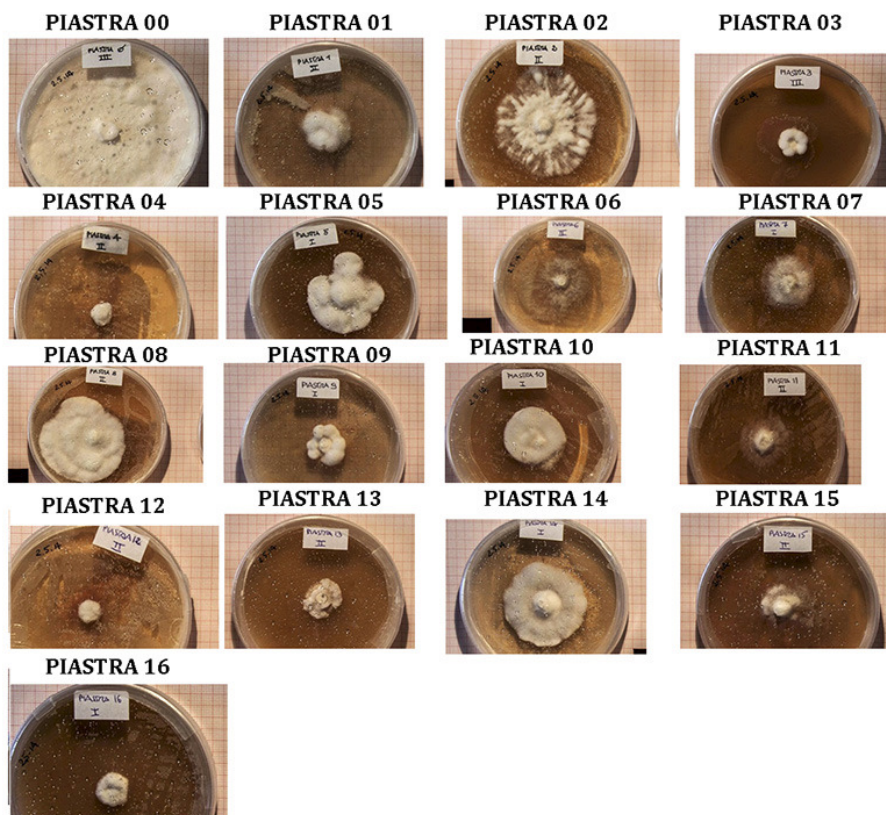


Figura A.1.1: Micelio del *Pleurotus sajor caju* in crescita dopo 15 gg dall'inoculo (Campagna sperimentale come al paragrafo 3.5) - foto G. Saiu

Di seguito sono riportate le curve di crescita relative alla campagna sperimentale su solido di cui sopra. Anche in questo caso per questioni di brevità sono riportate le curve di crescita relative ad una sola replica del piano fattoriale 2⁶⁻². Le curve da figura A.1.3 sino ad A.1.10 riportano la curva di crescita relativa alla piastra di controllo e una condizione sperimentale ('Run xx'), per avere un riscontro visivo dell'impatto dei vari fattori sulla crescita del micelio.

In figura A.1.2 è riportato l'andamento della piastra di controllo (Run 00), replicata tre volte, contenente solo gli estratti di lievito e malto. Dal grafico è visibile in maniera qualitativa la buona replicabilità degli esperimenti.

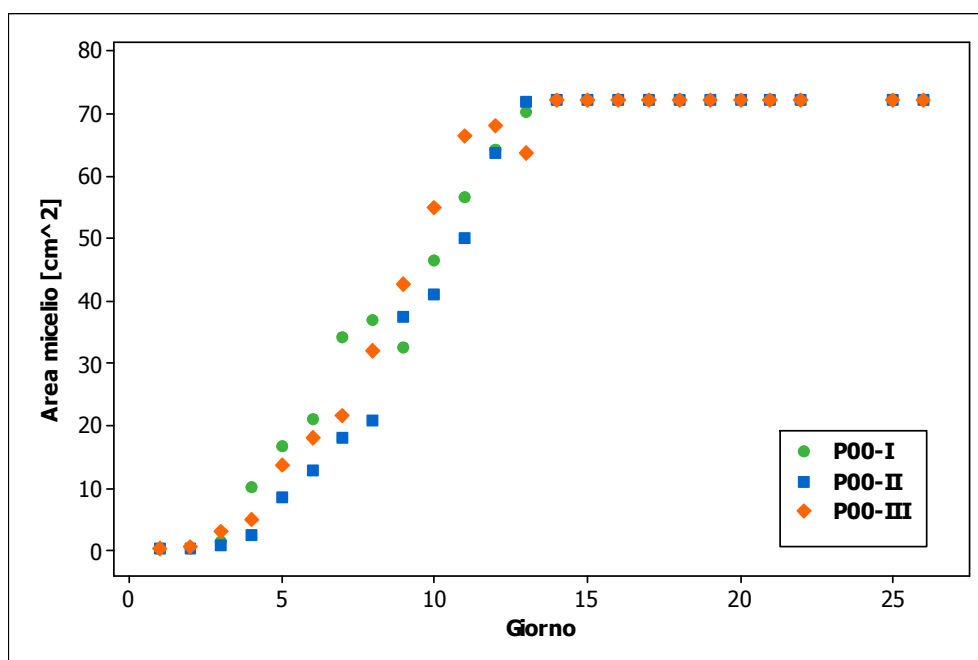


Figura A.1.2: Sviluppo del micelio fungino nelle piastre di controllo (Run 00), contenenti l'agar, l'estratto di lievito e l'estratto malto

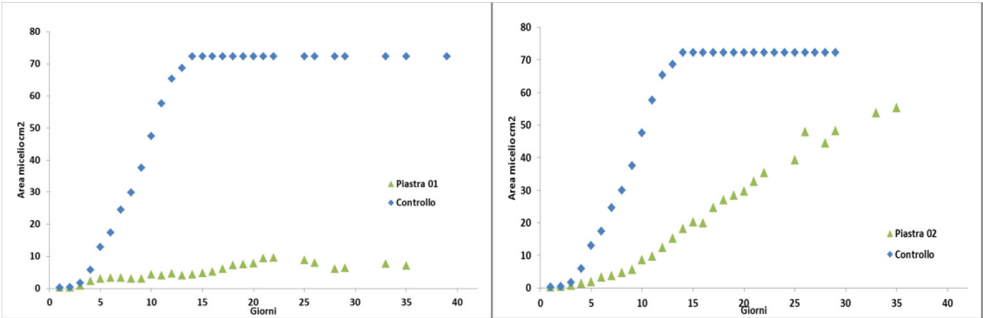


Figura A.1.3: Area (cm²) piastra di controllo Vs Piastra 01 (Sn) e Piastra 02(Dx)

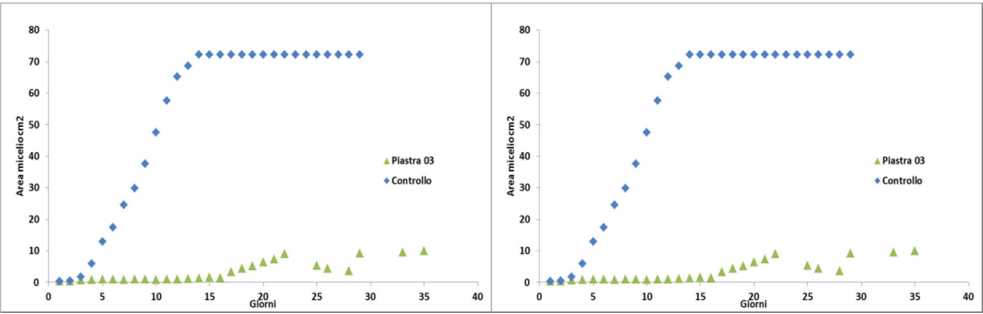


Figura A.1.4: Area (cm²) piastra di controllo Vs Piastra 03 (Sn) e Piastra 04(Dx)

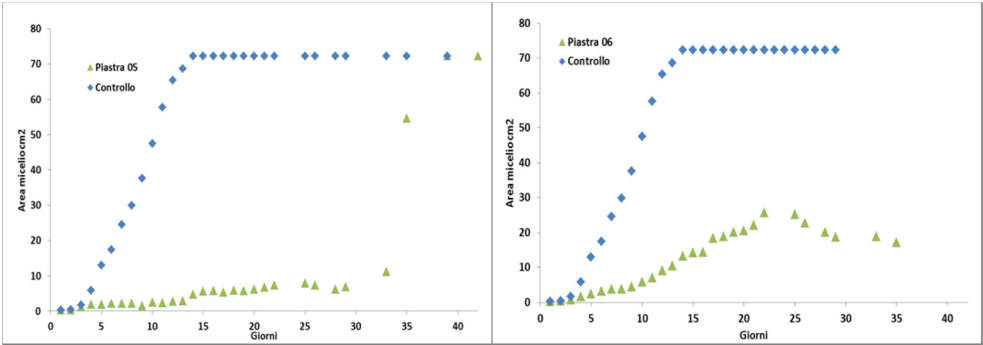


Figura A.1.5: Area (cm²) piastra di controllo Vs Piastra 05 (Sn) e Piastra 06 (Dx)

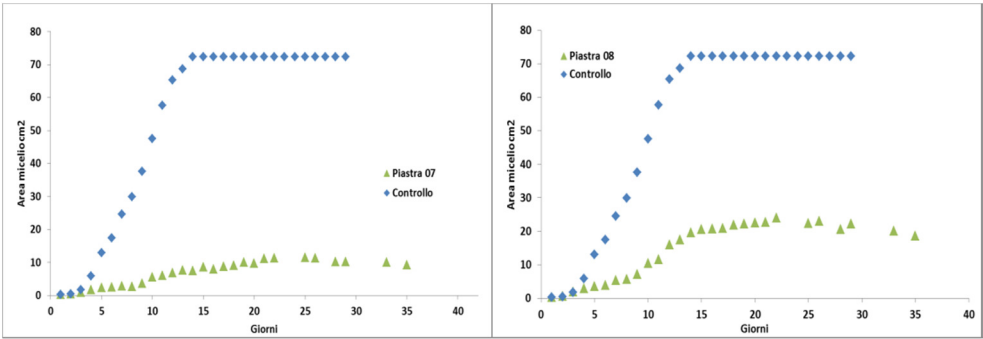


Figura A.1.6: Area (cm²) piastra di controllo Vs Piastra 07 (Sn) e Piastra 08 (Dx)

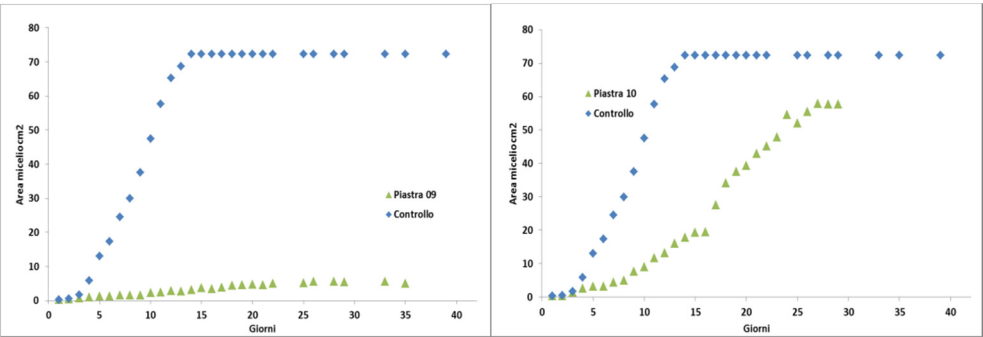


Figura A.1.7 Area (cm²) piastra di controllo Vs Piastra 09 (Sn) e Piastra 10 (Dx)

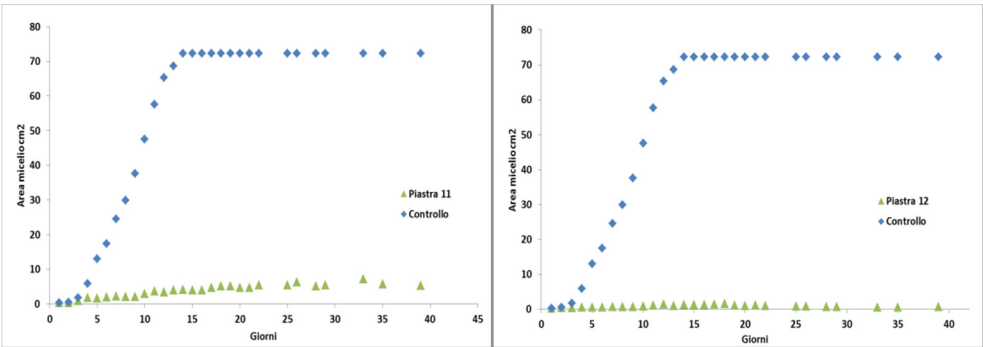


Figura A.1.8: Area (cm²) piastra di controllo Vs Piastra 11 (Sn) e Piastra 12 (Dx)

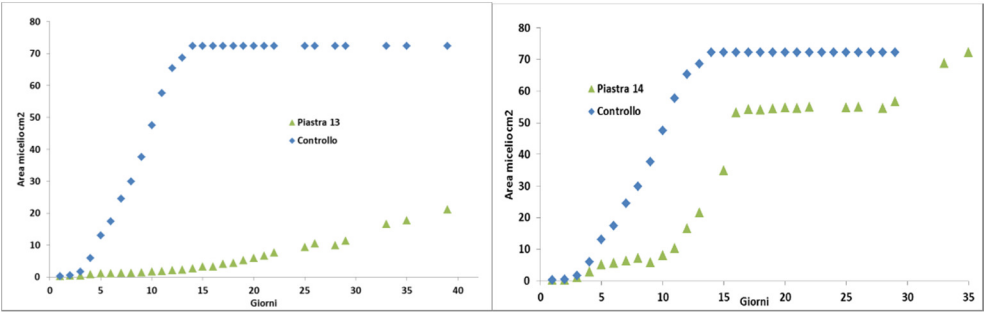


Figura A.1.9: Area (cm²) piastra di controllo Vs Piastra 13 (Sn) e Piastra 14(Dx)

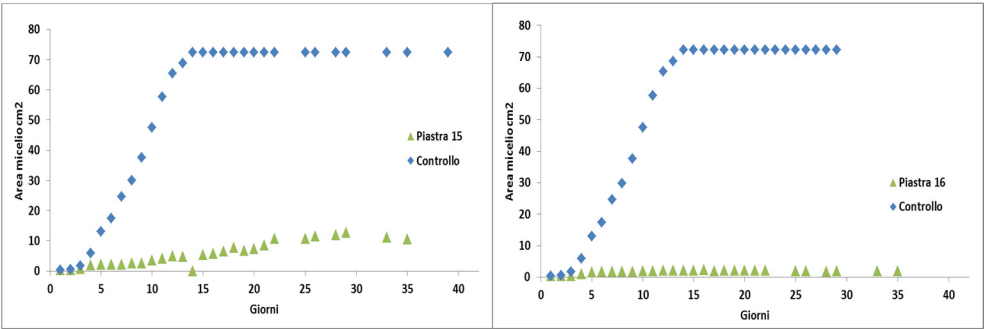


Figura A.1.10: Area (cm²) piastra di controllo Vs Piastra 15 (Sn) e Piastra 16(Dx)

Da figura A.1.11 a figura A.1.19 si riportano le regressioni non lineari effettuate con il software Matlab® (algoritmo di *Levenberg-Marquardt*) utilizzando l'equazione sigmoideale di Gompertz, relativa alle curve di crescita riportate in precedenza. Nelle figure sono riportati i punti sperimentali (area micelio rilevata nel tempo), curva di regressione e intervalli di confidenza della previsione del modello. Anche in questo caso, per questioni di brevità sono riportate le curve relative ad una sola replica del piano fattoriale 2^{6-2} , che qualitativamente hanno lo stesso andamento per le tre repliche di ogni singola prova sperimentale (*run*). I grafici riportano in ascissa i valori delle aree rilevate in centimetri e la condizione sperimentale.

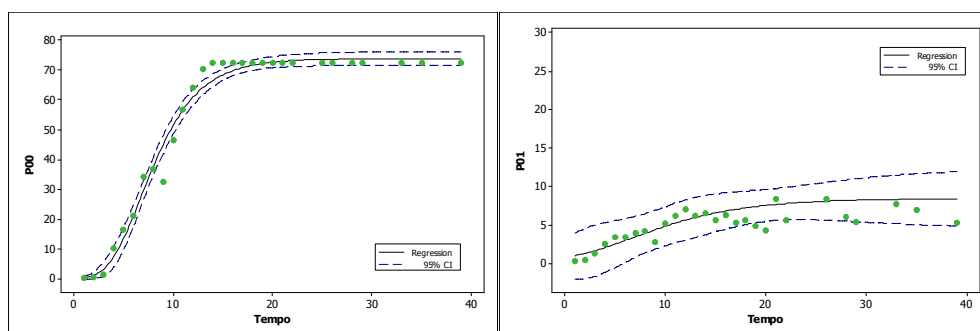


Figura A.1.11: Regressione non lineare con intervalli di confidenza per piastra P00 (Sn) e P01 (Dx)

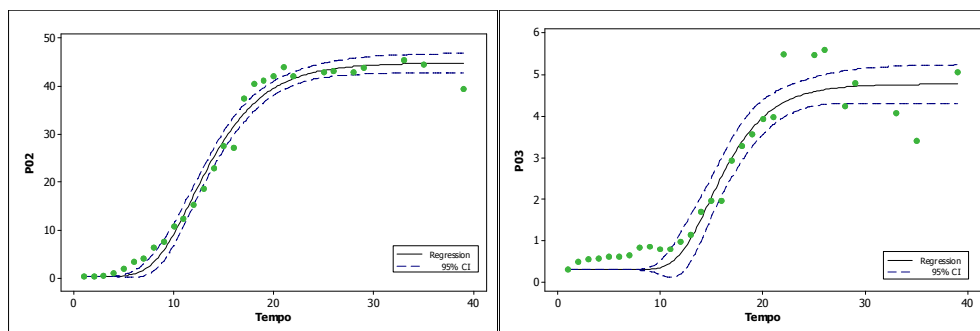


Figura A.1.12: Regressione non lineare con intervalli di confidenza per Piastra P02 (Sn) e P03 (Dx)

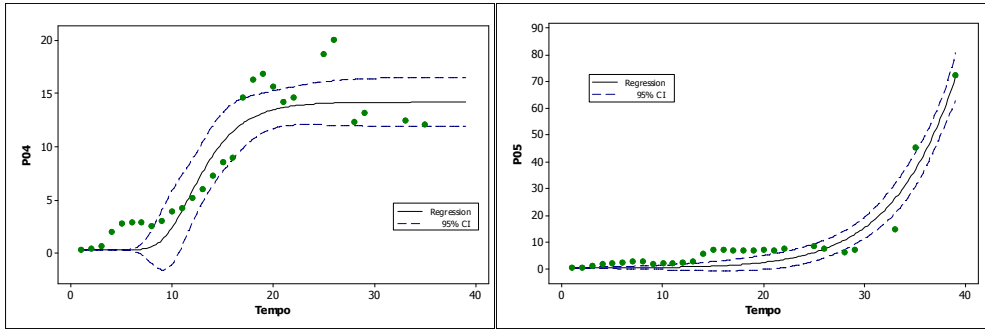


Figura A.1.13: Regressione non lineare con intervalli di confidenza per Piastra P04 (Sn) e P05 (Dx)

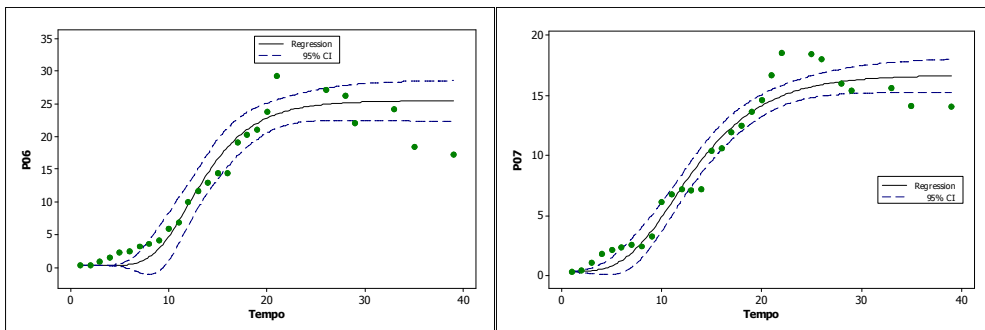


Figura A.1.14: Regressione non lineare con intervalli di confidenza per Piastra P06 (Sn) e P07 (Dx)

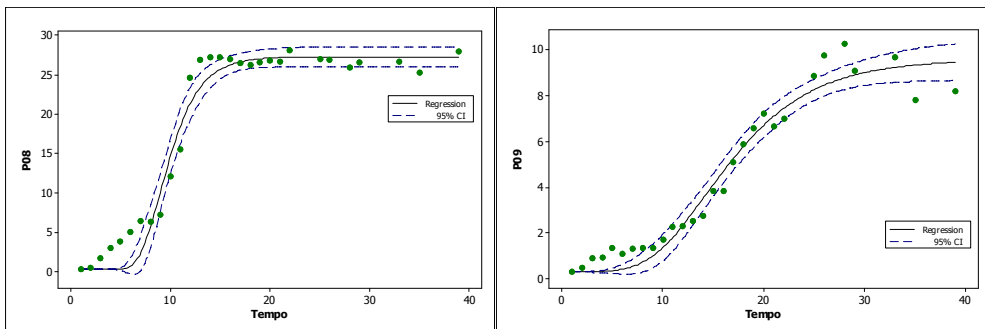


Figura A.1.15: Regressione non lineare con intervalli di confidenza per Piastra P08 (Sn) e P09 (Dx)

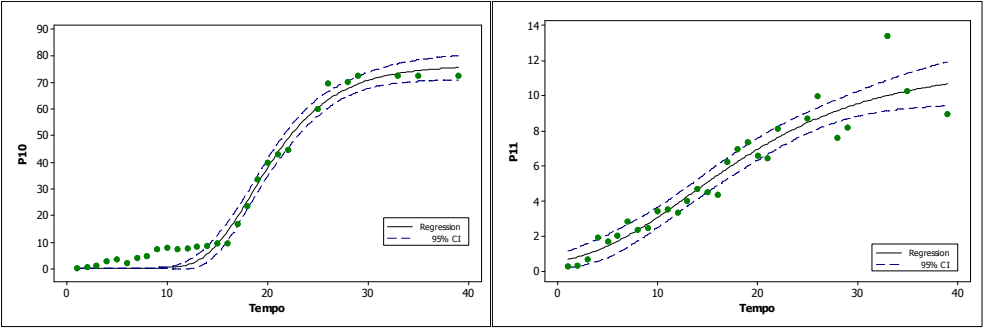


Figura A.1.16: Regressione non lineare con intervalli di confidenza per Piastra P10 (Sn) e P11 (Dx)

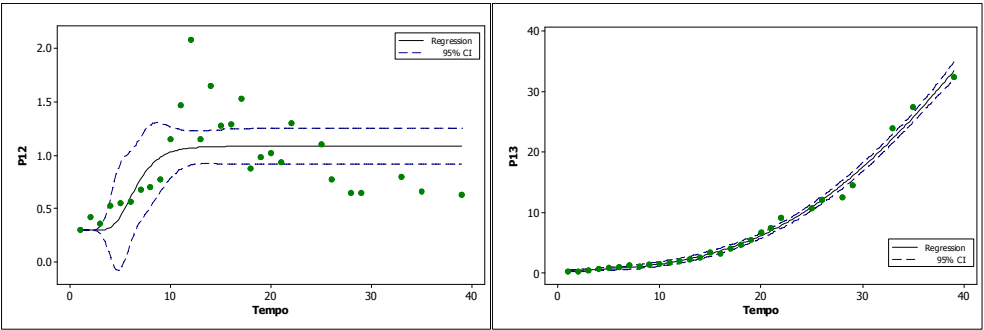


Figura A.1.17: Regressione non lineare con intervalli di confidenza per Piastra P12 (Sn) e P13 (Dx)

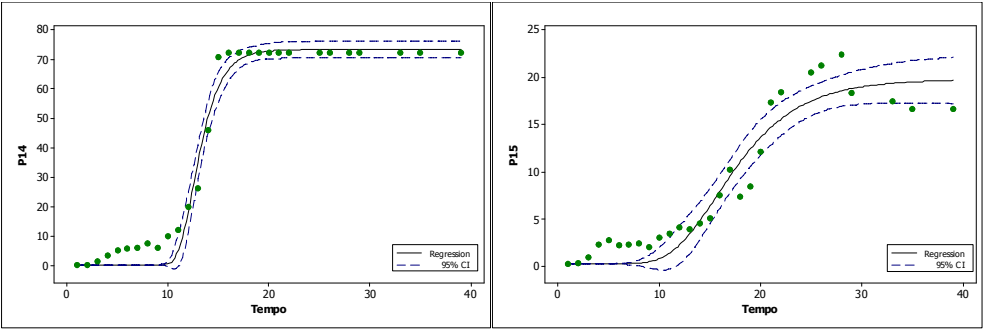


Figura A.1.18: Regressione non lineare con intervalli di confidenza per Piastra P14 (Sn) e P15 (Dx)

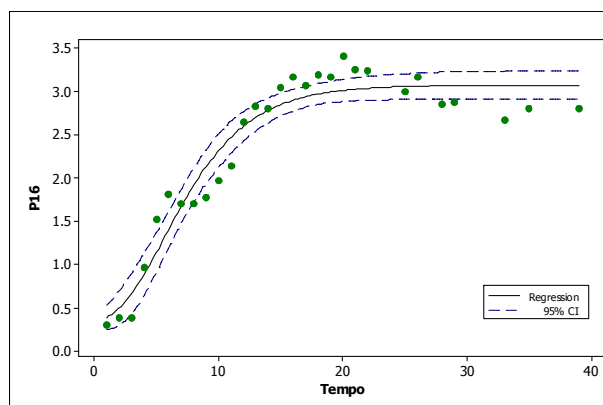


Figura A.1.19: Regressione non lineare con intervalli di confidenza per Piastra P16

Appendice 2

Grafici capitolo 4 – Consorzi batterici

In questa appendice vengono riportate tutte le curve di crescita relative alla campagna sperimentale di cui al capitolo 4, paragrafo 3, con catecolo, fenantrene e pirene. Le curve in figura A.2.1 riepilogano una replica completa dell'esperimento, mentre ogni grafico dalla figura A.2.2 a A.2.5 riporta le repliche per ogni prova sperimentale (definita 'run') nello stesso diagramma, per poter confrontare visivamente le curve di crescita e vederne la buona replicabilità. Seguiranno le figure dalla A.2.6 alla A.2.9 dove si riportano le regressioni non lineari effettuate con il software Matlab® per mezzo dell'algoritmo di *Levenberg-Marquardt* e utilizzando l'equazione sigmoidale di Gompertz, delle relative curve di crescita. Nelle figure sono riportati i punti sperimentali (assorbanza rilevata nel tempo) relativi alla prima parte esponenziale della curva di crescita (usata per il calcolo di μ_1), curva di regressione e gli intervalli di confidenza della previsione del modello. Per questioni di brevità, anche in questo caso sono riportate le elaborazioni di una sola replica del piano fattoriale 2³. I dati mancanti tra le 12 e le 22 ore sono i punti relativi alle ore notturne, dove non si è potuto rilevare l'assorbanza delle sospensioni microbiche.

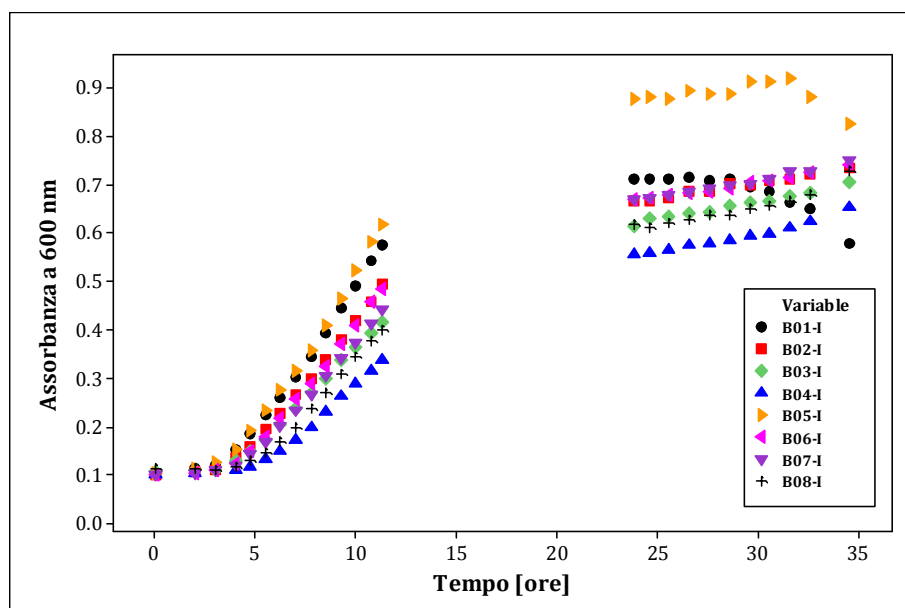


Figura A.2.1: Curve di crescita per una replica del piano fattoriale 2³

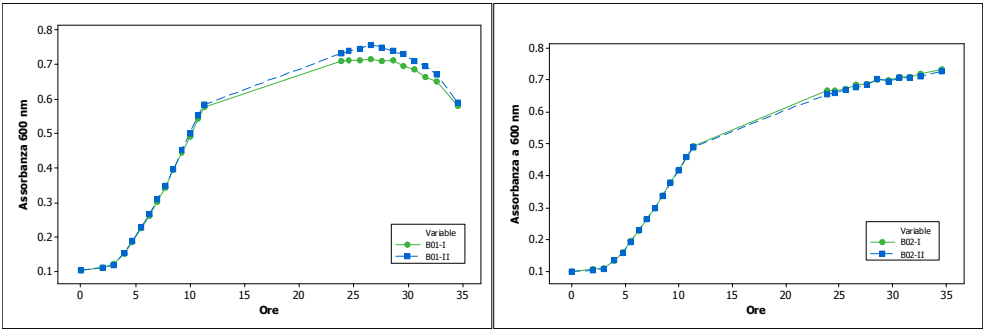


Figura A.2.2: Curve di crescita replicate per Run 01 (Sn) e Run 02 (Dx)

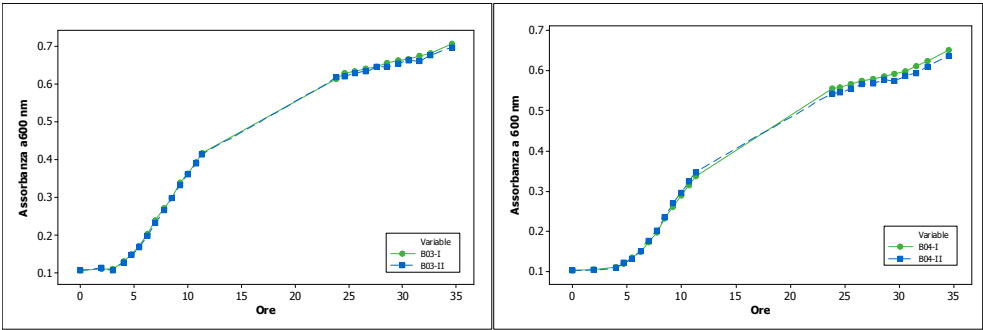


Figura A.2.3: Curve di crescita replicate per Run 03 (Sn) e Run 04 (Dx)

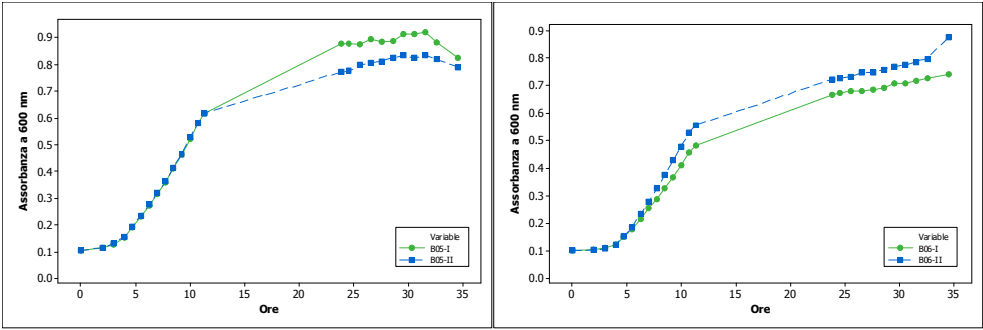


Figura A.2.4: Curve di crescita replicate per Run 05 (Sn) e Run 06 (Dx)

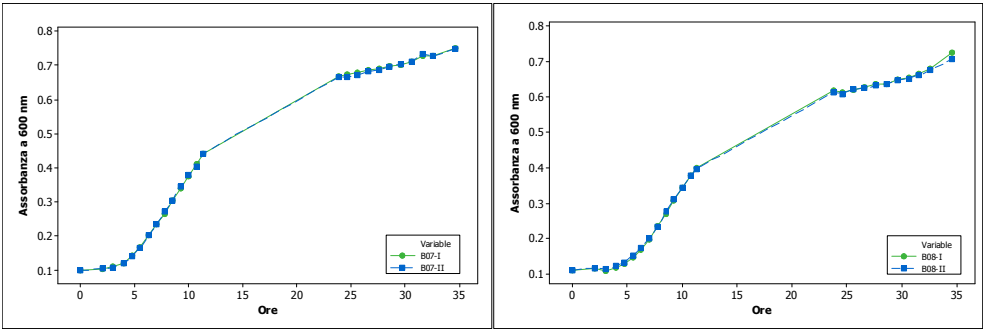


Figura A.2.5: Curve di crescita replicate per Run 07 (Sn) e Run 08 (Dx)

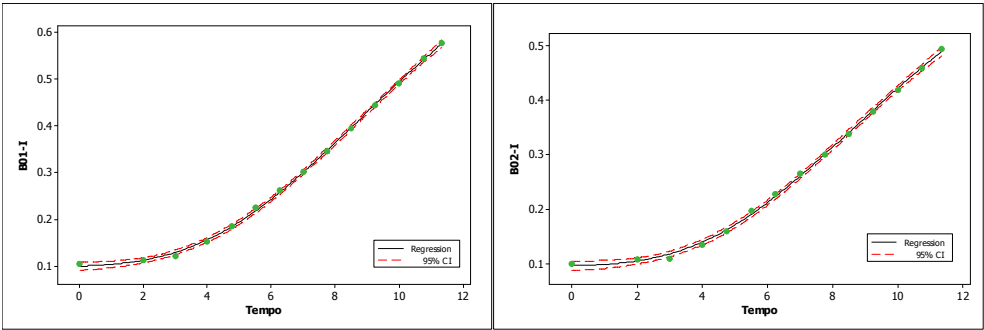


Figura A.2.6: Primo tratto esponenziale e curva di regressione per Run 01-I (Sn) e Run 02-I (Dx)

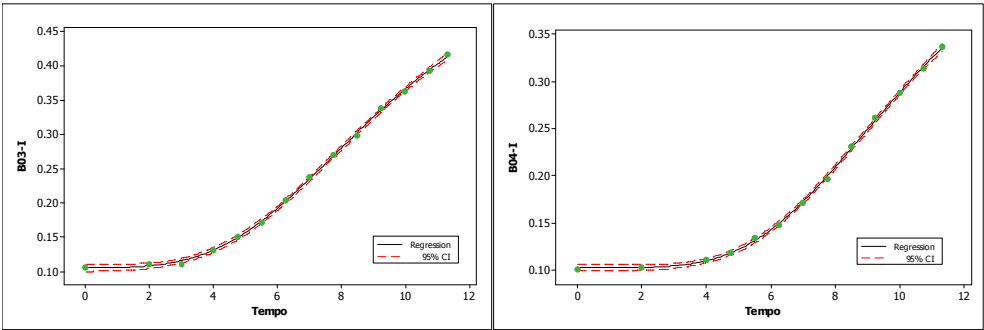


Figura A.2.7: primo tratto esponenziale e curva di regressione per Run 03-I (Sn) e Run 04-I (Dx)

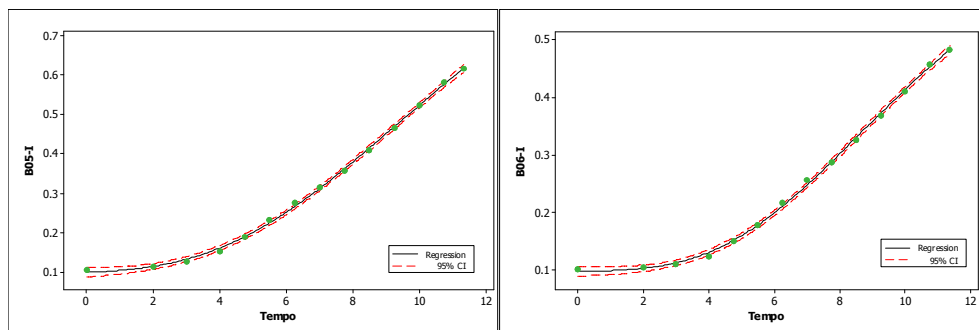


Figura A.2.8: primo tratto esponenziale e curva di regressione per Run 05-I (Sn) e Run 06-I (Dx)

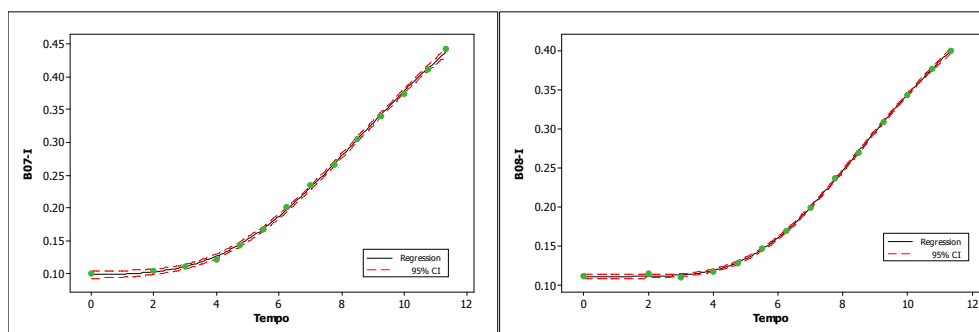


Figura A.2.9: primo tratto esponenziale e curva di regressione per Run 07-I (Sn) e Run 08-I (Dx)

Appendice 3

Grafici capitolo 5 – Microalghe

Nella prima parte dell'appendice 3 vengono riportate tutte le curve di crescita relative alla campagna sperimentale di cui al capitolo 5, paragrafo 4, relative al piano fattoriale 2^{4+1} , dove sono stati fatti variare congiuntamente i fattori luce, nitrati, urea e CO_2 utilizzando la *Nannochloropsis oculata*. Nelle figure A.3.1 e A.3.2 vengono riportate le curve di crescita in termini di assorbanza per tutte le prove sperimentali, relativamente ai reattori da 6 litri (scala laboratorio) e da 120 litri (scala pilota). Nelle figure da A.3.3 a A.3.10 vengono riportate le curve di crescita relative ai fotobioreattori da 6 litri, in termini sia di densità ottica, sia di peso secco (mg/l di biomassa). Nei grafici si riportano inoltre le regressioni non lineari effettuate con il software Matlab® per mezzo dell'algoritmo di *Levenberg-Marquardt*. Nelle figure sono riportati i punti sperimentali, le curva di regressione e gli intervalli di confidenza della previsione del modello. Si vuole far notare come l'errore sperimentale del metodo gravimetrico (peso secco) faccia crescere gli intervalli di confidenza delle curve di regressione, se confrontati con le misure di assorbanza ottenute per via spettrofotometrica. I dati raccolti da queste misurazioni di crescita, sono stati analizzati con i metodi statistici descritti nel capitolo 5. Per completezza nelle figure da A.3.11 a A.3.18, si ripetono gli stessi grafici per i fotobioreattori da 120 litri, riportanti le medesime informazioni.

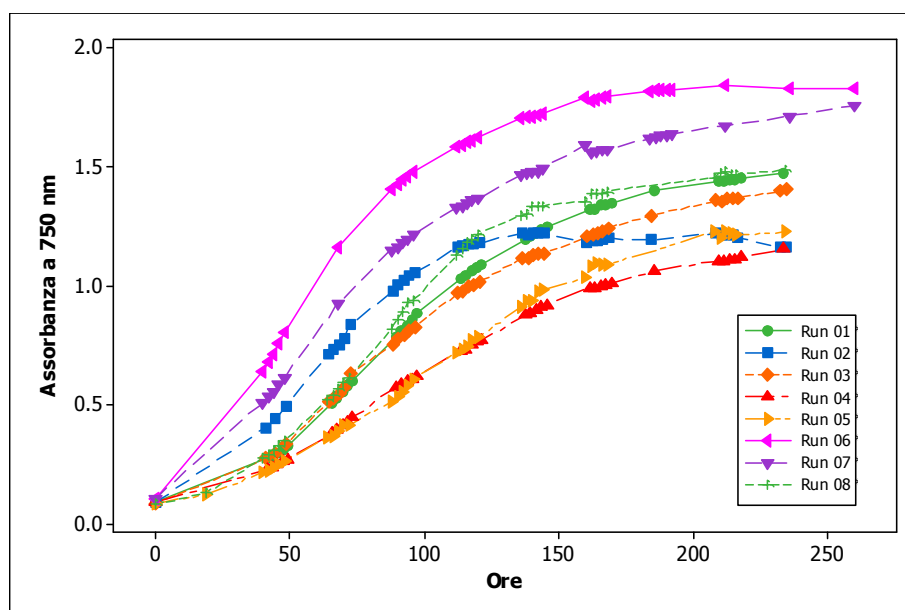


Figura A.3.1: Curve di crescita in termini di assorbanza per le prove condotte nei reattori da 6 l

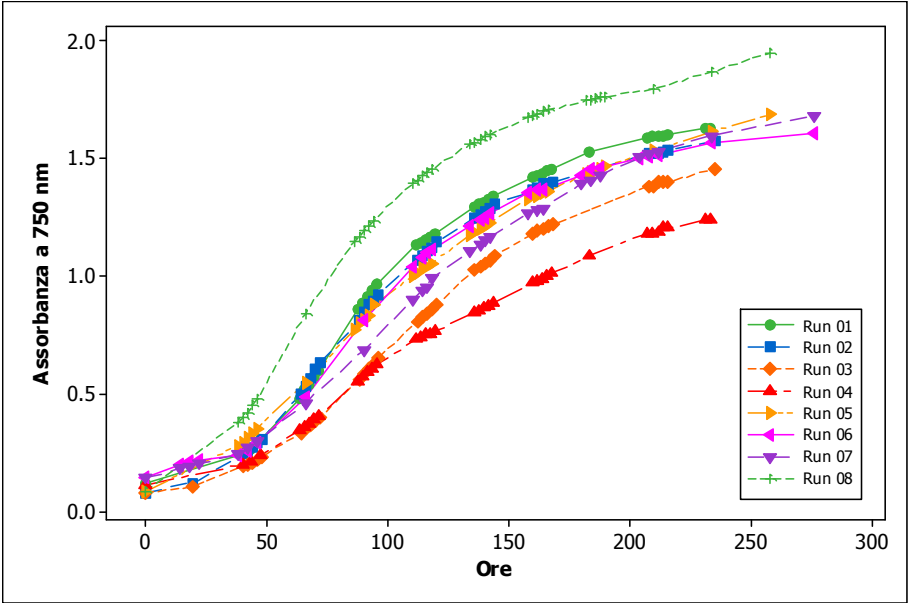


Figura A.3.2: Curve di crescita in termini di assorbanza per le prove condotte nei reattori da 120 l

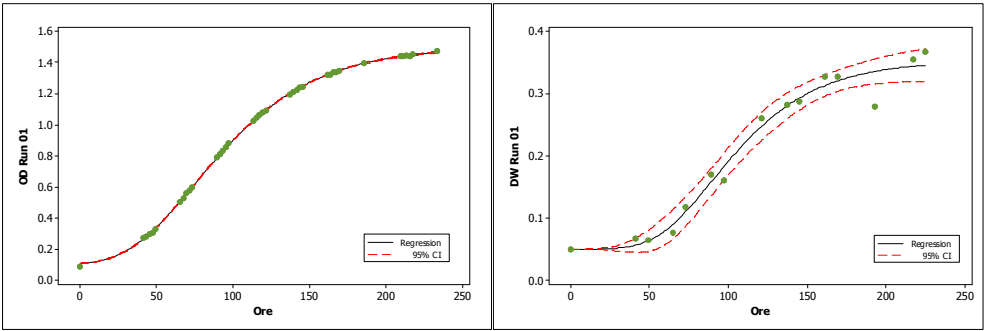


Figura A.3.3: Dati di Densità Ottica (S_n) e Peso Secco(D_x) per Run 01

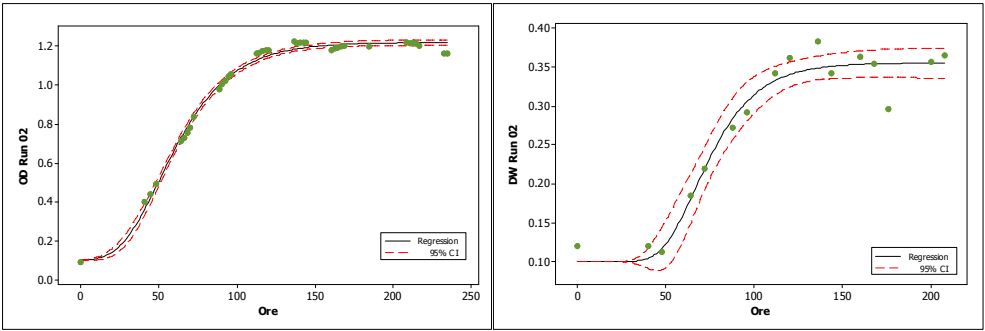


Figura A.3.4: Dati di Densità Ottica (S_n) e Peso Secco(D_x) per Run 02

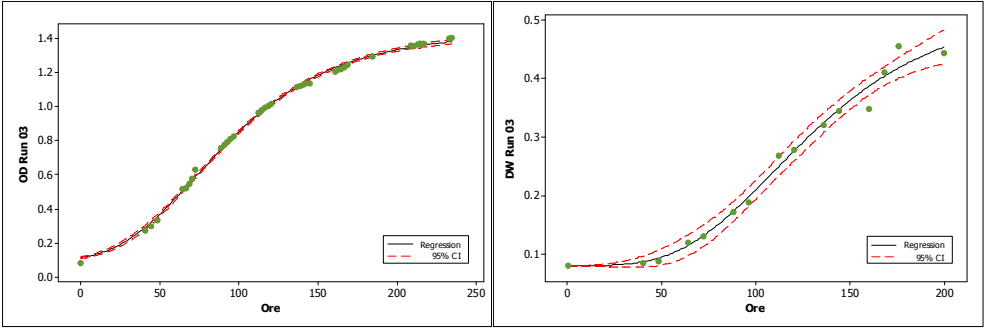


Figura A.3.5: Dati di Densità Ottica (Sn) e Peso Secco(Dx) per Run03

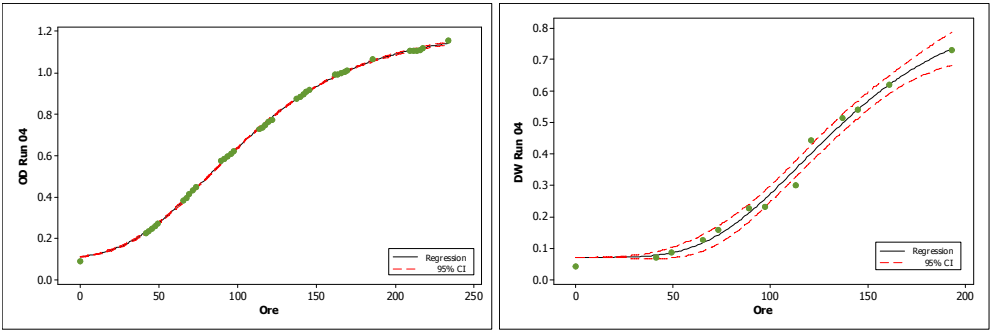


Figura A.3.6: Dati di Densità Ottica (Sn) e Peso Secco(Dx) per Run 04

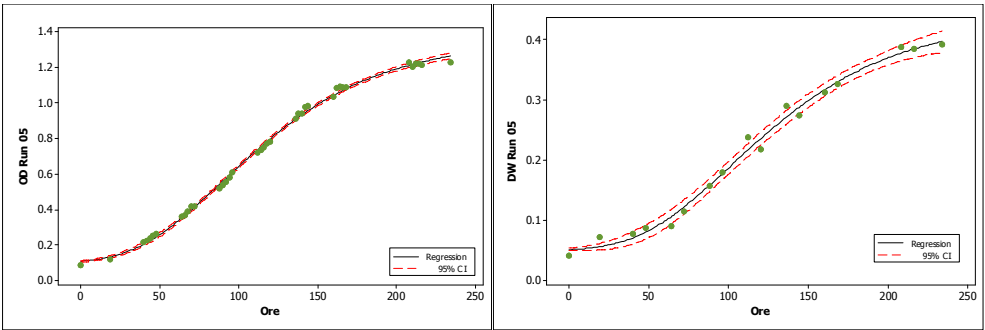


Figura A.3.7: Dati di Densità Ottica (Sn) e Peso Secco(Dx) per Run05

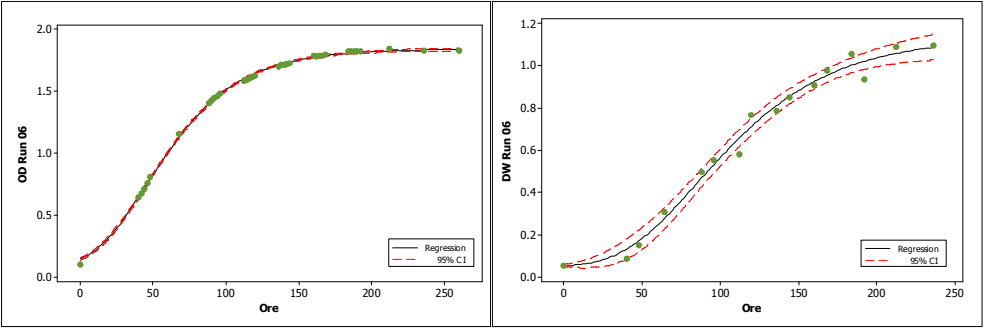


Figura A.3.8: Dati di Densità Ottica (S_n) e Peso Secco(D_x) per Run 06

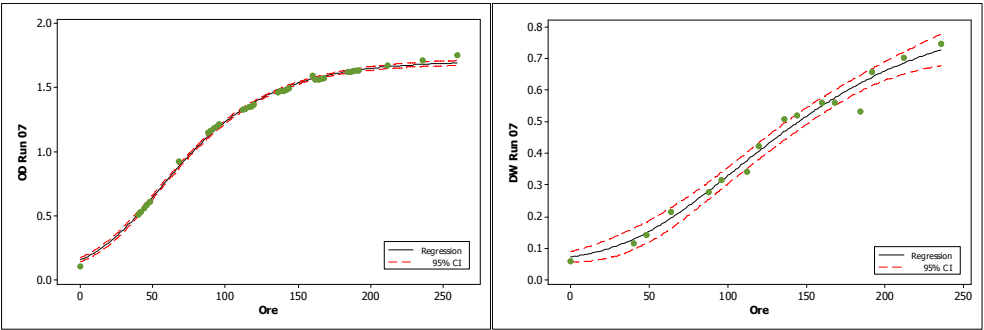


Figura A.3.9: Dati di Densità Ottica (S_n) e Peso Secco(D_x) per Run 07

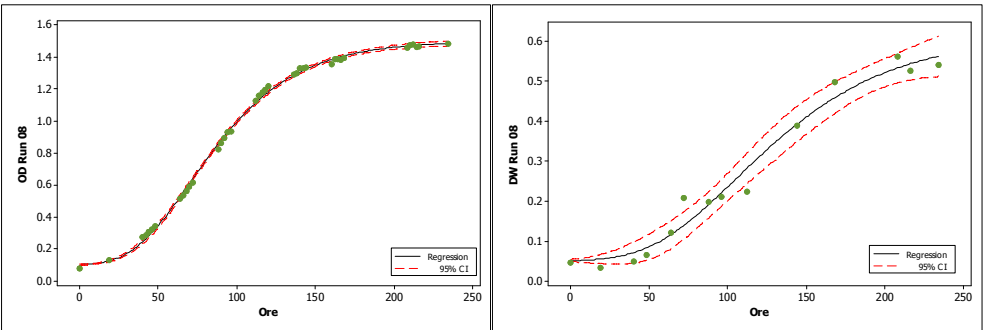


Figura A.3.10: Dati di Densità Ottica (S_n) e Peso Secco(D_x) per Run 08

Fotobioreattori da 120 l:

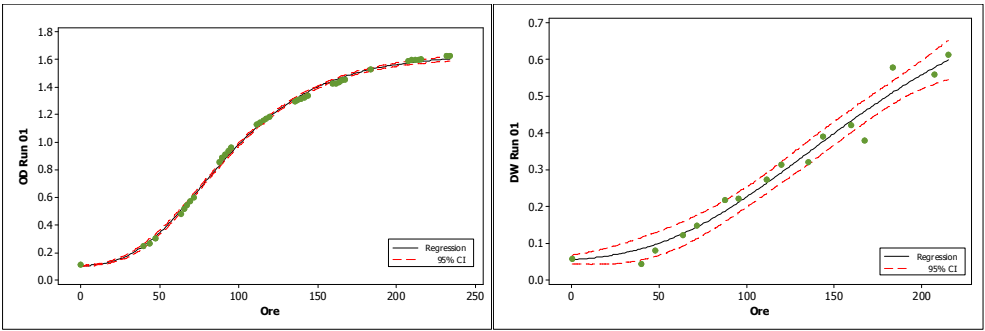


Figura A.3.11: Dati di Densità Ottica (Sn) e Peso Secco(Dx) per Run 01

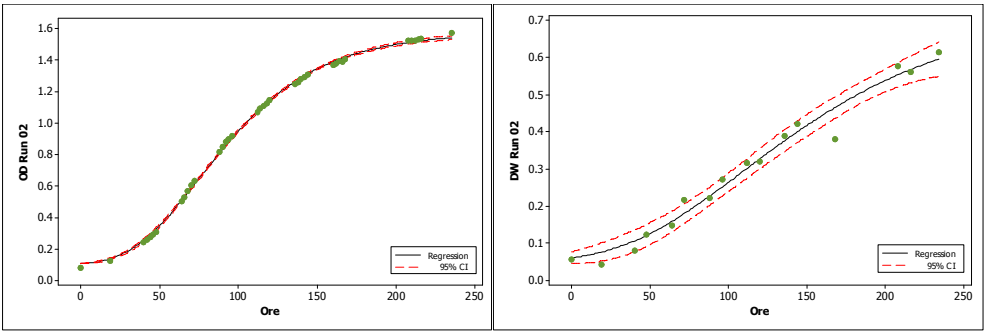


Figura A.3.12: Dati di Densità Ottica (Sn) e Peso Secco(Dx) per Run

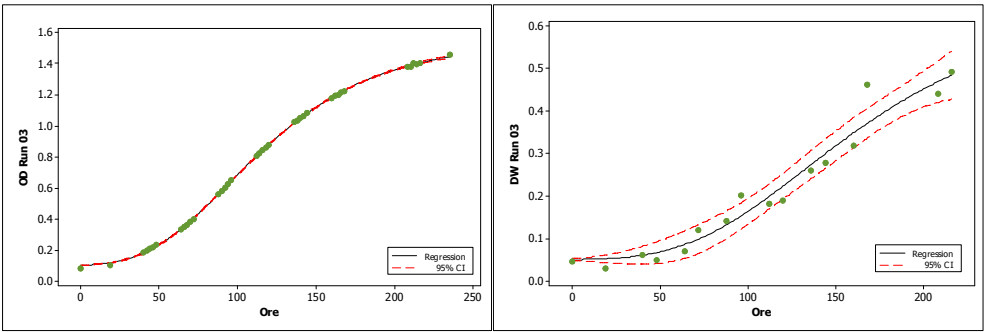


Figura A.3.13: Dati di Densità Ottica (Sn) e Peso Secco(Dx) per Run

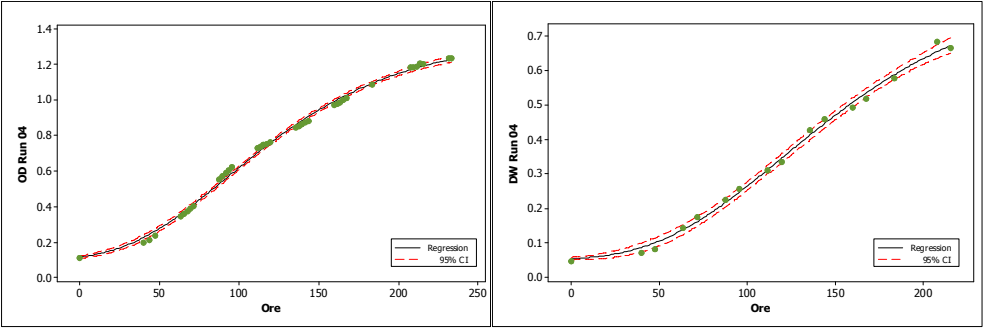


Figura A.3.14: Dati di Densità Ottica (Sn) e Peso Secco(Dx) per Run

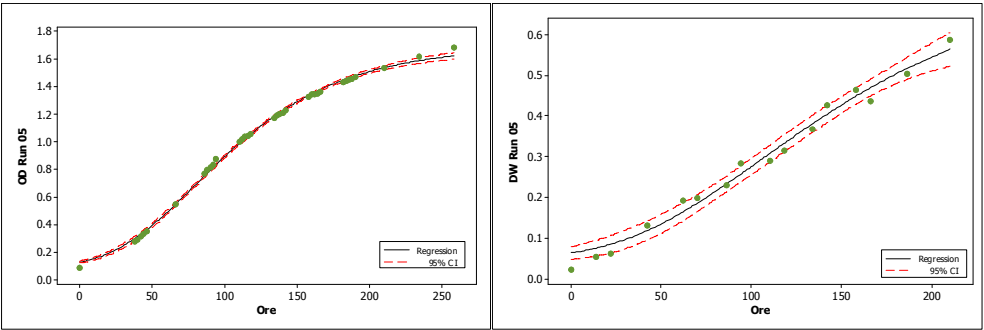


Figura A.3.15: Dati di Densità Ottica (Sn) e Peso Secco(Dx) per Run

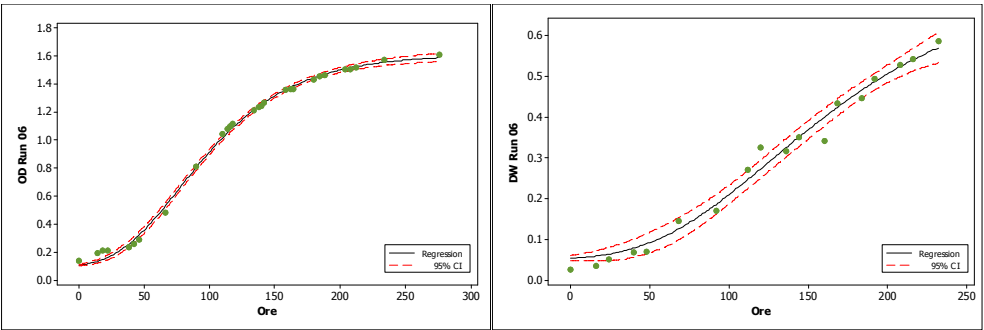


Figura A.3.16: Dati di Densità Ottica (Sn) e Peso Secco(Dx) per Run

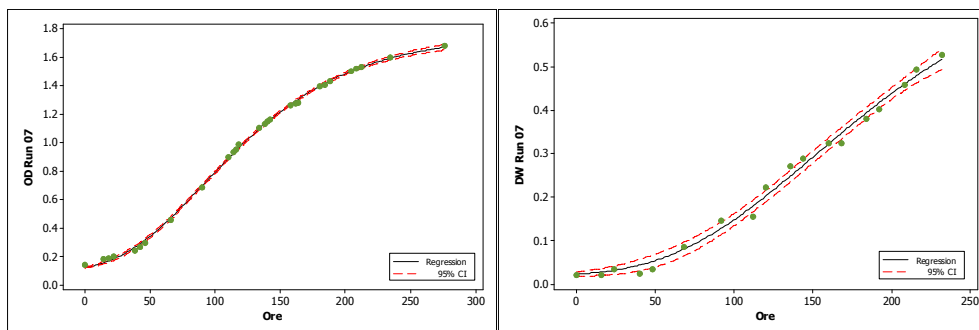


Figura A.3.17: Dati di Densità Ottica (Sn) e Peso Secco(Dx) per Run

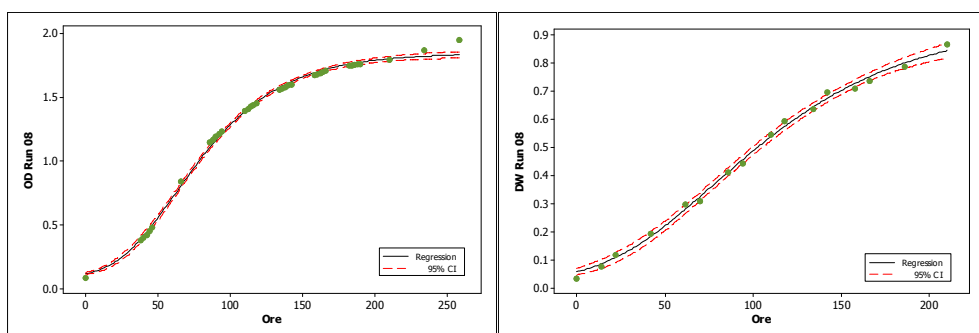


Figura A.3.18: Dati di Densità Ottica (Sn) e Peso Secco(Dx) per Run

Nelle figure A.3.19 sino alla figura A.3.22, vengono riportate le curve di crescita del piano fattoriale 2^2 descritto al capitolo 5, paragrafo 5.6. Le curve riportano i punti sperimentali, in termini di assorbanza rilevata nel tempo, le curve di regressione e gli intervalli di confidenza della previsione del modello. Anche in questo caso si può notare come le curve di regressione si adattino bene ai punti sperimentali. Il dettaglio dell'analisi statistica è riportato nel capitolo di pertinenza.

Infine nelle figura A.3.23 e A.3.24 si riportano i risultati delle analisi condotte su Nitrati e fosforo per gli esperimenti della campagna sperimentale 2^{4-1} condotta con i fotobioreattori di scala pilota (120 litri).

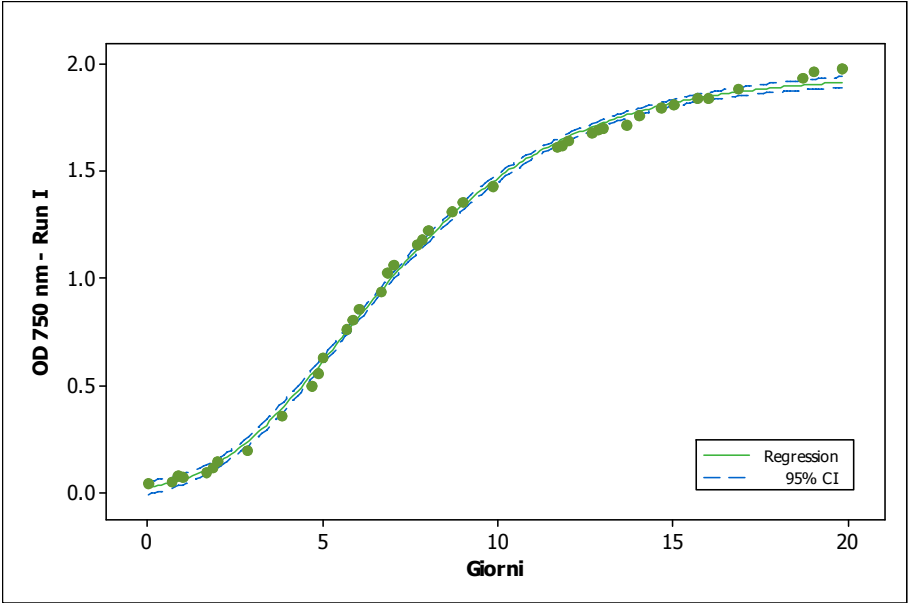


Figura A.3.19: Dati di Densità

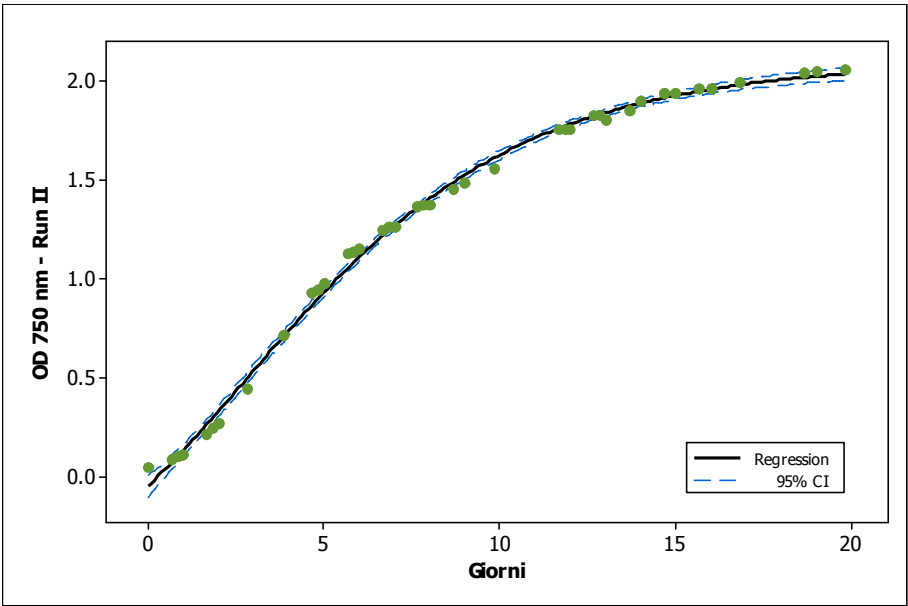


Figura A.3.20: Dati di Densità

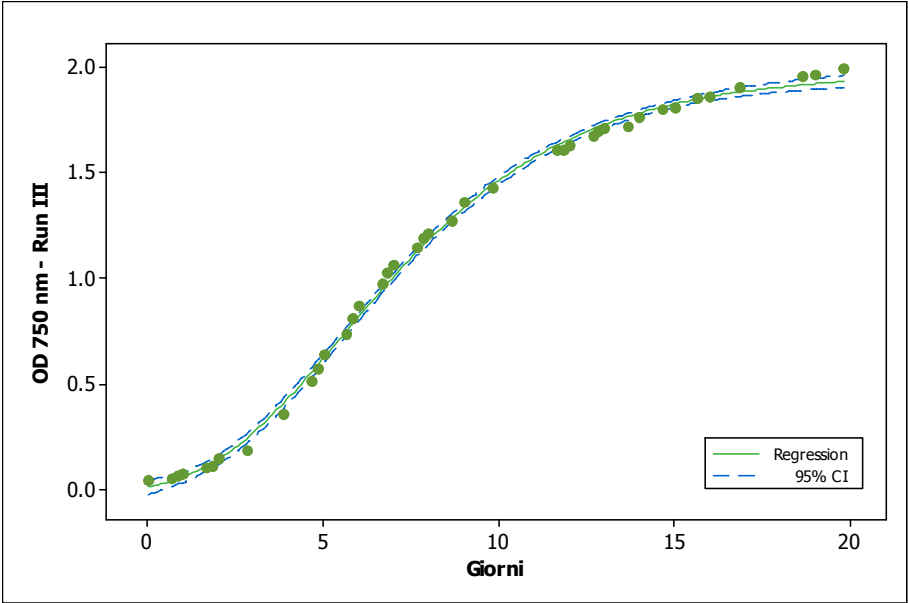


Figura A.3.21: Dati di Densità

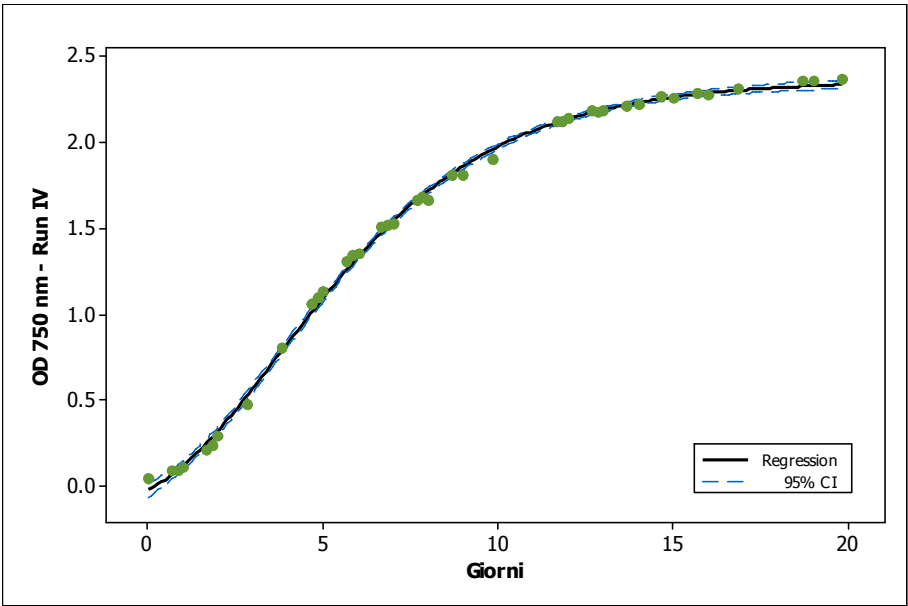


Figura A.3.22: Dati di Densità

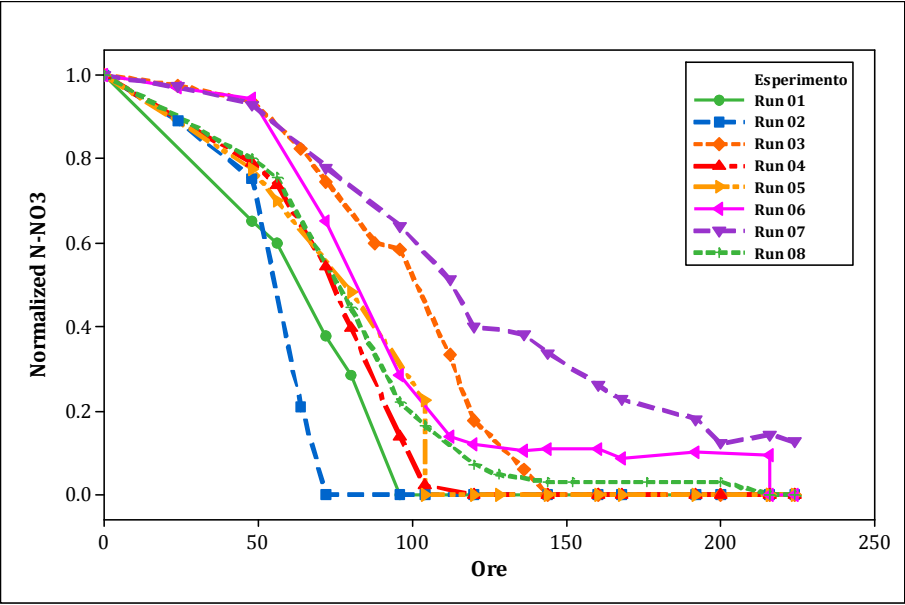


Figura A.3.23: Analisi consumo di azoto ($N-NO_3$) reattori 120 litri campagna sperimentale 2⁴⁻¹

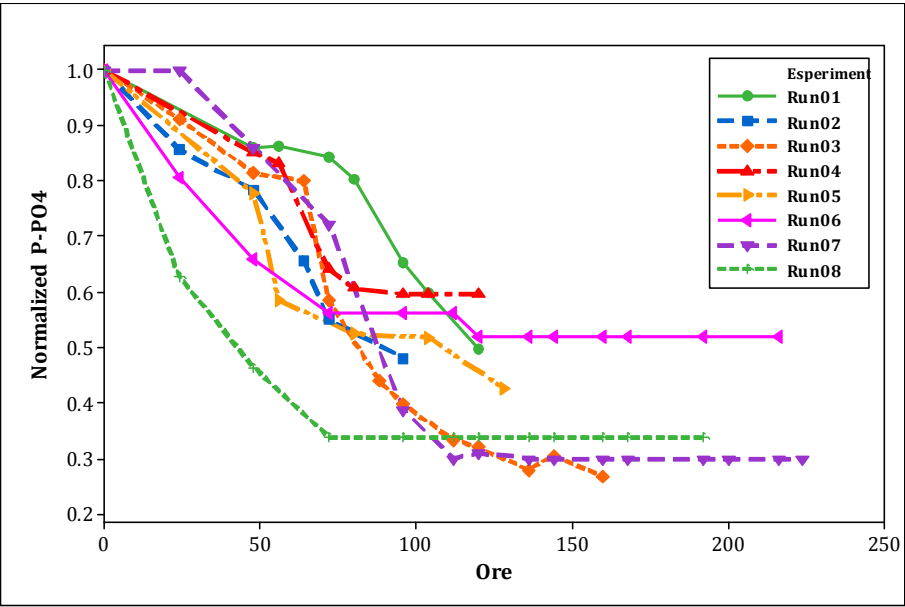


Figura A.3.24: Analisi consumo di fosforo ($P-PO_4$) reattori 120 litri campagna sperimentale 2⁴⁻¹

Ringraziamenti

Innanzitutto un particolare ringraziamento al mio supervisore, il Prof. Massimiliano Grosso, con cui ho condiviso questi tre anni di Dottorato. Lo ringrazio sinceramente per la sua pazienza e per la sua guida nel corso di questo non semplice percorso.

Un grazie al Dottore di Ricerca Efisio Antonio Scano che ha permesso una svolta importante alla mia tesi di Dottorato e per il suo costante sostegno.

Un ringraziamento particolare l'Ing. Stefania Tronci, per le varie collaborazioni, il suo supporto e per il tempo che mi ha dedicato in questi anni.

Grazie al Prof. Lallai, al Prof. Carta, al Prof. Cadoni, all'Ing. Desogus e alla Dott.ssa Curreli per avermi messo a completa disposizione i loro laboratori e le apparecchiature per le analisi.

Uno speciale ringraziamento alla mia famiglia che è sempre presente e di sostegno in tutti i percorsi che intraprendo.

Desidero ringraziare tutte le persone che hanno condiviso con me questa attività di ricerca. In particolare Agata Pistis, Anuta Chindris, Francesca Poggi, Valentina Perra, Claudia Prasciolu e Claudio Tugulu.

Un sincero ringraziamento anche a tutti i colleghi dei vari laboratori che ho frequentato e in particolare a i colleghi del corso di Dottorato in Ingegneria Industriale, con cui ho condiviso piacevolissimi momenti.

Un ringraziamento a Sardegna Ricerche, presso cui ho potuto eseguire parte della mia attività sperimentale e al centro IMC per l'ospitalità durante le campagne sperimentali sulle microalghe.

Infine, ma non per importanza, un ringraziamento all'ARPAS che mi ha permesso di seguire il corso di Dottorato.

