



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

---

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE**  
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali

**Tesi di Laurea Magistrale in  
Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali**

SVILUPPO DI UN SISTEMA A  
FLUSSO CONTINUO PER LA CRESCITA  
DI MICROALGHE IN UNA MATRICE DI  
MICROFOTOBIOREATTORI

*Relatore:* **Prof. Fabrizio Bezzo**

*Correlatrice:* **Dr. Elisa Cimetta**

*Laureando:* **Nicola Baseotto**

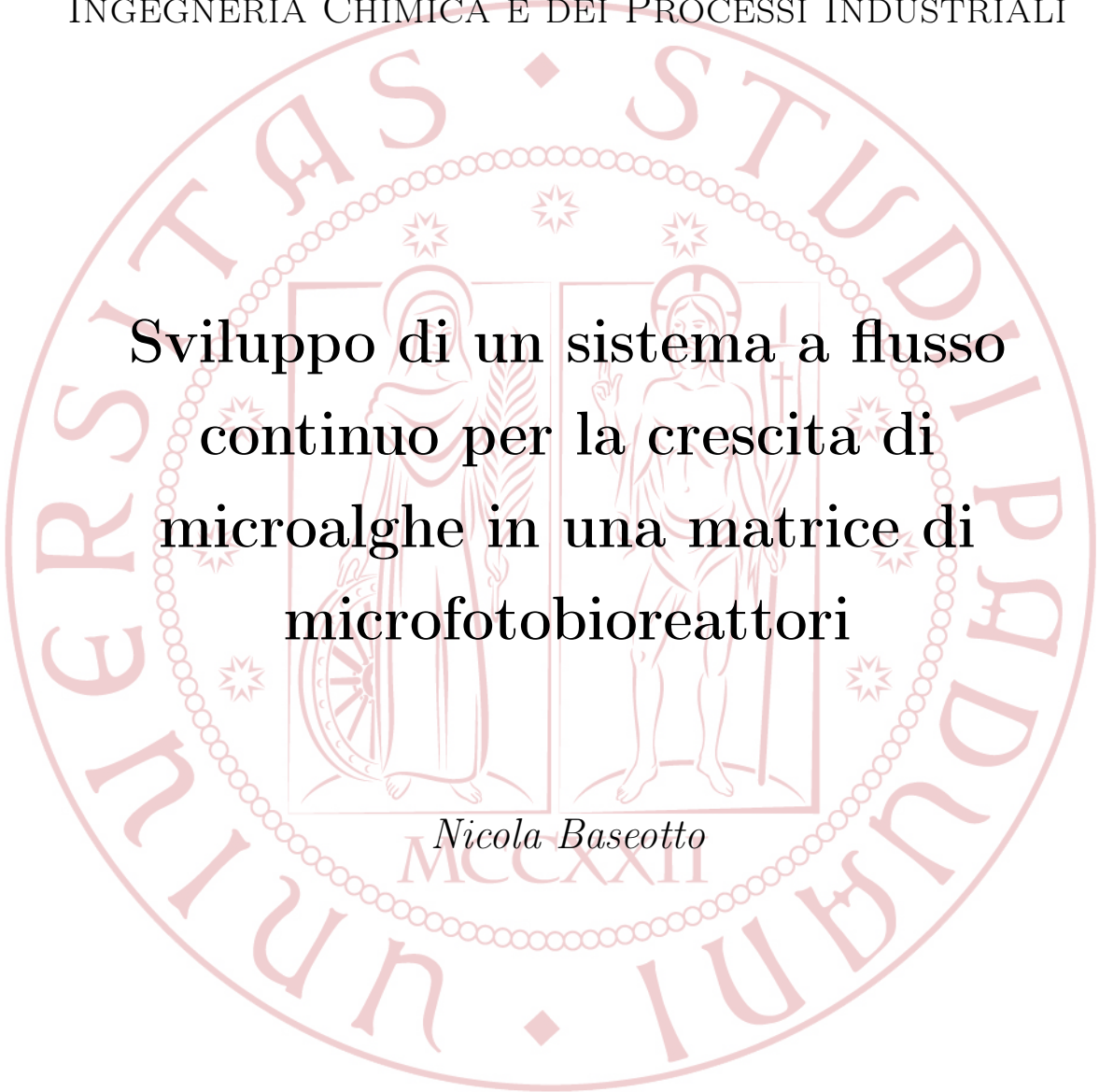
---

ANNO ACCADEMICO 2015/2016



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN  
INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI INDUSTRIALI

The seal of the University of Padua is a large, circular emblem in a light red color. It features a central shield with two figures: on the left, a woman holding a wheel and a staff; on the right, a man holding a staff and a book. The shield is surrounded by a decorative border of small stars and a larger outer ring containing the Latin text 'UNIVERSITAS STUDII PADOVANI'.

**Sviluppo di un sistema a flusso  
continuo per la crescita di  
microalghe in una matrice di  
microfotobioreattori**

*Nicola Baseotto*

Anno Accademico 2015-2016



... Ai miei genitori



# Riassunto

L'interesse nelle microalghe per la produzione di biocarburanti ha avviato un'intensa ricerca da parte della comunità scientifica e dell'industria biotecnologica.

La valutazione dei parametri di crescita nelle diverse condizioni ambientali, effettuata in dispositivi di microscala, rappresenta una valida alternativa per velocizzare la produzione di dati e descrivere l'influenza di molteplici parametri sulla crescita microalgale, mantenendo un'alta affidabilità sperimentale e al contempo un alto rendimento (*high-throughput*). I vantaggi offerti dai microsistemi, rispetto ai metodi tradizionali di coltura in scala di laboratorio, comprendono un ridotto dispendio di tempo, costo e lavoro, grazie alla possibilità di condurre più analisi in parallelo e ottenere processi più rapidi, con minor consumo di reagenti e maggiore automazione.

In questo lavoro è descritto lo sviluppo di un dispositivo di microscala (microfotobioreattore) progettato per lo studio della crescita microalgale in flusso continuo di nutrienti. Il dispositivo è costituito da una matrice di 27 pozzetti integrati in una piattaforma microfluidica. Ciascun pozzetto rappresenta, in assenza di flusso, una condizione sperimentale indipendente.

I risultati, ottenuti dalle prove sperimentali condotte sulla specie *Nannochloropsis gaditana*, confermano che la crescita cellulare è significativamente influenzata dall'intensità luminosa e dalla quantità di nutrienti alimentati (nitrati). In particolare, si è evidenziata una spiccata crescita per le microalghe irradiate ad alta luce ( $360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e alimentate con una maggiore concentrazione di nitrati.





# Indice

<b>Introduzione</b> . . . . .	<b>1</b>
<b>1 Background</b> . . . . .	<b>3</b>
1.1 Le microalghe . . . . .	3
1.1.1 Quadro introduttivo . . . . .	3
1.1.2 Classificazione . . . . .	6
1.1.3 Condizioni di crescita . . . . .	9
1.1.4 Sistemi di coltivazione . . . . .	16
1.2 Scopo della tesi . . . . .	20
<b>2 Materiali e metodi</b> . . . . .	<b>21</b>
2.1 Microfluidica . . . . .	21
2.1.1 Chip microfluidico . . . . .	22
2.1.2 Applicazioni della microfluidica . . . . .	22
2.1.3 Vantaggi della microfluidica . . . . .	23
2.2 PDMS . . . . .	25
2.3 Fabbricazione del chip e del layer . . . . .	28
2.4 Pompa a siringa . . . . .	30
2.5 Tecnica di monitoraggio della crescita . . . . .	32
2.5.1 La fotosintesi nelle microalghe . . . . .	32
2.5.2 La fluorescenza clorofilliana . . . . .	34
2.5.3 Fluorimetro PAM-Imaging . . . . .	37
2.5.4 Protocollo per la misura di fluorescenza . . . . .	39
2.6 Protocollo di taratura . . . . .	41
2.7 Protocollo di crescita . . . . .	43
2.8 Protocollo per la prova fluidodinamica . . . . .	45
2.9 Misura della temperatura . . . . .	45
2.9.1 Funzionamento di una termocoppia . . . . .	46
<b>3 Progettazione del sistema di coltura</b> . . . . .	<b>49</b>
3.1 Prototipi iniziali . . . . .	49

3.1.1	Progettazione del nuovo dispositivo . . . . .	51
3.1.2	Verifica del sistema . . . . .	52
3.2	Versione finale del sistema . . . . .	53
3.2.1	Progettazione del nuovo dispositivo . . . . .	53
3.2.2	Modellazione numerica . . . . .	55
3.2.3	Verifica del sistema . . . . .	57
3.2.4	Controllo della temperatura . . . . .	60
<b>4</b>	<b>Risultati sperimentali e discussione . . . . .</b>	<b>63</b>
4.1	Correlazione Fluorescenza-Concentrazione . . . . .	63
4.2	Risultati prove di crescita senza gradiente . . . . .	65
4.3	Risultati prove di crescita con gradiente . . . . .	70
	<b>Conclusioni . . . . .</b>	<b>77</b>
	<b>A Terreno di coltura . . . . .</b>	<b>81</b>
	<b>B Progetto meccanico dell'unità di chiusura . . . . .</b>	<b>83</b>
	<b>C Fitting dei dati sperimentali . . . . .</b>	<b>87</b>
	<b>Bibliografia . . . . .</b>	<b>93</b>

# Elenco delle figure

1.1	Classi di alghe . . . . .	8
1.2	Curva di crescita algale in una coltura batch . . . . .	14
1.3	Esempio di sistema aperto (a) con relativo schema di funzionamento (b). Diversi esempi di fotobioreattori (c): piatto, tubolare, anulare (in cui il cilindro più interno è vuoto per evitare parti in ombra e per incrementare il rapporto superficie/volume), piatto airlift . . . . .	19
2.1	Caratteristiche volumetriche di diversi microsistemi . . . . .	21
2.2	Esempio di dispositivo microfluidico in PDMS . . . . .	23
2.3	Struttura chimica del PDMS . . . . .	26
2.4	Flessibilità della catena principale nel PDMS. Più è flessibile la catena principale, più il polimero si muoverà facilmente e più sarà bassa la sua temperatura di transizione vetrosa ( $T_g = -127$ °C!) . . . . .	26
2.5	Foto degli stampi utilizzati per creare chip (a) e layer (b) . . . . .	30
2.6	Vista frontale della PHD ULTRA <sup>TM</sup> con evidenziati i componenti e i controlli importanti . . . . .	31
2.7	Disegno schematico dell'organizzazione generale delle membrane nel cloroplasto . . . . .	33
2.8	Principali prodotti delle reazioni alla luce e al buio della fotosintesi. Le reazioni luminose includono l'assorbimento della luce, il trasferimento di eccitoni ed elettroni e la translocazione dei protoni con conseguente produzione di NADPH <sub>2</sub> , ATP e O <sub>2</sub> . Le reazioni al buio avvengono invece nello stroma. In questa fase si ha la riduzione del diossido di carbonio e la sintesi di carboidrati usando il NADPH <sub>2</sub> e l'ATP prodotti nelle reazioni luminose . . . . .	33
2.9	Assorbimento ed emissione della luce da parte della clorofilla. La parte (A) rappresenta un diagramma di livello energetico. Gli spettri di assorbimento e di fluorescenza sono rappresentati nella parte (B) . . . . .	35

2.10	Rappresentazione schematica della distribuzione dell'energia luminosa assorbita nel PS II tra fotochimica ( $\Phi_P$ ), fluorescenza ( $\Phi_F$ ) e dissipazione come calore ( $\Phi_D$ ); quest'ultimo ( $\Phi_D$ ) può verificarsi nelle antenne così come nel centro di reazione. $\Phi_P$ , $\Phi_F$ e $\Phi_D$ rappresentano rispettivamente il rendimento della fotochimica, della fluorescenza e della dissipazione come calore . . . . .	36
2.11	Rappresentazione schematica del funzionamento del FluorCam e foto dell'Open FluorCam FC 800-O . . . . .	39
2.12	Finestra di FluorCam che mostra il risultato di una curva di induzione misurata con PAM . . . . .	40
2.13	Schema della configurazione di inoculo per la taratura contenente 15 differenti concentrazioni. Il valore di ciascuna concentrazione è calcolato dalla media di 3 repliche . . . . .	43
2.14	Rappresentazione schematica di una termocoppia . . . . .	46
2.15	Foto dell'apparato strumentale (a) e (b) e del misuratore di temperatura connesso al dispositivo di crescita (c) . . . . .	48
3.1	Foto dell'unità di chiusura in lamiera insieme al dispositivo di controllo dell'intensità luminosa, in grado di discriminare, per ciascuna delle tre sezioni che compongono il chip, un diverso valore di irradianza fotonica ( $360, 60$ e $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) . . . . .	50
3.2	Rappresentazione in AutoCAD <sup>®</sup> 2D del primo chip utilizzato . . . . .	50
3.3	Foto dell'unità di chiusura in policarbonato . . . . .	51
3.4	Risultati del test con tracciante a 24 ore dall'inizio della prova . . . . .	52
3.5	Foto dell'ultima versione del chip (a) e dell'unità di chiusura (b, c, d) . . . . .	54
3.6	Risultati della simulazione computazionale. Profilo di velocità (a, b), evoluzione nel tempo del gradiente di concentrazione (c) e profilo di concentrazione allo stazionario (d) . . . . .	55
3.7	Foto del primo test con tracciante. Gradiente di concentrazione dopo 24 ore dall'inizio del test (a) e apparato sperimentale (b) . . . . .	58
3.8	Foto del secondo test con tracciante. Gradiente di concentrazione dopo 24 ore dall'inizio del test (a) e gradiente di concentrazione ricreato dai risultati computazionali (b) . . . . .	59

3.9	Risultati della simulazione termica effettuata con il software COM-SOL Multiphysics <sup>®</sup> . Temperatura all'interno del chip a 0, 5, 10 e 15 min (a, b, c, d), evoluzione nel tempo del profilo di temperatura (e) e profilo di temperatura allo stazionario lungo l'altezza dei pozzetti (f) . . . . .	61
4.1	Risultati della correlazione lineare Fluorescenza-Concentrazione al variare dell'irraggiamento . . . . .	64
4.2	Confronto tra curve di crescita in flusso continuo (a) e discontinuo di nutrienti (b), parametrizzate secondo l'intensità luminosa . . . . .	66
4.3	Confronto tra curva di crescita esponenziale e logistica . . . . .	68
4.4	Foto del chip al termine del ciclo di crescita . . . . .	71
4.5	Confronto tra curve di crescita a 60 (a) e 360 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (b), parametrizzate secondo la concentrazione di nitrati . . . . .	72
4.6	Confronto tra curve di crescita a concentrazione di nitrati pari a 100% (a), 68% (b) e 35% (c), parametrizzate secondo l'intensità luminosa . . . . .	73



# Elenco delle tabelle

1.1	Applicazioni commerciali delle microalghe . . . . .	5
1.2	Contenuto lipidico e produttività di alcune specie microalgali marine	11
1.3	Confronto tra vasche <i>raceway</i> e fotobioreattori . . . . .	18
2.1	Parametri calcolati dalle misure di fluorescenza clorofilliana. $F_0$ , $F_v$ e $F_m$ rappresentano rispettivamente la fluorescenza di fondo, variabile e massima nello stato adattato al buio; $F_0^L$ , $F_t$ e $F_m^L$ rappresentano invece fluorescenza di fondo, allo stato stazionario e massima nello stato adattato alla luce . . . . .	37
4.1	Tabella riassuntiva dei parametri di fitting relativi alle curve di crescita in flusso continuo e discontinuo di nitrati . . . . .	69
4.2	Tabella riassuntiva dei parametri di fitting relativi alle curve di crescita a diverse concentrazione di nitrati . . . . .	74





# Introduzione

Le microalghe sono i principali produttori primari di ossigeno nel mondo e mostrano un enorme potenziale per le industrie biotecnologiche. In generale, la biomassa microalgale può essere utilizzata per la produzione di pigmenti, lipidi, alimenti ed energia rinnovabile.

Gran parte del potenziale biotecnologico delle microalghe deriva dalla produzione di composti importanti a partire dalla loro biomassa. La biodiversità dei composti derivati da questi microrganismi consente lo sviluppo di nuove ricerche e futuri progressi tecnologici che produrranno benefici ancora sconosciuti.

Poiché contengono una grande quantità di lipidi, un'altra importante applicazione delle microalghe è la produzione di biodiesel. Inoltre, dopo idrolisi, la biomassa residua può potenzialmente essere utilizzata per la produzione di bioetanolo.

In aggiunta, esse rappresentano un'importante riserva di olio, carboidrati, proteine e altre sostanze cellulari che possono essere tecnologicamente sfruttate.

Un vantaggio della coltura algale concerne il fatto che l'utilizzo di pesticidi non sia necessario. Inoltre, dopo l'estrazione dell'olio, sottoprodotti, quali proteine e la biomassa residua, possono essere utilizzati come fertilizzante. In alternativa, la biomassa residua può essere fermentata per la produzione di bioetanolo e biometano. Altre applicazioni includono la possibilità di bruciare la biomassa per la produzione di energia.

Sebbene la produttività microalgale per la produzione di biocarburanti sia inferiore rispetto ai metodi tradizionali, vi è un crescente interesse per quanto riguarda il potenziale di produzione delle microalghe in combinazione con il trattamento delle acque reflue, tanto che gli esperti favoriscono questa opzione come la più plausibile per la loro applicazione commerciale nel breve termine.

Queste destinazioni d'uso delle microalghe sono promettenti, in quanto permettono di ridurre l'impatto ambientale a carico di molte industrie, tuttavia, vi è la necessità di ottimizzare un certo numero di parametri, quali l'aumento della frazione lipidica e la disponibilità di nutrienti.

Scopo della studio è quello di sviluppare un sistema di microscala, a flusso continuo di nutrienti, in grado di discriminare l'effetto che la diversa concentrazione di nutrienti (in questo caso nitrati) e l'intensità luminosa hanno sulla crescita cellulare.

La tesi si sviluppa in quattro capitoli, nel seguito descritti.

Il primo capitolo offre una visione generale sul mondo delle microalghe, dandone una classificazione e descrivendone le condizioni di crescita e i sistemi di coltivazione. A fine capitolo verrà illustrato l'obiettivo della tesi.

Nel secondo capitolo si introdurranno i concetti di microfluidica, attraverso una trattazione generica sui microsistemi e i loro vantaggi. In seguito verranno esposti i materiali con cui sono stati fabbricati il microfotobioreattore e la relativa unità di chiusura, il metodo di monitoraggio, nonché le apparecchiature utilizzate per valutare la crescita di *Nannochloropsis gaditana*.

Il terzo capitolo affronta l'aspetto progettuale del sistema di coltura, partendo dalla descrizione dei prototipi iniziali utilizzati nell'indagine sperimentale fino ad arrivare alla versione definitiva del dispositivo, attraverso cui è stato possibile conseguire gli obiettivi finali richiesti.

Nel quarto e ultimo capitolo verranno illustrati i risultati sperimentali raggiunti. In particolare, saranno mostrati i risultati inerenti le correlazioni concentrazione vs. fluorescenza massima al variare dell'irraggiamento e le prove sperimentali caratterizzanti gli effetti del tipo di configurazione con cui sono stati alimentati i nutrienti (flusso continuo o discontinuo), della luce e della concentrazione di nitrati sulla crescita cellulare.

# Capitolo 1

## Background

In questo primo capitolo verrà illustrata una panoramica generale sul mondo delle microalghe per comprendere meglio i contenuti sui cui si baserà questo studio. A fine capitolo saranno brevemente esposti gli obiettivi della tesi.

### 1.1 Le microalghe

#### 1.1.1 Quadro introduttivo

Negli ultimi anni si è prestato particolare interesse nel campo della coltivazione microalgale per via del loro enorme potenziale in ambito biotecnologico. Molto di questo potenziale è dovuto alla possibilità di ottenere importanti composti a partire dalla loro biomassa (Schneider *et al.*, 2016).

Le microalghe, chiamate anche fitoplancton, sono organismi fotosintetici procarioti o eucarioti di diametro 1-50  $\mu\text{m}$  che possono crescere rapidamente e vivere in ambiente ostile grazie alla loro struttura unicellulare o multicellulare semplice. Esempi di microorganismi procarioti sono i cianobatteri (*Cyanophyceae*), mentre microalghe eucariote sono rappresentate da alghe verdi (*Chlorophyta*) e diatomee (*Bacillariophyta*).

Le microalghe sono presenti in tutti gli ecosistemi terrestri esistenti, sia acquatici che terrestri, rappresentando una grande varietà di specie in grado di vivere in un ampio range di condizioni ambientali. Si stima che esistano tra le 200 000 e 800 000 specie, tuttavia solamente un numero limitato (poche decine di migliaia) sono state studiate ed analizzate.

Durante il decennio passato molti ricercatori provenienti da diverse nazioni hanno creato una vasta collezione di microalghe. Un esempio ne è la collezione di microalghe d'acqua dolce dell'università di Coimbra, in Portogallo, considerata una delle maggiori al mondo, avendo più di 4000 ceppi e oltre 1000 specie. Questa

collezione attesta la grande varietà di microalghe disponibili ad essere selezionate in svariate ed ampie applicazioni, tra cui prodotti ad elevato valore aggiunto per scopi farmaceutici, colture alimentari per il consumo umano e fonti energetiche.

Le microalghe infatti, oltre a rappresentare la principale fonte di produzione di ossigeno sulla Terra, sono state proposte come materia prima per biocarburanti di terza generazione, presentando una serie di vantaggi rispetto ad altre materie prime disponibili.

Esse si riproducono utilizzando la fotosintesi per convertire l'energia solare in energia chimica, completando un intero ciclo di crescita nell'arco di pochi giorni. Inoltre possono crescere quasi ovunque, avendo bisogno solamente di luce solare, acqua, anidride carbonica e alcuni semplici nutrienti, quali azoto, fosforo e loro composti.

Diverse specie microalgali possono essere adattate per vivere in una grande varietà di condizioni ambientali, cosa che non è possibile fare con altre materie prime da cui produrre il biodiesel (p.es. olio di soia, colza, girasole e palma).

Le microalghe crescono inoltre più velocemente e hanno una produttività in termini di contenuto d'olio nella biomassa più elevato se comparato ad altre piante terrestri ed acquatiche, richiedendo una superficie territoriale molto minore rispetto ad altre materie prime per biodiesel di origine agricola<sup>1</sup> (Mata *et al.*, 2010).

Altre interessanti applicazioni delle microalghe riguardano:

- Sequestro di CO<sub>2</sub> dai gas di combustione di impianti industriali, riducendo così le emissioni di gas serra di un'azienda;
- Biorisanamento delle acque reflue, in particolare nel recupero di alti livelli di azoto (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e fosforo inorganico (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) attraverso l'uso di questi contaminanti acquosi come nutrienti;
- Produzione di bioetanolo, biometano o mangimi per il bestiame a partire dall'olio estratto dalla biomassa algale, il quale può anche essere usato come fertilizzante organico o semplicemente bruciato per cogenerare energia (elettricità e calore);
- Possibilità di essere coltivate in aree non adibite ad uso agricolo e non competere, pertanto, con terreni destinati al consumo alimentare, data la loro predisposizione a vivere anche in ambienti ostili e necessitando di ridotte

---

<sup>1</sup>Tra le 49-132 volte in meno se comparata alle colture di colza o soia e per un 30% su base ponderale per quanto riguarda il contenuto di olio all'interno della loro biomassa.

quantità di nutrienti. Possono inoltre utilizzare acque reflue come mezzo di coltura, non richiedendo l'uso d'acqua dolce.

- Altri composti ad elevato valore aggiunto in diversi settori industriali che vanno dalla chimica fine, alla nutraceutica fino alla produzione di farmaci. Tra questi si annoverano grassi, acidi grassi polinsaturi (p.es. omega-3), oli, coloranti naturali, zuccheri, pigmenti (p.es. carotenoidi) ed antiossidanti.

**Tabella 1.1:** Applicazioni commerciali delle microalghe. *Fonte: Brennan e Martins (2009).*

Microalga	Produzione annuale (t)	Nazione produttrice	Applicazioni e prodotti	Prezzo (€)
<i>Spirulina</i>	3000 peso secco	Cina, India, USA, Myanmar, Giappone	Nutrizione umana Nutrizione animale Cosmetici Ficobiliproteine	36 kg <sup>-1</sup> 11 mg <sup>-1</sup>
<i>Chlorella</i>	2000 peso secco	Taiwan, Germania, Giappone	Nutrizione umana Cosmetici Acquacoltura	36 kg <sup>-1</sup> 50 l <sup>-1</sup>
<i>Dunaliella salina</i>	1200 peso secco	Australia, Israele, USA, Giappone	Nutrizione umana Cosmetici $\beta$ -carotene	215-2150 kg <sup>-1</sup>
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500 peso secco	USA	Nutrizione Umana	
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300 peso secco	USA, India, Israele	Acquacoltura Astaxantina	50 l <sup>-1</sup> 7150 kg <sup>-1</sup>
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	240 DHA <sup>†</sup> peso secco	USA	DHA	43 g <sup>-1</sup>
<i>Schizochytrium</i>	10 DHA peso secco	USA	DHA	43 g <sup>-1</sup>

<sup>†</sup> L'acido docosaesaenoico (DHA) è un grasso omega-3.

Nonostante questi vantaggi e le molte aziende start-up, sorte nel settore dei biocarburanti da alghe, una filiera commerciale per tale produzione non ha ancora visto la luce. Il motivo principale è il costo, ancora troppo elevato, per la

produzione di biomassa algale (Giuliano *et al.*, 2013). Le applicazioni commerciali attuali delle microalghe restano principalmente nel settore degli integratori alimentari, della mangimistica e della cosmetica (vedi Tabella 1.1).

### 1.1.2 Classificazione

Generalmente le alghe vengono suddivise in due gruppi principali. Al primo gruppo, **macroalghe**, appartengono le alghe brune e rosse. Al secondo, composto da un vasto e diversificato gruppo di microrganismi, le **microalghe** (o fitoplancton), appartengono le diatomee, le alghe verdi, dorate, gialle-verdi e blu.

L'analisi genetica e l'identificazione di tutti i tipi di microalghe è ancora in corso e non esiste tuttora una completa e consistente classificazione.

Al momento i tassonomisti le hanno distinte nei seguenti gruppi principali (per completezza sono stati inseriti anche i gruppi attinenti alle macroalghe):

- **Alghe verdi** (*Chlorophyta*, Figura 1.1a). Con più di 7000 specie, esse formano uno dei maggiori gruppi di alghe. Possono essere organismi unicellulari come pluricellulari.

Come le piante, queste alghe contengono 2 tipi di clorofilla, che utilizzano per catturare l'energia luminosa e alimentare il processo di produzione di zuccheri e proteine. In aggiunta, sotto condizioni di stress producono amido e olio che sono immagazzinati all'interno della cellula (Waggoner, 1995d).

- **Alghe rosse** (*Rhodophyta*, Figura 1.1b). Sono un gruppo formato da circa 5000 specie marine per lo più pluricellulari. Queste alghe presentano una colorazione rossa per la presenza del pigmento ficoeritrina; questo pigmento riflette la luce rossa e assorbe la luce blu. Poiché la luce blu penetra nell'acqua ad una profondità maggiore rispetto alla luce con lunghezza d'onda più lunga, questi pigmenti permettono alle alghe rosse di fotosintetizzare e vivere in profondità superiori rispetto alla maggior parte delle altre alghe. In Asia le alghe rosse sono un importante fonte di cibo, come per esempio il nori. L'alto contenuto proteico e vitaminico rendono questo cibo particolarmente interessante, così come la relativa semplicità di coltivazione che iniziò in Giappone più di 300 anni fa.

Alcune alghe rosse sono importanti anche nella formazione di barriere tropicali, un'attività che le ha coinvolte per milioni di anni; in alcuni atolli del Pacifico, le alghe rosse hanno contribuito in maniera significativa alla struttura della barriera rispetto ad altri organismi, anche più dei coralli. Sono anche chiamate alghe coralline perché secernono un guscio duro di carbo-

nato attorno a sé, più o meno in maniera simile a quanto fanno i coralli (Waggoner, 1995e).

- **Diatomee** (*Bacillariophyceae*). Con più di 100 000 specie, questo gruppo di alghe unicellulari producono la maggior parte della biomassa sulla terra. Esse sono un indispensabile fonte di cibo per lo zooplancton in acqua dolce e salata. Le diatomee producono principalmente olio che è immagazzinato all'interno della cellula. Variando la quantità di olio possono regolare la loro galleggibilità (Wolkers *et al.*, 2011).

Le diatomee sono provviste di un caratteristico scheletro costituito da silice e componenti organiche dai cui residui fossili trae origine la diatomite (o farina fossile). Data l'elevata porosità, le diatomite vengono usate come materiale inerte nella produzione di dinamite e come sostanza filtrante; per la durezza e le esigue dimensioni degli elementi silicei che le compongono sono anche utilizzate come abrasivi (*De Agostini: enciclopedia*, s.v. "diatomite").

- **Alghe brune** (*Phaeophyceae*, Figura 1.1c). Con circa 2000 specie, le alghe brune sono organismi pluricellulari che vivono quasi esclusivamente nel mare. Esse possiedono pigmenti come le xantofille e i caroteni che donano la colorazione scura assorbendo i raggi blu-verdi. Sono tipiche dei mari più freddi e alcune specie possono raggiungere anche delle dimensioni notevoli, raggiungendo la lunghezza di diverse decine di metri.

Dall'alga Kelp (specie appartenente alle alghe brune) si estraggono gli alginati, sostanze chimiche viscoso utilizzate nella produzione di carta, dentifricio e nel gelato, in cui l'alginato aiuta a migliorare la struttura e a garantire un congelamento uniforme (Waggoner, 1995a).

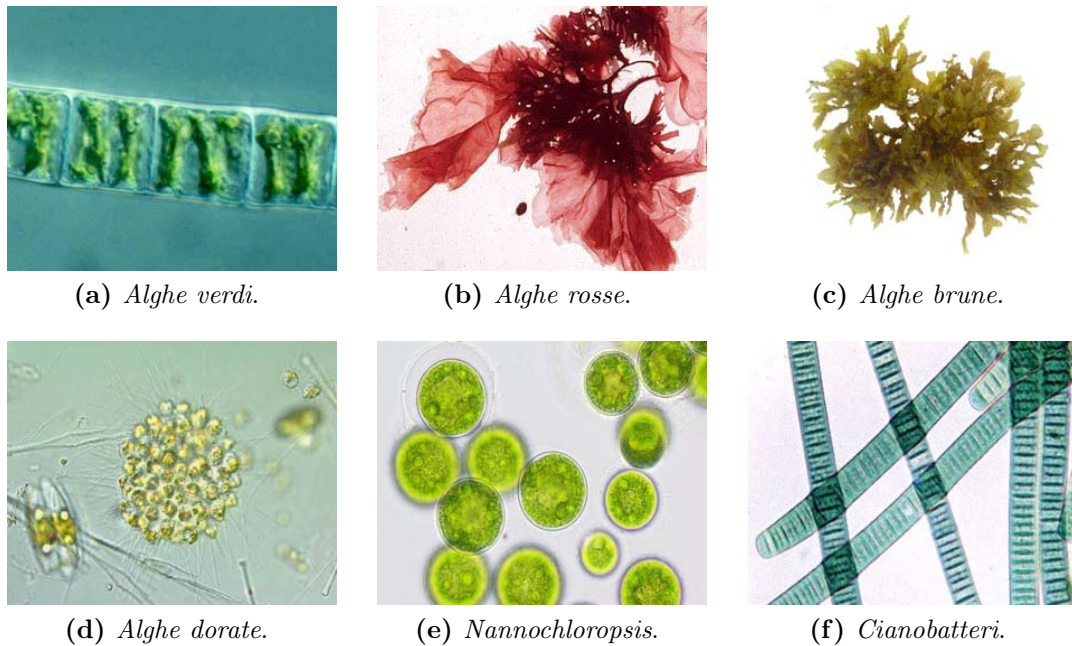
- **Alghe dorate** (*Chrysophyta*, Figura 1.1d). Le alghe dorate sono un gruppo di alghe unicellulari formato da circa 1000 specie principalmente esistenti in acqua dolce. Alcune specie sono incolori, ma la stragrande maggioranza sono fotosintetiche. Come tali, esse sono particolarmente importanti nei laghi, dove possono essere la fonte primaria di cibo per lo zooplancton. Alcuni biologi non considerano le alghe dorate come organismi autotrofi perché quasi tutte le crisofite diventano facoltativi eterotrofi in assenza di luce adeguata o in presenza di abbondante cibo disciolto. In questi casi, l'alga dorata atrofizza e può diventare predatore, nutrendosi di batteri o diatomee (Waggoner, 1995b).

- **Alghe gialle-verdi** (*Xanthophyceae*, Figura 1.1e). Questo tipo di alghe sono parenti strette delle alghe brune, tuttavia la maggior parte delle circa

600 specie sono unicellulari e vivono in acqua dolce.

*Nannochloropsis* è un'eccezione, dato che le specie appartenenti a questo genere (caratterizzate da un'alta velocità di crescita) si trovano in ambiente marino.

Queste alghe producono grandi quantità di olio come riserva di cibo, pertanto sono fortemente adatte come materia prima per la produzione di biodiesel (Wolkers *et al.*, 2011).



**Figura 1.1:** Classi di alghe.

- **Alghe blu o Cianobatteri** (*Cyanophyta*, Figura 1.1f). Poiché sono batteri, essi sono piuttosto piccoli e di solito unicellulari, anche se spesso si sviluppano in colonie abbastanza grandi da vedere. Essi hanno la particolarità di essere i più antichi fossili conosciuti, con più di 3.5 miliardi di anni e rappresentano ancora oggi uno dei più grandi e più importanti gruppi di batteri sulla Terra.

Molti depositi di petrolio formati nel Proterozoico sono attribuiti all'attività dei cianobatteri.

Essi sono anche importanti fornitori di fertilizzanti azotati nella coltivazione di riso e fagioli.

I cianobatteri sono stati estremamente importanti anche nel plasmare il corso dell'evoluzione e del cambiamento ecologico nel corso della storia della Terra. L'atmosfera di ossigeno da cui noi dipendiamo è stata generata da numerosi cianobatteri durante le ere Archeano e Proterozoico. Prima di



allora l'atmosfera aveva una composizione chimica molto diversa, inadatta ad ospitare la vita per come la conosciamo noi oggi. L'altro grande contributo dei cianobatteri è l'origine delle piante. Il cloroplasto attraverso cui le piante possono sintetizzare i nutrimenti per la loro crescita è in realtà un cianobatterio che vive all'interno delle cellule della pianta. Con questo meccanismo nel tardo Proterozoico, o nei primi anni del Cambriano, i cianobatteri si sono insediati all'interno di alcune cellule eucariote, offrendo nutrimento per l'ospite eucariota in cambio di una "casa". Questo evento è noto come **endosimbiosi**, ed è anche l'origine del mitocondrio eucariotica. Poiché i cianobatteri sono organismi fotosintetici e acquatici, essi sono spesso chiamati "alghe blu-verdi". I cianobatteri sono dunque parenti dei batteri (non degli eucarioti): è solo il cloroplasto all'interno delle alghe eucariote a cui i cianobatteri sono correlati (Waggoner, 1995c).

### 1.1.3 Condizioni di crescita

Esistono diversi meccanismi biologici con cui le microalghe producono in modo autonomo l'energia necessaria alla loro crescita e sostentamento. Ciascun tipo di microalga può assumere diversi tipi di metabolismo ed essere in grado di cambiarlo in risposta a cambiamenti climatici ed ambientali. Le diverse condizioni di crescita influenzano anche il tempo con cui la microalga si duplica. Ci sono tre principali meccanismi di crescita:

- **Fotoautotrofo**, in cui la luce (fonte di energia) e l'anidride carbonica (fonte di carbonio) sono utilizzate per produrre energia chimica attraverso la fotosintesi. Questo è il meccanismo maggiormente utilizzato per la coltivazione di microalghe. Il principale vantaggio del processo è l'utilizzo di anidride carbonica come fonte per la crescita o per la produzione di acidi grassi. Dato che l'anidride carbonica è la sola fonte di carbonio, è possibile sfruttare a vantaggio il posizionamento degli impianti di coltivazione vicino a fabbriche o aziende che scaricano CO<sub>2</sub> nell'aria. Se comparato ad altri tipi di crescita, il meccanismo fotoautotrofo ha il più basso rischio di contaminazione.
- **Eterotrofo**. Alcune microalghe sono in grado di crescere in assenza di luce, utilizzando carbonio organico sia come fonte di carbonio che di energia. Questo meccanismo è noto come eterotrofia. Il vantaggio in questo caso è il fatto di non necessitare di luce. Il principale problema della fotoautotrofia, infatti, risiede nella difficoltà di penetrazione della luce quando la densità

della coltura inizia ad aumentare. Questo metodo è definito più pratico ed economico rispetto a quello fotoautotrofo e assicurerebbe una maggiore produttività, resa in olio ed efficienza. Il rischio di contaminazione tuttavia è molto più alto che nel fotoautotrofo.

Le microalghe, per crescere in modo più efficiente, possono utilizzare diversi tipi di zuccheri come fonte di carbonio organico: glucosio, acetato, glicerolo, fruttosio, saccarosio, lattosio, galattosio e mannosio.

- **Mixotrofo**, in cui la crescita è una combinazione di fotoautotrofia ed eterotrofia. La mixotrofia utilizza simultaneamente fonti di carbonio organico che inorganico ( $\text{CO}_2$ ) in presenza di luce. Perciò le microalghe hanno l'abilità di vivere in entrambe le condizioni, a seconda della concentrazione di composti organici e della intensità luminosa disponibile.

Comparando i diversi metodi qui sopra menzionati, è possibile concludere che la crescita eterotrofica risulti essere la migliore per quanto riguarda l'applicazione nella produzione di biodiesel. Le colture appartenenti a questo metabolismo tuttavia possono contaminarsi, specialmente in sistemi a vasca aperta con conseguenti problemi nella produzione su larga scala. Inoltre, il carbonio organico utilizzato come sorgente di carbonio è una materia prima costosa e rende i costi di processo più elevati. La crescita fototrofica è la scelta più semplice in quanto utilizza l'anidride carbonica dai gas di scarico per la produzione di olio. Resta il fatto che la resa in olio risulta inferiore (biomassa totale inferiore) rispetto ad una crescita eterotrofica perché in questo caso il tempo di duplicazione della biomassa è più alto. Il meccanismo fototrofico è comunque il preferito per impostare un sistema economicamente vantaggioso (Özçimen *et al.*, 2016).

La crescita delle alghe è influenzata anche da altri fattori:

- **Abiotici**: luce, temperatura, concentrazione dei nutrienti, ossigeno, anidride carbonica, pH, salinità e presenza di sostanze chimiche tossiche;
- **Biotici**: agenti patogeni (batteri, funghi e virus) e competizione con altre alghe;
- **Operativi**: effetti del mescolamento, fattore di diluizione, profondità, frequenza della raccolta e aggiunta di bicarbonato.

Di seguito verranno esaminati alcuni dei fattori più importanti.

Il tipo di **specie microalgale** influenza il tipo di prodotto che si vuole produrre; per la produzione di biodiesel si preferiscono le alghe con un contenuto più elevato in olio ed un maggiore tasso di crescita. In Tabella 1.2 è possibile

osservare come il genere *Nannochloropsis*, in particolare, sia contraddistinto da un'alta produttività lipidica. Questa microalga infatti ha recentemente attirato l'interesse della comunità scientifica in quanto è in grado di accumulare grandi quantità di lipidi neutri in varie condizioni di coltura. Questi lipidi neutri sono il substrato per la produzione di carburante diesel a base di olio.

Gli esperimenti condotti in questo lavoro di tesi si riferiscono esclusivamente alla specie marina *Nannochloropsis gaditana*.

**Tabella 1.2:** Contenuto lipidico e produttività di alcune specie microalgali marine.  
Fonte: Amaro et al. (2011).

Specie microalgali	Contenuto lipidico (%, w/w <sub>DW</sub> )	Produttività lipidica (mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )
Dunaliella salina	6.0–25.0	116.0
Dunaliella primolecta	23.1	–
Dunaliella tertiolecta	16.7–71.0	–
Dunaliella sp.	17.5–67.0	33.5
Isochrysis galbana	7.0–40.0	–
Isochrysis sp.	7.1–33	37.8
Nannochloris sp.	20.0–56.0	60.9–76.5
Nannochloropsis oculata	22.7–29.7	84.0–142.0
Nannochloropsis sp.	12.0–53.0	60.9–76.5
Neochloris oleoabundans	29.0–65.0	90.0–134.0
Pavlova salina	30.9	49.4
Pavlova lutheri	35.5	40.2
Phaeodactylum tricornutum	18.0–57.0	44.8
Spirulina platensis	4.0–16.6	–

Un altro parametro chiave è l'**illuminazione**. Le microalghe che crescono fotosinteticamente necessitano di luce e l'intensità luminosa è il fattore limitante più significativo. L'illuminazione nel fotobioreattore influenza la composizione della biomassa, il tasso di crescita e i prodotti. La radiazione fotosinteticamente attiva (PAR) è una misura dell'energia della radiazione solare intercettata dalla *clorofilla a* e *b* nelle piante. È, in pratica, una misura dell'energia effettivamente

disponibile per la fotosintesi, che è minore dell'energia totale proveniente dal Sole, perché lo spettro di assorbimento della clorofilla non è molto esteso. La PAR è considerata pari al 41% della radiazione solare totale e corrisponde alla radiazione nel visibile (da 400 a 700 nm) (*Wikipedia: enciclopedia*, s.v. "Radiazione Fotosinteticamente Attiva"). La lunghezza d'onda per massimizzare la fotosintesi dovrebbe essere tra i 600-700 nm.

L'intensità luminosa dipende dalla densità microalgale. Più alta è la densità e più alta deve essere l'intensità luminosa.

La luce influenza anche il contenuto lipidico. In uno studio condotto da Yee-sang e Cheirsilp (2011) si sottolinea come il contenuto lipidico in tutti i ceppi da loro considerati aumenti all'aumentare dell'intensità luminosa.

I cambiamenti nell'intensità e qualità luminosa possono alterare la qualità del biocarburante. Ciascun tipo di microalga ha il suo punto ottimale di assorbimento della luce. Un eccesso di luce può inattivare e danneggiare l'apparato fotosintetico della microalga, il che si traduce in una riduzione della resa fotosintetica (fotoinibizione) e in un decremento nella produzione di biomassa. Cheirsilp e Torpee (2012) hanno investigato l'effetto dell'intensità luminosa sulla crescita e il contenuto lipidico della specie marina *Nannochloropsis*. Nel loro lavoro si riporta come la crescita di *Nannochloropsis* aumenti costantemente fino ad un livello massimo, aumentando l'intensità luminosa fino a 10 000 lux (unità di misura dell'illuminamento, pari a un flusso luminoso di 1 lumen ripartito su una superficie di 1 m<sup>2</sup>). Più alti livelli di intensità hanno limitato la crescita, dando tuttavia come vantaggio un più alto contenuto lipidico ed una più alta resa.

Per incrementare la produzione di microalghe, bisognerebbe limitare la fotoinibizione o evitare eccessi di luce. In aggiunta, è necessario evitare quello che si può considerare come un difetto di funzionamento della fotosintesi: la fotorespirazione. La fotorespirazione è un processo metabolico respirativo utilizzato in generale da determinate piante per eliminare l'ossigeno in eccesso. In tal caso, la fotosintesi non porta ad alcun prodotto, perché gli zuccheri che si formano vengono immediatamente riossidati ad anidride carbonica e acqua in modo non redditizio (dato che, a differenza della respirazione cellulare la fotorespirazione non produce ATP). La fotorespirazione equivale pertanto a una minor crescita della pianta o, nel nostro caso, della microalga.

Un altro parametro importante per la crescita è la **temperatura**. Per la crescita massima è necessario sapere qual è la temperatura ottimale. La temperatura influenza anche la produzione di lipidi e la composizione. Il grado di insaturazione dei lipidi della membrana algale, infatti, aumenta se le colture vengono mantenute a temperature inferiori all'ottimo. L'effetto del calore, tuttavia, è meno limitante

rispetto a quello della luce e della CO<sub>2</sub>. La temperatura ottimale per le colture microalgali è tipicamente compresa tra 20 e 24 °C. Questo range di valori può variare in accordo con la composizione del mezzo di coltura, tipo di coltura e ceppo. La maggior parte delle microalghe coltivate possono tollerare temperature che vanno dai 16 ai 27 °C. Temperature al di sotto dei 16 °C causano un notevole aumento del tempo di duplicazione, mentre, per la maggior parte delle specie, temperature sopra i 35 °C hanno un effetto letale sull'alga. Questi intervalli, comunque, possono variare in funzione di fattori ambientali come salinità, pH ed anidride carbonica.

Per quanto riguarda il **pH**, esso può variare in funzione del mezzo di coltura. Per altri valori di pH, l'anidride carbonica potrebbe essere un fattore limitante per la crescita e la fotosintesi. L'intervallo di pH più usato per far crescere le alghe è attorno a 7-9. L'ottimo è tra 8.2 e 8.7, tuttavia può variare a seconda del ceppo.

Esiste una complessa relazione tra la concentrazione di CO<sub>2</sub> e il pH a causa dell'equilibrio chimico tra le specie CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Un incremento nella concentrazione di CO<sub>2</sub> può portare ad un aumento della produttività di biomassa, d'altro canto ciò avrà un effetto anche sul pH, che diminuirà, provocando un effetto importante sulla fisiologia microalgale. L'acqua contaminata, con un elevato pH ha effetti negativi sull'abbondanza algale. Nel caso non fosse fornita abbastanza CO<sub>2</sub>, l'alga utilizzerà i carbonati per sostenere la sua crescita.

Ricapitolando, sebbene alte concentrazioni di anidride carbonica forniscano un'alta efficienza in biomassa, dall'altro lato si avrà un maggior rischio di contaminazione ed effetti sulla fisiologia microalgale dovuti all'abbassamento del pH.

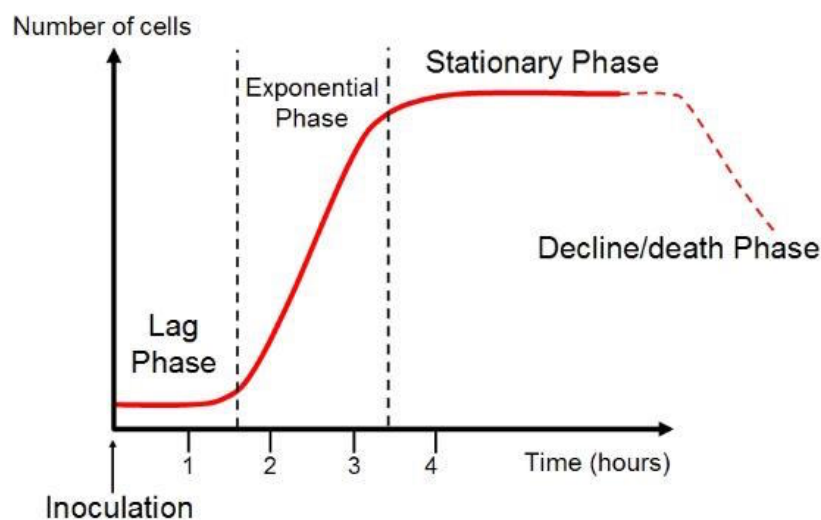
Il **mescolamento** è un processo molto importante per aumentare la produttività della biomassa nei fotobioreattori. Il mescolamento è necessario per prevenire la sedimentazione delle alghe ed evitare che le cellule aderiscano alla parete del bioreattore. Il mescolamento fornisce inoltre pari luce e nutrienti a tutte le cellule, aumenta il trasporto di gas (CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>) tra mezzo di coltura e aria e mantiene uniforme il pH. Non tutte le alghe tuttavia possono sopportare l'agitazione, in quanto sensibili allo stress idrodinamico. Alti gradi di mescolamento inoltre possono causare il danneggiamento delle cellule (Özçimen *et al.*, 2016).

I **nutrienti** richiesti per la crescita e il sostentamento algale si dividono in macro e micro elementi. I macro nutrienti sono rappresentati da nitrati, fosfati e silicati, mentre i micro nutrienti da alcuni elementi in traccia (metalli ed agenti chelanti, come l'EDTA o acido etilendiamminotetraacetico), altri minerali e vitamine. Il mezzo di coltura utilizzato per *Nannochloropsis gaditana*, **f/2**, è costituito da una base di sale marino (32 g/l) e soluzione tampone Tris-HCl (pH 8)

in concentrazione 40 mM più una soluzione di arricchimento (Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975). Per ulteriori dettagli sulla composizione dell'arricchimento si veda l'Appendice A.

Quando sono forniti nutrienti a sufficienza e adeguate condizioni ambientali le microalghe possono crescere più velocemente, con tempi di duplicazione che oscillano tra le 3.5-24 ore.

La crescita delle microalghe in una coltura batch avviene in cinque fasi (vedi Figura 1.2):



**Figura 1.2:** Curva di crescita algale in una coltura batch.  
Fonte: <https://www.premedhq.com>

1. **Fase di latenza**, in cui il ritardo nella crescita potrebbe essere dovuto alla presenza di cellule non vitali nell'inoculo o essere il periodo di regolazione fisiologica a causa di cambiamenti nei nutrienti o nelle condizioni di coltura. Ad esempio, il ritardo nella crescita può essere osservato quando cellule adattate all'ombra sono esposte ad un irraggiamento più alto. La fase di induzione può essere prevenuta o ridotta utilizzando come inoculo cellule nella fase finale di crescita esponenziale, coltivate nello stesso terreno di coltura e con le stesse condizioni di crescita. Alla fine della fase di latenza le cellule si sono adattate al nuovo ambiente e iniziano a crescere e a moltiplicarsi.
2. **Fase esponenziale**, in cui il tasso di crescita della popolazione rimane sempre positivo nel tempo e dipendente da nutrienti, temperatura e illumi-

nazione disponibili nell'ambiente (inizialmente il basso numero di cellule in coltura rende minimo l'ombreggiamento reciproco e ogni cellula si trova in saturazione luminosa).

Il tempo necessario a raddoppiare il numero di cellule vitali è chiamato tempo di duplicazione ( $t_d$ ) o tempo di generazione, in quanto rappresenta il tempo impiegato per crescere e produrre una generazione di cellule. Il numero di cellule in una coltura microbica in crescita esponenziale potrebbe essere matematicamente descritto come segue:

$$2^0 N_0 \rightarrow 2^1 N_0 \rightarrow 2^2 N_0 \rightarrow 2^3 N_0 \rightarrow 2^N N_0 \quad (1.1)$$

$N_0$  Numero iniziale di cellule

$N$  Numero di duplicazioni (generazioni)

Il numero di duplicazioni ( $N$ ) ad un intervallo di tempo  $t$  è determinato dalla relazione  $t/t_d$ . Perciò, il numero di cellule ( $N_t$ ) in una coltura in crescita esponenziale dopo essere stata incubata per un dato tempo  $t$  può essere stimata come segue:

$$\begin{aligned} N_t &= 2^{t/t_d} N_0 \\ N_t/N_0 &= \ln 2 \cdot t/t_d \end{aligned} \quad (1.2)$$

Durante la fase di crescita esponenziale il tasso di crescita delle cellule è proporzionale alla biomassa delle cellule. Siccome la biomassa generalmente può essere misurata in modo più accurato rispetto al numero di cellule, le equazioni base di crescita microbica sono spesso espresse in termini di massa. Quindi, l'equazione (1.2) può essere modificata assumendo la concentrazione di biomassa all'istante iniziale e al generico tempo  $t$  rispettivamente come  $X_0$  e  $X_t$ :

$$\begin{aligned} \ln(X_t - X_0)/t &= \ln 2/t_d \\ \frac{d(\ln X)}{dt} &= 0.693/t_d \\ \frac{d(\ln X)}{dX} \cdot \frac{dX}{dt} &= 0.693/t_d \\ \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} &= 0.693/t_d \\ k &= 0.693/t_d \end{aligned} \quad (1.3)$$

dove  $k$  rappresenta il tasso di crescita specifico ( $\text{h}^{-1}$ ) della coltura. Esso definisce la frazione di aumento della biomassa per unità di tempo, ovvero l'incremento medio in grammi di biomassa a partire da ciascun grammo di biomassa esistente per ora.

3. **Fase stazionaria**, in cui il tasso di crescita della popolazione è molto rallentato o azzerato e la concentrazione algale raggiunge un valore elevato. Per colture estensive è conveniente mantenere la curva di crescita in questa fase, garantendo un giusto apporto di nutrienti, regolando la concentrazione algale e assicurando luce sufficiente alle cellule metabolicamente attive.
4. **Fase decrescente**, in cui le cellule tendono a morire, essendo sospesa sia la fase di divisione sia la fase metabolica. Coincide in genere con eccessiva concentrazione algale, esaurimento di nutrienti nel mezzo di coltura o con l'instaurarsi di condizioni avverse alla crescita (temperature non idonee, presenza di sostanze tossiche, illuminazione inadeguata) (Lee, 2016).

#### 1.1.4 Sistemi di coltivazione

A seconda delle specie di microalghe, delle condizioni ambientali e della disponibilità di nutrienti, le microalghe possono essere coltivate in sistemi aperti (vasche) o chiusi (fotobioreattori).

Le vasche possono essere di tipo *raceway*, circolari con braccio rotante ed inclinate. Quelle *raceway* sono costituite da un canale a circuito chiuso di ricircolo profondo circa 0.3 m (di solito costruito in cemento e rivestito di plastica bianca) e una ruota a pale per la miscelazione e la circolazione. La profondità delle colture è inversamente correlata alla concentrazione cellulare e alla quantità di luce disponibile. Profondità di 15-40 cm rappresentano un compromesso fra esigenze contrastanti quali il dispendio di energia per l'agitazione, la raccolta (pale rotanti, pompe per acqua, air-lift) e l'escursione termica diurna (Barbato, 2009).

I sistemi aperti sono meno costosi da costruire, hanno una durata più lunga e una maggiore capacità produttiva rispetto ai sistemi chiusi, anche se occupano una superficie maggiore. Rispetto ai sistemi chiusi, però, le vasche presentano un maggior fabbisogno di energia (per omogeneizzare i nutrienti) e di acqua (almeno  $150 \text{ L/m}^2$ ); inoltre sono più suscettibili alle condizioni ambientali (uno dei fattori limitanti è la variabilità della temperatura dell'acqua, dell'evaporazione e dell'illuminazione che dipenderanno dalla stagione, da eventi climatici e dalla localizzazione geografica) e alla contaminazione da parte di altre microalghe indesiderate, lieviti, funghi, muffe e batteri.



I fotobioreattori possono essere piatti o tubolari, orizzontali, verticali, inclinati o a spirale. Un fotobioreattore tubolare è costituito da una serie di tubi dritti e trasparenti, di plastica o vetro, del diametro non superiore a 0.1 m e della lunghezza inferiore agli 80 m, nei quali viene catturata la luce solare. Per consentire il maggior immagazzinamento di energia solare, solitamente i tubi sono disposti parallelamente uno all'altro con orientamento nord-sud e la superficie sotto il collettore è rivestita di plastica bianca per aumentare la riflettanza. I fotobioreattori consentono di avere un miglior controllo delle condizioni e dei parametri di crescita della coltura (pH, temperatura, ossigeno, CO<sub>2</sub>), minori perdite di anidride carbonica, una maggiore densità delle microalghe e produttività volumetrica oltre ad una riduzione della contaminazione da parte di altri microrganismi. Le principali limitazioni riguardano invece il surriscaldamento, l'accumulo di ossigeno, gli elevati costi di costruzione e funzionamento dell'impianto. Questi problemi limitano le dimensioni dei fotobioreattori, che attualmente sono costituiti principalmente da serpentine di modesta lunghezza e volumi limitati. Gli alti costi di mantenimento di questi tipi di colture ne limitano l'uso alle sole colture massive di elevata purezza, necessarie per l'estrazione di biomolecole ad alto valore commerciale o per inoculi di colture in sistemi aperti.

La comparazione dei due sistemi di coltura (vedi Tabella 1.3 e Figura 1.3) non è semplice in quanto ci sono diversi parametri da considerare. In genere si valutano la produttività volumetrica (produttività per unità di volume del reattore), la produttività areale (produttività per unità di superficie occupata dal reattore) e la resa in olio. I sistemi chiusi sono migliori delle vasche per la produttività volumetrica (8-13 volte superiore) che permette loro di avere un minor costo di biomassa. Ciononostante i costi totali di produzione e di gestione sono minori per le vasche (Amicarelli *et al.*, 2012).

**Tabella 1.3:** Confronto tra vasche *raceway* e fotobioreattori. *Fonte: Amicarelli et al. (2012).*

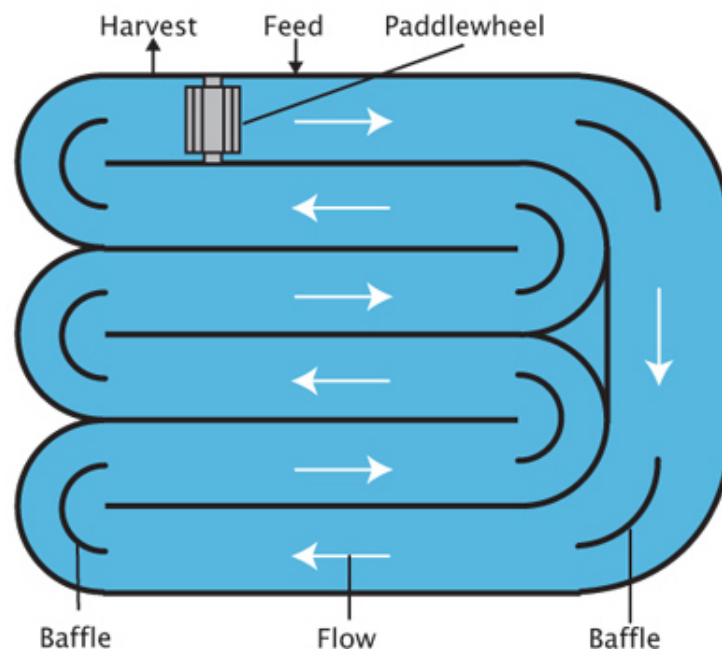
	Impianto con vasche <i>raceway</i>	Impianto con fotobioreattori
Produzione annua di biomassa (kg)	100 000	100 000
Produttività volumetrica (kg/m <sup>3</sup> /g)	~ 0.12	> 1.5
Produttività areale (kg/m <sup>2</sup> /g)	0.035	0.048
Concentrazione della biomassa nel brodo di coltura (kg/m <sup>3</sup> )	0.14	4
Superficie necessaria (ha)	> 0.75	> 0.55
Resa in olio (L/ha)	99 400*/42 600 <sup>†</sup>	136 900*/58 700 <sup>†</sup>
Consumo annuo di CO <sub>2</sub> (kg)	183 333	183 333
Tipologia di sistema	Vasca: 978 m <sup>2</sup> (12 × 82 m) 30 cm profondità	Unità: 132 tubi paralleli, di l = 80 m e $\phi = 6$ cm
Rapporto Area/Volume	Basso	Alto
Densità popolazione algale	Bassa	Alta
Concentrazione biomassa	Minore	Maggiore
Rischio di contaminazione	Alto	Ridotto
Controllo della contaminazione	Difficile	Facile
Controllo delle specie	Difficile	Facile
Controllo del processo	Difficile	Facile
Controllo delle temperatura	Difficile	Più uniforme
Efficienza di utilizzo della luce	Scarsa	Elevata
Perdita di acqua	Molto alta	Bassa
Perdita CO <sub>2</sub>	Alta	Bassa
Pulizia degli impianti	Non richiesta	Richiesta
Costi operativi	Bassi	Elevati

\* per biomassa con contenuto in olio del 70%.

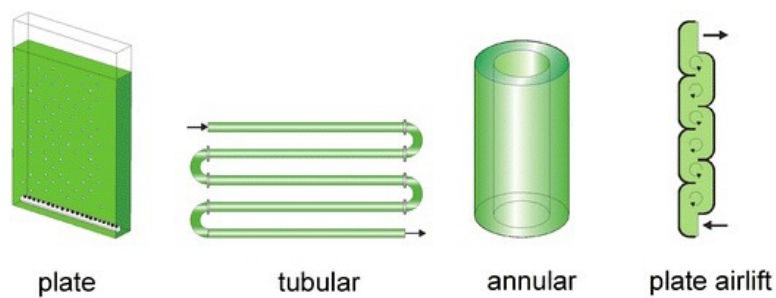
<sup>†</sup> per biomassa con contenuto in olio del 30%.



(a) Vasca di tipo raceway.



(b) Schema di funzionamento.



(c) Fotobioreattori.

**Figura 1.3:** Esempio di sistema aperto (a) con relativo schema di funzionamento (b). Diversi esempi di fotobioreattori (c): piatto, tubolare, anulare (in cui il cilindro più interno è vuoto per evitare parti in ombra e per incrementare il rapporto superficie/volume), piatto airlift.

Fonte: <https://pubs.ext.vt.edu> e <https://www.researchgate.net>

## 1.2 Scopo della tesi

Come si è visto nei precedenti paragrafi, le microalghe rappresentano una promettente materia prima per la produzione sostenibile di biocarburanti e un'importante risorsa per molti altri bio-composti ad elevato valore aggiunto.

Al fine di sfruttare appieno le potenzialità di interesse industriale di specie microalgali emergenti, è necessario valutare l'impatto che i diversi fattori ambientali hanno sulla loro crescita.

La valutazione dei parametri di crescita nelle diverse condizioni ambientali, effettuata sia in scala di laboratorio che in un impianto pilota, comporta una lunga ed intensa indagine per via dell'elevato dispendio di tempo generato dal gran numero di esperimenti richiesti. Per questo motivo, i dispositivi su microscala rappresentano una valida alternativa per velocizzare la produzione di dati e descrivere l'influenza di molteplici parametri sulla crescita microalgale, mantenendo un'alta affidabilità sperimentale e al contempo un alto rendimento (Perin *et al.*, 2016).

Lo scopo di questa tesi è progettare un sistema microfluidico a flusso continuo capace di formare un gradiente chimico stabile e discriminare l'effetto che luce e concentrazione della singola specie di nutriente (in questo caso nitrati) hanno sulla crescita fotosintetica della specie microalgale oggetto di studio (*Nannochloropsis gaditana*).

La crescita sarà valutata *in vivo* misurando la fluorescenza emessa dalla clorofilla. La correlazione tra fluorescenza e concentrazione sarà ottenuta attraverso una semplice retta di taratura.

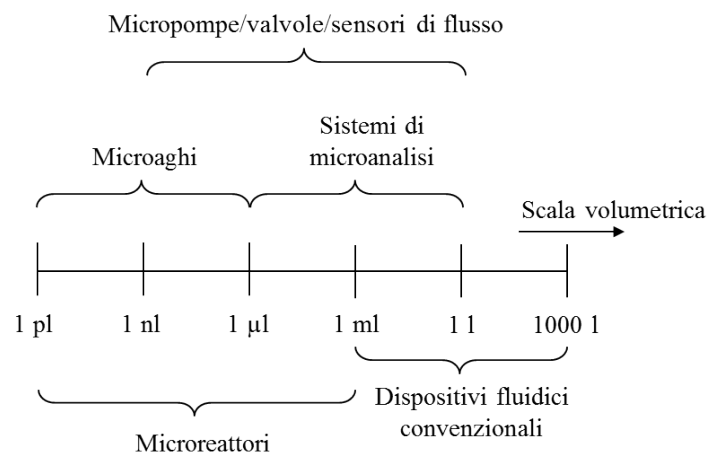
# Capitolo 2

## Materiali e metodi

In questo capitolo saranno esposti i concetti generali relativi alle tecnologie di microscala adottate in questo studio. Verranno altresì presentate le apparecchiature, i materiali, nonché i metodi utilizzati per monitorare sia la crescita microalgale sia alcuni parametri ad essa legati.

### 2.1 Microfluidica

La microfluidica è la scienza che studia il flusso dei liquidi all'interno di canali di dimensioni micrometriche. La microfluidica può essere considerata sia una scienza (studio del comportamento dei fluidi in micro-canali) che una tecnologia (fabbricazione di dispositivi microfluidici per applicazioni quali *lab-on-a-chip*).



**Figura 2.1:** Caratteristiche volumetriche di diversi microsistemi. *Immagine tradotta e riadattata da: Panigrahi (2016).*

Per essere considerato microfluidico, almeno una dimensione del canale di un dispositivo deve essere dell'ordine di un micron o decine di micron. Un altro modo preferito per definire la microfluidica si basa sulla quantità di fluido. La Figura 2.1 mostra le caratteristiche volumetriche di diversi microsistemi; i microreattori, in particolare, trattano volumi di fluido tra 1  $\mu\text{l}$  e 1 ml.

### 2.1.1 Chip microfluidico

Un chip microfluidico è un insieme di microcanali incisi o stampati in un materiale (vetro, silicio o polimero come il PDMS, acronimo per polidimetilsilossano). Questa rete di microcanali intrappolati nel chip microfluidico è collegata all'esterno da ingressi e uscite forate attraverso il chip, come un'interfaccia tra il macro e il micro-mondo. È attraverso questi fori che i liquidi (o gas) vengono iniettati e rimossi dal chip microfluidico (tramite tubi, adattatori per siringa o anche semplici fori nel chip) con sistemi esterni attivi (regolatori di pressione, pompe a siringa o pompe peristaltiche) o passivi (ad esempio pressione idrostatica).

L'uso di materiali diversi per i chip microfluidici quali polimeri (p.es. PDMS), ceramici (come il vetro), semiconduttori (ad esempio silicio) e metalli è attualmente possibile grazie allo sviluppo di processi specifici: deposizione ed elettrodeposizione, incisione, incollaggio, stampaggio ad iniezione, goffatura e soft-litografia (soprattutto con PDMS).

L'accesso a questi materiali rende possibile progettare chip microfluidici con nuove funzionalità come specifiche caratteristiche ottiche, compatibilità biologica o chimica, la prototipazione rapida o minori costi di produzione, la possibilità di rilevamenti elettronici. La scelta finale dipende dall'applicazione mirata.

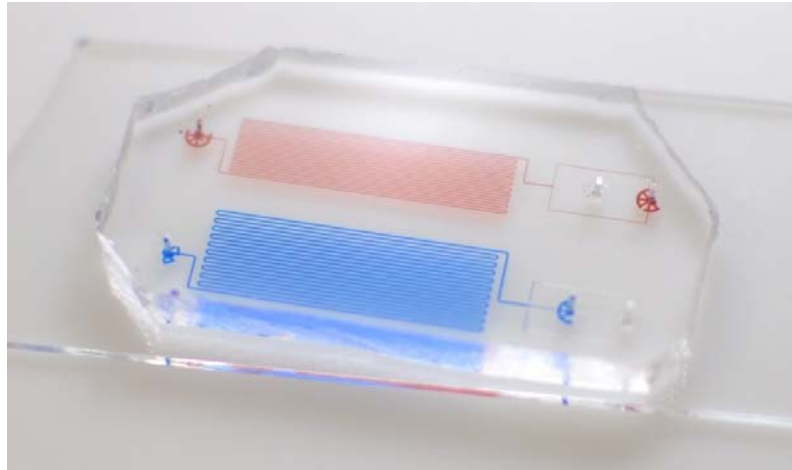
Al giorno d'oggi, molti ricercatori utilizzano il PDMS e la soft-litografia per via della loro semplicità e rapidità di processo: questa tecnologia permette loro di costruire rapidamente prototipi e testare le loro applicazioni/impostazioni, evitando laboriosi protocolli di fabbricazione (ELVESYS R&D team, 2015e).

In Figura 2.2 è riportato un esempio di chip in polidimetilsilossano.

### 2.1.2 Applicazioni della microfluidica

Nel corso del tempo la tecnologia microfluidica ha trovato molte applicazioni, principalmente:

- Nel campo biomedico, con i *lab-on-a-chip* che consentono l'integrazione di molti test medici su un singolo chip (ELVESYS R&D team, 2015b).



**Figura 2.2:** Esempio di dispositivo microfluidico in PDMS.  
*Fonte: <http://www.ntnu.edu/microfluidics>*

- Nella ricerca della biologia cellulare, in quanto i microcanali hanno la stessa dimensione caratteristica delle cellule. I chip microfluidici, pertanto, permettono una facile manipolazione delle singole cellule e cambiamenti rapidi delle condizioni di coltura.
- Nella cristallizzazione delle proteine, perché i dispositivi microfluidici permettono la generazione in un unico chip di un gran numero di condizioni di cristallizzazione (temperatura, pH, umidità...).
- In molti altri settori: screening di farmaci, test di glucosio, microreattori chimici, elettrochimica, raffreddamento di microprocessori o microcelle a combustibile.

### 2.1.3 Vantaggi della microfluidica

I dispositivi microfluidici sfruttano le proprietà fisiche e chimiche dei fluidi in microscala e offrono diversi vantaggi rispetto ai sistemi di dimensioni convenzionali (ELVESYS R&D team, 2015d), in particolare:

- Capacità di manipolare e rilevare piccoli volumi;
- Basso consumo di reagenti;
- Meno errori umani, in virtù di una maggiore automazione;
- Maggiore ripetibilità;
- Riduzione del consumo energetico;

- Possibilità di condurre più analisi in parallelo con processi più rapidi che portano ad un alto rendimento;
- Alto tasso di trasporto di calore nelle applicazioni come scambiatore di calore;
- Sicurezza, affidabilità, portabilità (per applicazioni point-of-care) e interfaccia di facile utilizzo;
- Costo globale ridotto per analisi;
- Intero processo biologico integrato e semplificato per gli utenti finali.

Un importante vantaggio dei dispositivi microfluidici riguarda l'utilizzo di piccoli volumi di fluido, che consente l'analisi e l'utilizzo ridotto di campioni, prodotti chimici e reagenti; questo permette di ridurre i costi e la quantità di scarti prodotti.

La bassa massa termica e il grande rapporto superficie/volume dei piccoli componenti facilita il trasporto di calore, consentendo rapidi cambiamenti di temperatura ed un controllo preciso della stessa. Nelle reazioni esotermiche, questa caratteristica può aiutare ad eliminare l'accumulo di calore o i punti caldi (*hot spots*) che potrebbero portare a reazioni secondarie indesiderate o peggio a reazioni fuggitive.

L'elevato rapporto superficie/volume rappresenta un vantaggio anche in processi che coinvolgono catalizzatori legati a supporti o enzimi e nella sintesi in fase solida.

Molte tecnologie microfluidiche consentono di realizzare dispositivi contenenti multipli componenti con diverse funzionalità, ovvero, dispositivi che integrano multiple funzioni di laboratorio (p.es. il campionamento, la pre-elaborazione, e la misura coinvolti in un test) su un singolo chip di pochi centimetri quadrati di dimensione. Questo è il tipo di visione che ha portato i termini "lab-on-a-chip" (LOC) e "Micro Total Analysis Systems" ( $\mu$ -TAS)<sup>1</sup>.

L'esecuzione di tutte le operazioni riguardanti la manipolazione dei fluidi all'interno di un singolo chip consente un notevole risparmio di tempo, riduce il rischio di perdita del campione o di contaminazione (per via della minore manipolazione) e può eliminare la necessità di ingombranti e costosi robot da laboratorio.

---

<sup>1</sup> "Lab-on-a-chip" indica generalmente la riduzione, su scala chip, di singoli o multipli processi di laboratorio, mentre " $\mu$ -TAS" è inerente all'integrazione della sequenza totale di processi di laboratorio per l'esecuzione di analisi chimiche.



Il funzionamento dei dispositivi microfluidici, inoltre, può essere completamente automatizzato, aumentando così la produttività, migliorando la facilità d'uso, migliorando la ripetibilità e riducendo l'elemento di errore umano. L'automazione è utile anche in applicazioni che richiedono il funzionamento a distanza, come i dispositivi che effettuano il monitoraggio continuo dei processi chimici o ambientali in luoghi inaccessibili (Panigrahi, 2016).

Nella microscala le leggi della fisica rimangono le stesse dei sistemi macroscopici, tuttavia il fattore di scala può dare predominanza a forze differenti. Ad esempio, nel caso del flusso di un fluido, la riduzione delle dimensioni riduce l'influenza delle forze inerziali rispetto alle quelle di attrito, portando alla formazione di un flusso laminare nei canali microfluidici. Inoltre, la riduzione delle dimensioni ha un'influenza diretta sui tempi caratteristici del sistema, come il tempo necessario per la diffusione di una molecola, che diminuisce con il quadrato della lunghezza caratteristica.

I dispositivi microfluidici offrono molti vantaggi nelle applicazioni di biologia cellulare. Alcuni vantaggi, già enunciati in precedenza, derivano dalla capacità dei microsistemi di rispondere rapidamente ai cambiamenti ambientali e controllare efficacemente la temperatura. Le proprietà di flusso laminare sono peraltro utili anche nella formazione di gradienti statici e dinamici a risoluzione subcellulare.

A fianco di questi vantaggi, la microfluidica presenta anche alcuni inconvenienti. I flussi laminari, ad esempio, producono mescolamenti diffusivi relativamente lenti, che possono essere una limitazione importante in alcune applicazioni che richiedono una rapida omogeneizzazione di flusso. Le variazioni di scala, infine, possono dare ulteriori difficoltà nell'adattamento dei protocolli biologici a esperimenti condotti in microsistemi (ovvero, mezzi di coltura e concentrazioni cellulari) (ELVESYS R&D team, 2015c).

## 2.2 PDMS

Il polidimetilsilossano, chiamato anche PDMS o dimeticone, è un polimero largamente utilizzato per la fabbricazione e la prototipazione di chip microfluidici.

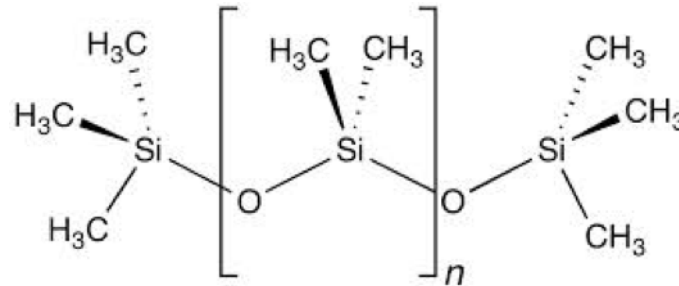
È un polimero organico-minerale (per via della struttura contenente carbonio e silicio) della famiglia dei silossani ed è utilizzato, oltre al settore microfluidico, come additivo alimentare (E900), negli shampoo e come agente antischiuma nelle bevande o in oli lubrificanti.

Nella fabbricazione di dispositivi microfluidici, il PDMS, essendo un liquido a temperatura ambiente ( $T_{fusione} = -40\text{ °C}$ ), viene mescolato con un agente re-

ticolante, versato in uno stampo microstrutturato e riscaldato per ottenere una replica elastomerica della matrice (PDMS reticolato o vulcanizzato).

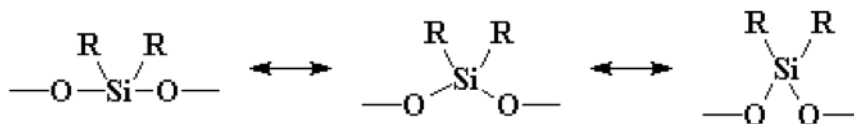
Esaminando la struttura chimica del PDMS, si possono capire quali sono i vantaggi e gli svantaggi del dimeticone nelle applicazioni microfluidiche.

Il PDMS (come raffigurato in Figura 2.3) è formato da lunghe sequenze di unità strutturali dimetilsilossaniche:  $[\text{SiO}(\text{CH}_3)_2]_n$ .



**Figura 2.3:** Struttura chimica del PDMS.

A seconda del numero di unità ripetitive ( $n$ ), il dimeticone può essere quasi liquido (basso  $n$ ) o semi-solido (alto  $n$ ). I legami silossanici lungo la catena principale rendono il polimero molto flessibile e gli conferiscono un alto grado di viscoelasticità. Questo è dovuto al fatto che i legami Si–O sono molto flessibili, permettendo all'angolo formato tra questi legami di aprirsi e chiudersi senza particolari problemi (vedi Figura 2.4).



**Figura 2.4:** Flessibilità della catena principale nel PDMS. Più è flessibile la catena principale, più il polimero si muoverà facilmente e più sarà bassa la sua temperatura di transizione vetrosa ( $T_g = -127\text{ °C!}$ ).

Un problema che sorge dopo la reticolazione riguarda la bagnabilità del polimero. Il PDMS, infatti, una volta reticolato diventa un elastomero idrofobico.

Assicurare una buona bagnabilità del PDMS è indispensabile ai fini del trasporto diffusivo di nutrienti, poiché la formazione del gradiente di concentrazione è subordinata alla continuità del mezzo di diffusione (terreno di coltura) lungo ogni fila di pozzetti. L'interruzione dei collegamenti tra pozzetti, microcanali e canali di alimentazione, dovuta a bolle d'aria entranti nel sistema attraverso le

siringhe di alimentazione o formatesi a causa della scarsa idrofilit  del PDMS, comprometterebbe irrimediabilmente una prova di crescita.

Per ovviare a questo problema ed impedire che le gocce d'acqua assumano una forma sferica (assenza di bagnabilit ) senza spargersi lungo tutta la superficie dei microcanali interni al chip, generalmente si attua un processo di ossidazione del PDMS.

L'ossidazione del polimero avviene attraverso un trattamento al plasma che modifica la composizione chimica superficiale del PDMS, producendo gruppi silanologici idrofili (SiOH) sulla sua superficie. Questo trattamento aiuta a rendere il PDMS idrofilo per circa 30 minuti e la sua superficie resistente all'adsorbimento di sostanze idrofobiche e molecole cariche negativamente. In aggiunta, l'ossidazione al plasma permette di fissare permanentemente il PDMS ad altri tipi di materiale, come il vetro, il policarbonato, il PMMA o lo stesso PDMS (ELVESYS R&D team, 2015f); lo scopo, in questo caso,   quello di ottenere una tenuta stagna irreversibile tra i due materiali, in modo che terreno di coltura e cellule rimangano confinate all'interno dei microcanali e dei pozzetti che costituiscono il chip.

In questo lavoro di tesi, mancando un'apparecchiatura al plasma che consenta i vantaggi sopra citati (buona bagnabilit  e perfetta chiusura del chip), si   dovuto procedere con un iter differente. In particolare, si   preferito "bagnare" completamente il chip con il mezzo di coltura ( $f/2$ ) eliminando accuratamente tutte le eventuali bolle d'aria presenti nei microcanali attraverso una pipetta Gilson. Il microfotobioreattore   stato poi chiuso attraverso l'applicazione di un ulteriore layer di PDMS che ha permesso di rimuovere il terreno in eccesso. Una volta chiuso, il chip (+ layer)   stato sigillato all'interno di un'unit  di chiusura necessaria alla tenuta idraulica.

Il PDMS   scelto come materiale per fabbricare chip microfluidici principalmente per questi motivi (ELVESYS R&D team, 2015g):

-   **trasparente** a frequenze ottiche (240 nm – 1100 nm), facilitando l'osservazione di ci  che   contenuto nel chip sia visivamente che attraverso un microscopio.
-   considerato un materiale **biocompatibile**.
- Ha una bassa **autofluorescenza**.
-   **economico**.
-   **facile da plasmare**, perch , anche dopo essere stato mescolato con l'agente reticolante, rimane liquido a temperatura ambiente per molte ore.

Può inoltre essere usato per modellare strutture ad alte risoluzioni (anche di pochi nanometri utilizzando PDMS modificato).

- Può essere **legato saldamente al vetro o ad un altro layer di PDMS** con un semplice trattamento al plasma in modo da formare un dispositivo microfluidico sigillato.
- È **permeabile ai gas**. Questo consente l'apporto di CO<sub>2</sub> per la crescita cellulare delle microalghe.

Il PDMS utilizzato in questa tesi è il Sylgard 184 (Dow Corning).

## 2.3 Fabbricazione del chip e del layer

La fabbricazione del chip è ottenuta attraverso una colata di PDMS in un master rigido (simil-ABS) che costituisce il negativo del prodotto finale richiesto.

Il master utilizzato per la costruzione del layer è costituito da due semplici lastre in policarbonato (una tal quale e una riquadrata), ciascuna di altezza 2 mm, adese l'una all'altra da un sottilissimo strato di colla (il layer è ottenuto dalla colata all'interno della cavità formata dalle due lastre).

Il master per il chip, progettato specificatamente per studiare la crescita microalgale in flusso continuo di nutrienti, è stato invece realizzato attraverso una tecnica chiamata **stereolitografia**.

La stereolitografia (SL) è un processo di fabbricazione additiva che concentra un fascio laser ultravioletto sulla superficie di una resina liquida termoindurente, solidificando la parte colpita. Il processo prosegue con la solidificazione degli strati successivi, creando sottili sezioni bidimensionali trasversali fino alla realizzazione di complessi pezzi tridimensionali. I punti di forza della stereolitografia sono costituiti dall'ampia gamma di materiali offerti, dall'estrema capacità di definizione del dettaglio (fino a 50 micron) e da una finitura di superficie perfettamente levigata. Questa tecnica si addice particolarmente alla realizzazione di pezzi molto piccoli e geometrie complesse durante le fasi preliminari della prototipazione (Proto Labs, 2016).

Il prodotto commerciale utilizzato nella costruzione del chip e del layer (Sylgard 184) è costituito da 2 componenti: il PDMS lineare (base) e l'agente reticolante.

Le due parti sono state mescolate in proporzione ponderale base : reticolante = 10:1. Questo rapporto comporta differenze nelle proprietà fisiche dei prodotti reticolati (un rapporto di 5:1 ad esempio comporta una maggiore rigidità

dell'elastomero), mentre la reazione di reticolazione rimane sempre dello stesso tipo.

Per ottenere la gomma siliconica è necessario che entrambe le parti siano ben mescolate insieme, al fine di evitare zone non reticolate.

Poiché la miscela è viscosa il mescolamento provoca l'inglobamento di bolle d'aria, se non è fatto sotto vuoto. Per questo motivo, una volta terminato il processo di mescolamento, si degasa la miscela all'interno di un cristallizzatore collegato ad una pompa da vuoto per laboratorio.

Disaerare la miscela sotto vuoto comporta un grande dispendio di tempo, pertanto è necessario che il tempo di lavorabilità non sia troppo breve. Il prodotto, infatti, è lavorabile (mescolabile, deformabile plasticamente) per alcune ore, prima che la reticolazione sia completa. Il tempo di vulcanizzazione a temperatura ambiente è di circa 24 ore.

Una volta degassata, la miscela è colata all'interno dei due master da cui si ottengono chip e layer (vedi Figura 2.5). Se la miscela, una volta colata negli stampi, dovesse ancora presentare delle bolle d'aria, allora è necessario ripetere l'operazione di degasaggio. Per livellare la colata, sono stati posti due sottili fogli di acetato sopra ciascun master poi pressati con una peso rigido e piano.

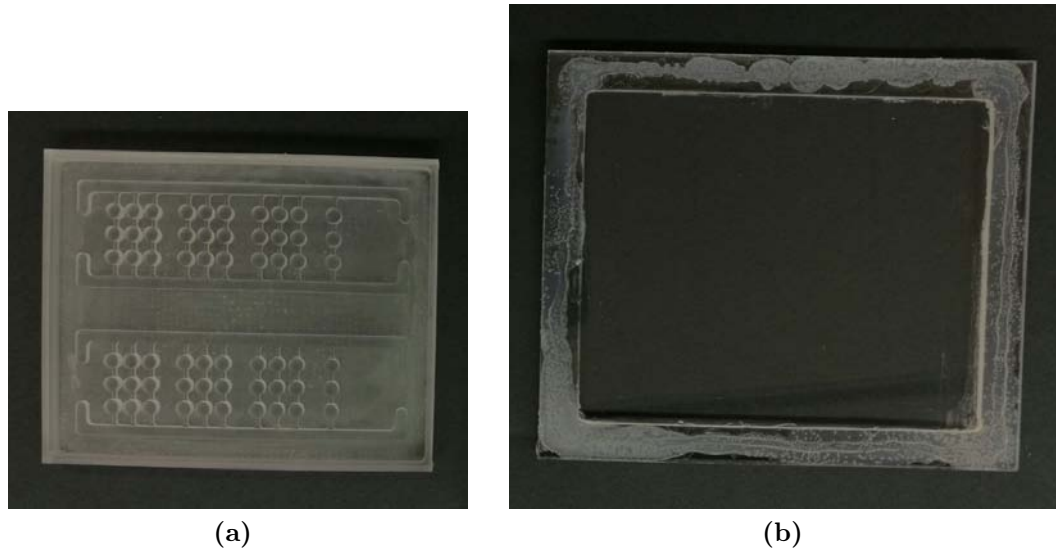
Successivamente gli stampi sono stati inseriti all'interno di un piccolo forno termostato ad una temperatura di 50 °C per un periodo di circa 6 ore, tempo necessario per la completa reticolazione. Il tempo di vulcanizzazione può essere notevolmente ridotto aumentando la temperatura ben al di sopra dei 50 °C; tale limitazione, tuttavia, è imposta dalla temperatura di transizione vetrosa del materiale costituente il master ( $T_g = 56$  °C).

Una volta reticolati, chip e layer vengono estratti dai rispettivi stampi e puliti da polvere ed eventuali altri residui superficiali. Per consentire l'iniezione della soluzione nutritiva nei futuri esperimenti, gli ingressi e le uscite del layer sono punzonati con un perforatore da biopsia dello stesso diametro dei tubi Tygon<sup>®</sup> di connessione (1.5 mm).

Chip e layer vengono infine avvolti e chiusi all'interno di un foglio d'alluminio e sottoposti ad un ciclo di sterilizzazione in autoclave. I tubi Tygon<sup>®</sup>, connessi a degli aghi d'erogazione (o adattatori siringa-tubo), vengono invece posti all'interno di un barattolo di vetro prima di procedere anche in questo caso alla sterilizzazione in autoclave.

L'autoclave permette di sterilizzare attrezzature e prodotti sottoponendoli ad alta pressione di vapore saturo a 121 °C (e 2 atm) per circa 15–20 minuti a seconda della dimensione del carico e il contenuto. Completato il ciclo di sterilizzazione

chip e layer vengono inseriti in stufa per rimuovere l'eventuale acqua condensata sulla superficie dell'alluminio durante la fase di raffreddamento in autoclave.



**Figura 2.5:** Foto degli stampi utilizzati per creare chip (a) e layer (b).

## 2.4 Pompa a siringa

Le pompe a siringa sono largamente utilizzate in applicazioni su micro scala data la loro semplicità d'uso e la capacità di consentire l'installazione rapida di esperimenti microfluidici. I due principali problemi delle pompe a siringa convenzionali nella microfluidica riguardano i lunghi tempi di assestamento quando si imposta una nuova portata e le oscillazioni di flusso alle basse portate ( $<0.1 \mu\text{l}/\text{min}$ ) causate dai passi del motore.

In una pompa a siringa, solo la parte meccanica del dispositivo è responsabile di tali oscillazioni di portata e pulsazioni di pressione. Per spostare il pistone della siringa, un motore elettrico pone in movimento una vite senza fine, su cui è fissato il carrello pistone. A basse portate, il funzionamento del motore elettrico passo-passo è percepibile perché il pistone della pompa siringa deve muoversi molto lentamente per erogare la portata richiesta (ELVESYS R&D team, 2015a).

L'ausilio di pompe a siringa ad alta precisione come l'Harvard Apparatus PHD ULTRA<sup>TM</sup>, utilizzata in questo lavoro di tesi, permette di risolvere questo problema. Essa è in grado di non generare oscillazioni di flusso visibili anche alle basse portate (picolitri/min).

L'Harvard Apparatus PHD ULTRA™ può raggiungere una portata minima di 1.5 pl/min utilizzando una siringa da 0.5 µl. La precisione di questa pompa è dello 0.25% con una riproducibilità di  $\pm 0.05\%$ .

Per ottenere le prestazioni richieste in ambito microfluidico, la PHD ULTRA™ utilizza un motore passo-passo, controllato da un microprocessore, che aziona una vite di comando (lead screw) e un dispositivo di spinta (pusher block, vedi Figura 2.6).



**Figura 2.6:** Vista frontale della PHD ULTRA™ con evidenziati i componenti e i controlli importanti. *Fonte: PHD ULTRA™ Syringe Pump Series User's Guide.*

Tecniche avanzate a micropassi sono impiegate per ridurre ulteriormente l'angolo di fase ed eliminare le pulsazioni di flusso. Questa pompa a siringa è in grado di produrre fino a 12 800 µpassi per ciascun giro completo della vite di comando.

La pompa permette inoltre la sincronizzazione con altri strumenti, come il microscopio o la fotocamera. Questa funzione è molto utile quando più esperimenti microfluidici richiedono l'utilizzo di più strumenti in contemporaneo.

Quando si cambiano le portate usando una pompa a siringa in un microsistema, il tempo di assestamento necessario per raggiungere il 95% della portata desiderata può variare da pochi centesimi di millisecondo a diverse ore. Il motivo principale di ciò riguarda l'alta capacità fluidica (elasticità del sistema fluidico, conformità dei tubi) e le piccole portate che caratterizzano un microsistema.

Il tempo di assestamento della portata aumenta linearmente con:

1. La resistenza fluidica (ovvero la pressione);
2. La capacità fluidica del sistema.

È importante quindi eliminare le cause di questi problemi: polvere e bolle d'aria presenti nel sistema o entranti attraverso le siringhe.

## 2.5 Tecnica di monitoraggio della crescita

Impostare un metodo semplice ed affidabile senza perturbare la coltura è un concetto indispensabile per valutare *on site* la crescita microalgale.

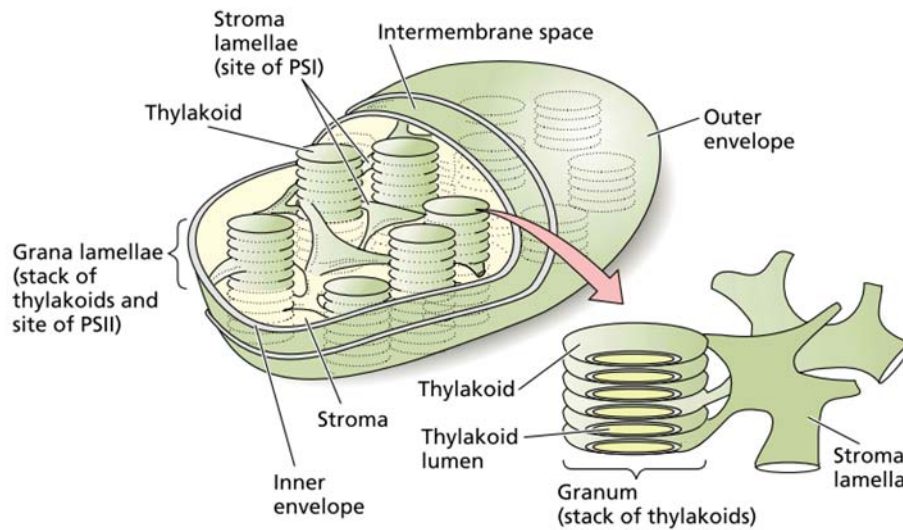
L'applicazione di tecniche classiche, quali microscopio ottico o conta cellule automatico, possono funzionare nell'analisi di sistemi di crescita tradizionali da laboratorio (p.es. beute), ma sono impraticabili per quanto riguarda l'applicazione in sistemi su microscala. L'applicazione del microscopio ottico come tecnica di monitoraggio in un microsistema, infatti, è piuttosto complicata a causa della presenza di piani focali multipli in ciascun pozzetto di 40  $\mu\text{l}$  (Perin *et al.*, 2016), mentre il conta cellule provocherebbe una perdita non trascurabile del contenuto di ciascun pozzetto, necessitando del prelievo di circa il 50% della soluzione algale inoculata.

In questo lavoro di tesi si è pertanto proceduto monitorando quantitativamente la crescita attraverso la valutazione *in vivo* della fluorescenza clorofilliana (*Chl*). L'idea è dunque quella di utilizzare la fluorescenza della clorofilla come stima della concentrazione cellulare: monitorando l'incremento nel contenuto di clorofilla del campione sarà poi possibile ricavare attraverso una retta di taratura la concentrazione cellulare del campione stesso.

### 2.5.1 La fotosintesi nelle microalghe

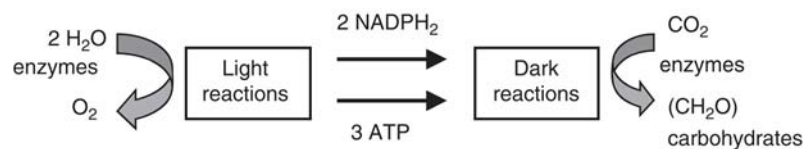
La fotosintesi rappresenta un processo unico di conversione dell'energia solare. In questo processo, i composti inorganici e l'energia luminosa sono convertiti in materia organica dagli organismi fotoautotrofi (tra cui figurano le microalghe). L'apparato fotosintetico degli organismi autotrofi eucarioti è organizzato in speciali organelli, i cloroplasti (vedi Figura 2.7), che contengono strati alterni di membrane lipoproteiche (**tilacoidi**) e fasi acquose (**stroma**). Tutta la clorofilla è contenuta all'interno di questo sistema di membrane tilacoidali, che è la sede delle reazioni luminose della fotosintesi. Le membrane tilacoidali contengono inoltre cinque importanti complessi: le antenne per la raccolta della luce, il fotosistema II (PS II) e il fotosistema I (PS I) (entrambi contenenti un centro di reazione), il citocromo  $b_6/f$  e l'ATP sintasi, che mantengono il trasporto degli elettroni fotosintetici e la fosforilazione. Le reazioni di riduzione del carbonio, che sono catalizzate da enzimi idrosolubili, avvengono nello stroma, la regione del cloroplasto che circonda i tilacoidi.





**Figura 2.7:** Disegno schematico dell'organizzazione generale delle membrane nel cloroplasto. *Fonte: Taiz e Zeiger (2010).*

La fotosintesi ossigenica può essere espressa come una reazione redox guidata dall'energia luminosa (catturata dalle molecole di clorofilla), in cui il diossido di carbonio e l'acqua sono convertite in carboidrati e ossigeno. La conversione è tradizionalmente suddivisa in due stadi: le *reazioni alla luce* e la *reazione al buio* (vedi Figura 2.8). Nelle fase luminosa (che si svolge nelle membrane tilacoidali), l'energia della luce è convertita in energia chimica fornendo un riducente biochimico (il  $\text{NADPH}_2$ ) e un composto ad alta energia, l'ATP. Nella fase al buio, che ha luogo nello stroma, il  $\text{NADPH}_2$  e l'ATP sono utilizzati nella sequenza biochimica di riduzione dell'anidride carbonica in carboidrati (Masojídek *et al.*, 2004).



**Figura 2.8:** Principali prodotti delle reazioni alla luce e al buio della fotosintesi. Le reazioni luminose includono l'assorbimento della luce, il trasferimento di eccitoni ed elettroni e la translocazione dei protoni con conseguente produzione di  $\text{NADPH}_2$ , ATP e  $\text{O}_2$ . Le reazioni al buio avvengono invece nello stroma. In questa fase si ha la riduzione del diossido di carbonio e la sintesi di carboidrati usando il  $\text{NADPH}_2$  e l'ATP prodotti nelle reazioni luminose. *Fonte: Masojídek et al. (2004).*

### 2.5.2 La fluorescenza clorofilliana

La misura della fluorescenza clorofilliana è diventata una delle più comuni e utili tecniche nelle ricerche sulla fotosintesi. La sua non invasività, sensibilità e la larga disponibilità di strumentazioni commerciali affidabili, la rendono una tecnica conveniente e adatta nella biotecnologia algale. La fluorescenza clorofilliana riflette direttamente la prestazione dei processi fotochimici nel PS II; il contributo del PS I, in rapporto al segnale totale, è piuttosto piccolo, pertanto negli scopi pratici è spesso trascurato.

La clorofilla appare verde ai nostri occhi poiché assorbe la luce principalmente nelle regioni blu e rossa dello spettro elettromagnetico, riflettendo così ai nostri solo la luce verde (circa 550 nm).

L'assorbimento della luce è rappresentato dall'equazione 2.1, in cui una molecola di clorofilla (*Chl*) del PS II nel suo stato energetico minore, o stato basale, assorbe un fotone (rappresentato da  $h\nu$ , in cui  $h$  è la costante di Planck =  $6.626 \times 10^{-34}$  J s e  $\nu$  è la frequenza d'onda) e passa a un livello energetico superiore o stato eccitato (*Chl\**):



Fra lo stato eccitato e lo stato basale, la distribuzione degli elettroni nella molecola è diversa (vedi Figura 2.9).

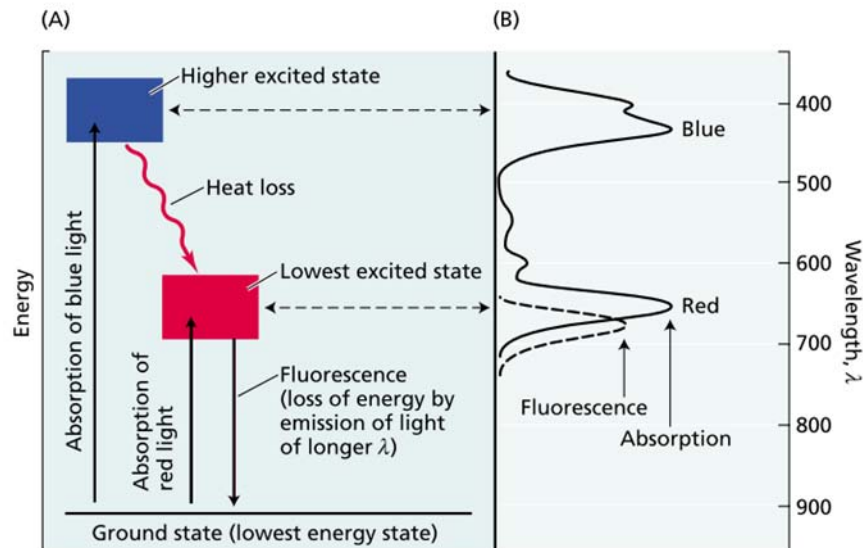
L'assorbimento della luce blu eccita la clorofilla ad uno stato energetico superiore all'assorbimento della luce rossa, poiché l'energia dei fotoni è superiore quando la loro lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) è più corta<sup>2</sup>. Nello stato di eccitazione superiore, la clorofilla è estremamente instabile e cede rapidamente un po' della sua energia all'ambiente circostante sotto forma di calore, passando così a uno stato eccitato minore, dove può essere stabile per alcuni nanosecondi ( $10^{-9}$  s). A causa dell'instabilità inerente dello stato eccitato, ogni processo volto a catturarne l'energia dovrà essere estremamente rapido (Taiz e Zeiger, 2010). Nello stato di eccitazione minore, la clorofilla eccitata ha tre vie alternative di dissipazione dell'energia disponibile (vedi Figura 2.10):

1. **Fotochimico**, in cui l'energia dello stato eccitato è trasferita al centro di reazione, permettendo così alle reazioni fotochimiche di avere luogo. Le reazioni fotochimiche della fotosintesi sono fra le più veloci reazioni chimiche. Questa estrema velocità è indispensabile affinché il processo fotochimico possa competere con le altre possibili reazioni dello stato eccitato.

---

<sup>2</sup> $E = h\nu = hc/\lambda$ , dove  $c$  è la velocità della luce =  $3 \times 10^8$  m s<sup>-1</sup>.

- La clorofilla eccitata può ritornare al suo stato basale convertendo direttamente l'energia di eccitazione in **calore**, senza l'emissione di fotoni.



**Figura 2.9:** Assorbimento ed emissione della luce da parte della clorofilla. La parte (A) rappresenta un diagramma di livello energetico. Gli spettri di assorbimento e di fluorescenza sono rappresentati nella parte (B). *Fonte: Taiz e Zeiger (2010).*

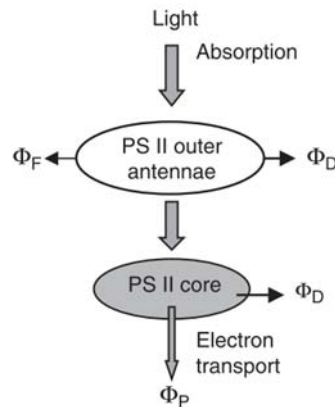
- La clorofilla eccitata può ri-emettere un fotone e quindi ritornare al suo stato basale – un processo conosciuto con il termine di **fluorescenza**. Quando agisce in questo modo, la lunghezza d'onda della fluorescenza è quasi sempre un po' più lunga di quella dell'assorbimento allo stesso stato elettronico, poiché una parte dell'energia di eccitazione è convertita in calore prima che il fotone fluorescente venga emesso. Le clorofille di solito sono fluorescenti nella regione del rosso dello spettro (vedi Figura 2.9).

La somma dell'energia entrante in questi tre processi competitivi è uguale all'energia luminosa assorbita. Ogni variazione della fotochimica o della dissipazione come calore provoca un cambiamento di fluorescenza; ciò permette di avere una conoscenza diretta del contenuto energetico del PS II.

Nella fase buio tutti i centri di reazione sono in cosiddetto stato "aperto" e la fotochimica raggiunge un valore massimo. Il valore di fluorescenza in questo stato è minimo ed è definito come  $F_0$  (o fluorescenza di fondo).

Quando il fotosistema II è esposto a forti impulsi di luce, i centri di reazione subiscono una separazione di carica e l'elettrone viene spostato al primo accettore

di elettroni ( $Q_A$ ). Una volta che  $Q_A$  viene ridotto, i centri di reazione si definiscono in stato “chiuso” e la fotochimica è transitoriamente bloccata. Poiché la resa della fotochimica è zero, le rese della dissipazione e della fluorescenza aumentano proporzionalmente. Il massimo valore di fluorescenza quando i centri di reazione sono chiusi è definita come  $F_m$  (o fluorescenza massima).



**Figura 2.10:** Rappresentazione schematica della distribuzione dell'energia luminosa assorbita nel PS II tra fotochimica ( $\Phi_P$ ), fluorescenza ( $\Phi_F$ ) e dissipazione come calore ( $\Phi_D$ ); quest'ultimo ( $\Phi_D$ ) può verificarsi nelle antenne così come nel centro di reazione.  $\Phi_P$ ,  $\Phi_F$  e  $\Phi_D$  rappresentano rispettivamente il rendimento della fotochimica, della fluorescenza e della dissipazione come calore. *Fonte: Masojídek et al. (2004).*

Dato che la resa della fluorescenza aumenta proporzionalmente al livello di chiusura del PS II, il centro di reazione aperto agisce come un “estintore” di fluorescenza. Questo fenomeno è chiamato estinzione fotochimica  $q_P$  e può essere calcolato come  $(F_m - F_t)/(F_m - F_0)$ , dove  $F_t$  è la resa della fluorescenza in stato stazionario. I valori di  $q_P$  variano da 0 a 1 e rispecchiano il livello relativo dell'ossidazione di  $Q_A$ .

La differenza tra fluorescenza massima  $F_m$  (tutto  $Q_A$  ridotto) e fluorescenza di fondo  $F_0$  (tutto  $Q_A$  ossidato) è indicata come fluorescenza variabile ( $F_v$ ). Il rapporto tra fluorescenza variabile e fluorescenza massima ( $F_v/F_m$ ) varia tra 0.65 e 0.80 nelle alghe verdi adattate al buio. Questo rapporto è frequentemente usato come stima della resa fotochimica del PS II. La resa varia significativamente, dipendendo dal regime di irradianza e dal trattamento fisiologico.

Una volta che l'apparato fotosintetico è esposto alla luce, si osserva di norma un decremento nel valore di  $F_m$ . La fluorescenza in questo caso è indicata come  $F_m^L$ . Questo fenomeno è chiamato estinzione non fotochimica e indica un aumento della dissipazione dell'energia sotto forma di calore. In teoria, l'estinzione non fotochimica è inversamente correlata alla fotochimica ed è considerata una

valvola di sicurezza atta a proteggere i centri di reazione del PS II dai danni provocati da un eccesso di luce (Masojídek *et al.*, 2004).

In Tabella 2.1 si riportano i parametri di fluorescenza sopra descritti che vengono calcolati da misurazioni di fluorescenza della clorofilla. Questi parametri sono legati sia all'efficienza con cui l'apparato fotosintetico del microrganismo riesce a sfruttare la radiazione luminosa, che alla quantità di clorofilla eccitata in grado di emettere fluorescenza. La quantità di clorofilla presente in una cellula rimane costante nel tempo se le condizioni di crescita a cui viene sottoposta si mantengono stabili, per cui monitorando l'aumento di fluorescenza del campione sarà possibile seguirne anche la crescita cellulare (Monetti, 2016).

**Tabella 2.1:** Parametri calcolati dalle misure di fluorescenza clorofilliana.  $F_0$ ,  $F_v$  e  $F_m$  rappresentano rispettivamente la fluorescenza di fondo, variabile e massima nello stato adattato al buio;  $F_0^L$ ,  $F_t$  e  $F_m^L$  rappresentano invece fluorescenza di fondo, allo stato stazionario e massima nello stato adattato alla luce. *Fonte: Masojídek et al. (2004).*

Parametri	Simboli	Formula
Resa fotochimica massima del PS II	$F_v/F_m$	$F_v/F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$
Resa fotochimica effettiva del PS II	$\Phi_{PSII}$	$\Phi_{PSII} = \frac{F_m^L - F_t}{F_m^L}$
Non-photochemical quenching	$q_N$	$q_N = 1 - \frac{F_m^L - F_0^L}{F_m - F_0}$
Photochemical quenching	$q_P$	$q_P = \frac{F_m^L - F_t}{F_m^L - F_0^L}$
Stern-Volmer coefficient of non-photochemical quenching	$NPQ$	$NPQ = \frac{F_m - F_m^L}{F_m^L}$

### 2.5.3 Fluorimetro PAM-Imaging

L'Open FluorCam FC 800-O, strumento utilizzato in questo lavoro per l'analisi d'immagine della fluorescenza, è un tipo di fluorimetro sviluppato dalla Photon Systems Instruments. È composto di una camera CCD e quattro pannelli LED fissi. I quattro pannelli a LED possono essere disposti a varie distanze e angolazioni dal campione oggetto di misura. Una coppia di pannelli a LED fornisce

la luce di misura (ML) e la luce attinica 1 (AL1 di colore rosso-arancio 617 nm). Altri due pannelli forniscono la luce attinica 2 (AL2) e gli impulsi di saturazione (di colore bianco freddo, tipicamente 6500 K).

Come tutti i fluorimetri PAM, capaci di misurare e determinare mediante specifici algoritmi i parametri fotochimici, i fluorimetri PAM-Imaging sono soprattutto in grado di elaborare le immagini di questi stessi parametri. Lo strumento costruisce l'immagine attraverso 4 fasi:

1. Cattura dell'immagine;
2. Segmentazione dell'immagine;
3. Analisi;
4. Visualizzazione.

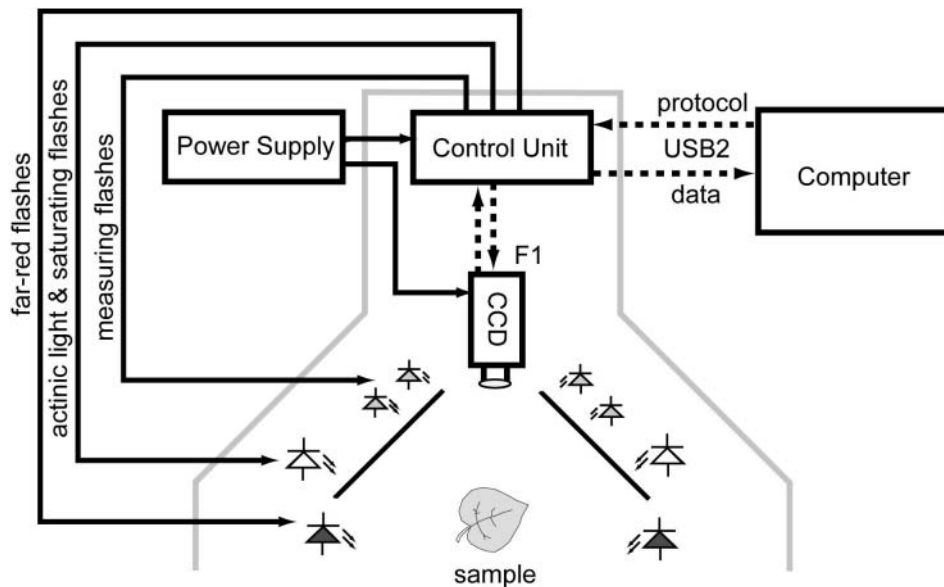
Le sorgenti di luce LED possono essere controllate con intervalli di risposta che scendono sotto il secondo e raggiungono intensità luminose che possono superare di 2 volte quella solare, anche se non possiedono lo stesso intervallo di lunghezze d'onda.

Le sorgenti di luce possono essere in alcuni casi fonte di errore nelle misurazioni in quanto, pur raggiungendo intensità elevate, non riescono a illuminare il campione in maniera omogenea, soprattutto durante l'applicazione dell'impulso luminoso.

La raccolta delle immagini di fluorescenza provenienti dal campione viene effettuata tramite l'utilizzo di camere CCD (charge-coupled device), un particolare sensore per la cattura delle immagini. Le camere CCD, dopo un passaggio della luce raccolta in un filtro che permette il passaggio della luce nel rosso e nel rosso-lontano ( $\lambda > 690$  nm), provvedono a raccogliere le immagini dinamiche di fluorescenza, a digitalizzarle (tramite un convertitore digitale, in dati di 12 o 14 bit), e a trasferirle al computer dove vengono immagazzinate.

Successivamente, grazie ad un software, le informazioni contenute nei dati vengono elaborate per costruire segmenti di immagine. Tali operazioni vengono eseguite in tempo reale e permettono la visualizzazione su monitor sia dell'andamento dei vari parametri (in grafici fluorescenza vs. tempo), che la resa di immagini istante per istante degli stessi. Nelle immagini elaborate dalle strumentazioni più recenti la visualizzazione su monitor della variazione del valore dei parametri viene affidata ad una scala colorimetrica nella quale ad ogni colore o sfumatura di questo corrisponde un determinato valore (Sighicelli, 2010).

In Figura 2.11 sono riportati lo schema di funzionamento del FluorCam ed una foto dell'intero sistema di misura.



(a) Schema FluorCam.



(b) Foto FluorCam.

**Figura 2.11:** Rappresentazione schematica del funzionamento del FluorCam e foto dell'Open FluorCam FC 800-O. Fonte: PSI (2009) e <http://psi.cz>

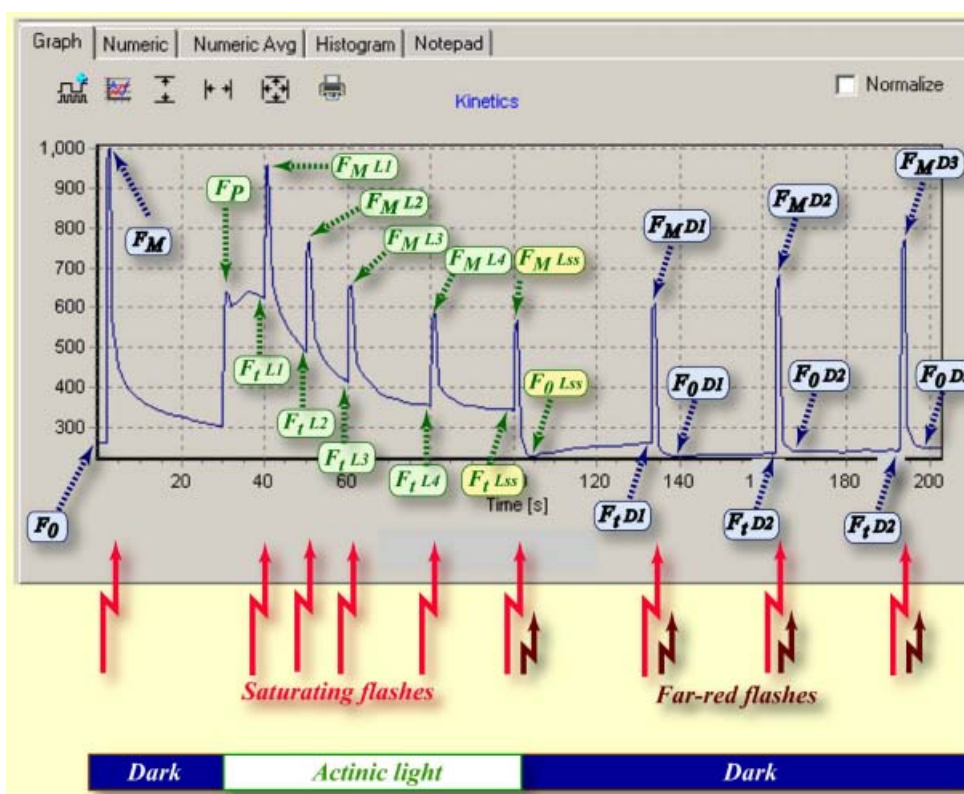
## 2.5.4 Protocollo per la misura di fluorescenza

L'effetto Kautsky rappresenta le complesse dinamiche di emissione di fluorescenza della clorofilla e le rese fotochimiche delle piante durante la transizione da uno stato adattato al buio ad uno adattato alla luce. Le transizioni degli stati buio-luce possono essere studiate in dettaglio con la tecnica ad ampiezza di impulsi modulati (Pulse Amplitude Modulated o PAM).

Al fine di avere dati affidabili sull'efficienza fotosintetica delle microalghe, è necessario essere in grado di distinguere i contributi dell'estinzione fotochimica e non fotochimica.

Con questo approccio, le microalghe vengono sottoposte a un flash di luce di breve durata e di alta intensità, il cui effetto è quello di chiudere temporaneamente tutti i centri di reazione del PS II. Il flash saturante è talmente breve da non influire significativamente sulla fotosintesi. Durante il flash, la fluorescenza raggiunge una fluorescenza massima ( $F_m$ ), il cui valore è equivalente a quello che si potrebbe ottenere in assenza di estinzione fotochimica. Il confronto di questo valore con  $F_t$  e con il valore di fluorescenza in assenza di luce attinica ( $F_0$ ) fornisce informazioni sull'efficienza dell'estinzione fotochimica e sull'efficienza del PS II.

La resa di fluorescenza nel tempo viene rappresentata graficamente nella curva di induzione buio-luce della fluorescenza (Figura 2.12), ottenuta con la tecnica nota come Pulse Amplitude Modulated (PAM), i cui parametri sono misurati mediante l'uso di fluorimetri ad ampiezza di impulso modulato, sviluppati per la prima volta da Schreiber nel 1986.



**Figura 2.12:** Finestra di FluorCam che mostra il risultato di una curva di induzione misurata con PAM. Fonte: PSI (2009).

Dopo un periodo di buio di circa 20 minuti, sufficiente ad aprire i centri di reazione del PS II, si attiva una luce di misura (ML) a bassa intensità, che non è in grado di attivare il processo fotochimico, per cui  $q_P = 1$  e  $q_N = 0$ . In tali condizioni è possibile misurare  $F_0$ , fluorescenza dello stato di riferimento



adattato al buio. L'applicazione di un impulso saturante (SP) chiude tutti i centri di reazione del PS II ed è possibile misurare  $F_m$ , essendo nullo il contributo dei quenching ( $q_P = 0$  e  $q_N = 0$ ). Dopo che la fluorescenza è tornata al valore di  $F_0$ , viene attivata la luce attinica (AL) e si osserva nuovo aumento di fluorescenza che dopo un certo periodo di tempo diminuisce. In questo periodo di luce, ad intervalli appropriati, si applicano altri flash di luce saturante (SP). Da ognuno di questi, può essere misurato un valore di  $F_m^L$  (fluorescenza massima alla luce). L'impulso saturante, chiudendo tutti i centri di reazione del PS II, annulla il contributo di  $q_P$  e permette di misurare quello di  $q_N$ . L'analisi si conclude con un periodo di rilassamento al buio in cui viene spenta la luce attinica e si applicano impulsi di luce nel rosso-lontano (far-red) per indagare la cinetica di rilassamento della fluorescenza (Sighicelli, 2010).

Per concludere, vengono di seguito forniti i valori relativi alle impostazioni della camera e delle luci usate nelle analisi al FluorCam software:

Shutter = 2;

Sensitivity = 50.5;

Act1 = 0;

Act2 = 22;

Super = 70;

La linea **Shutter** = 2 determina la durata dell'intervallo durante il quale l'otturatore elettronico è aperto quando si effettuano le misure. Le impostazioni dell'otturatore elettronico sono numerate e la durata effettiva del tempo di apertura dell'otturatore corrispondente al valore 2 è pari a 33.3  $\mu$ s.

La sensibilità di rilevazione è definita dalla linea **Sensitivity** = 50.5. La scala di sensibilità è lineare e relativa (0–100%): 0% significa minima sensibilità mentre 100% massima sensibilità.

Le linee **Act1** = 0, **Act2** = 22 e **Super** = 70 rappresentano rispettivamente la potenza luminosa della luce attinica 1, della luce attinica 2 e del flash saturante. Anche in questo caso le scale sono lineari e relative rispetto alla massima intensità della rispettiva lampada (PSI, 2009).

## 2.6 Protocollo di taratura

Nel protocollo di taratura si è inoculato l'intero chip partendo da cellule già acclimatate alla specifica intensità luminosa (6, 60 o 360  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Le microalghe da inoculare sono state prelevate da beute sottoposte a condizioni di irradiazione differente. Il mantenimento della coltura all'interno della beuta è

stato garantito attraverso un continuo rinnovo (ogni 3 o 5 giorni a seconda dell'intensità luminosa) necessario a mantenere le microalghe nella fase di crescita esponenziale. Il mantenimento richiede la sostituzione di una parte della soluzione algale (circa metà volume) con altrettanto terreno fresco.

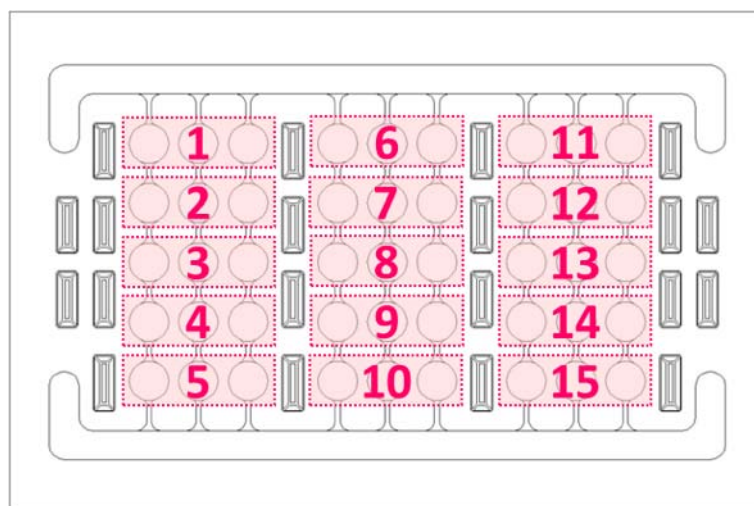
Le fasi di inoculo possono essere così riassunte:

1. Conta cellulare, attraverso Cellometer Auto X4 (*Nexcelom*), di un'aliquota di soluzione algale prelevata dalla beuta di crescita. Questo consente di conoscere la concentrazione microalgale di partenza.
2. Scelto il numero totale di cellule da inoculare nel chip (le stesse utilizzate da Monetti (2016)), si procede al calcolo del volume da prelevare per raggiungere lo specifico valore di cellule richiesto (calcolo inteso come rapporto tra numero totale di cellule e concentrazione stimata dal conta cellule automatico).
3. Il volume prelevato viene quindi posto all'interno di una eppendorf e centrifugato per eliminarne il surnatante (costituito dal solo terreno di coltura). Le impostazioni della centrifuga sono:
  - Velocità di rotazione =  $3.5g$  (ossia 3 volte e mezzo la forza di gravità);
  - Tempo di centrifugazione = 9 min.
4. Le microalghe vengono poi risospese con una quantità di terreno fresco atta a coprire l'intero volume dei pozzetti costituenti il chip. In questo caso il volume aggiunto dovrà essere inferiore rispetto a quello eliminato nel punto 3 per poter ottenere una soluzione più concentrata (soluzione madre).
5. I valori di concentrazione da inoculare saranno quindi ottenuti diluendo nel chip la soluzione madre con il giusto apporto di ulteriore terreno fresco di coltura, fino al riempimento completo di ciascun pozzetto da 40  $\mu\text{l}$ .
6. Una volta inoculato, il chip è stato sigillato all'interno dell'unità di chiusura e posto sotto irraggiamento per circa un giorno, tempo necessario affinché le microalghe possano sedimentare sul fondo dei pozzetti (non essendoci mescolamento all'interno dei pozzetti tutte le analisi vengono condotte in "sedimentato").
7. Dopo la sedimentazione, il chip è sottoposto ad analisi di fluorescenza e conta cellulare. I valori ottenuti dalle due analisi sono poi elaborati in un

grafico concentrazione vs. fluorescenza massima attraverso cui si ricava la retta di taratura (si è preferito lavorare con i valori di  $F_m$  poiché il segnale di fluorescenza è nettamente superiore rispetto ai valori di  $F_0$ ).

Lo schema di inoculo per la taratura è rappresentato in Figura 2.13. In base al numero di pozzetti totale (45) e al numero di repliche sperimentali (3), è stato possibile ottenere 15 punti a differente concentrazione (per i valori specifici si rimanda a Monetti (2016, p. 66)).

A causa di un problema legato alla scarsa rilevazione del segnale di fluorescenza da parte della CCD-camera, non è stato possibile ottenere la correlazione concentrazione vs.  $F_m$  con la nuova unità chiusura in policarbonato. Per questo motivo e per completezza sperimentale, in questa tesi saranno applicate ai dati di crescita le prime rette di taratura ottenute con il primo chip e l'unità di chiusura in lamiera.



**Figura 2.13:** Schema della configurazione di inoculo per la taratura contenente 15 differenti concentrazioni. Il valore di ciascuna concentrazione è calcolato dalla media di 3 repliche.

## 2.7 Protocollo di crescita

Il protocollo di crescita in flusso continuo di nutrienti rimane invariato rispetto a quello utilizzato per la taratura fino al punto 4. Gli step successivi differiscono come segue:

1. I valori di concentrazione da inoculare, per il momento, saranno ottenuti diluendo nel chip la soluzione madre con il giusto apporto di ulteriore ter-

reno fresco di coltura, fino a riempire poco più della metà del volume di ciascun pozzetto (circa 30  $\mu\text{l}$ ).

2. Una volta inoculato, il chip è stato sigillato all'interno dell'unità di chiusura e posto sotto irraggiamento per circa un giorno, tempo necessario affinché le microalghe possano sedimentare sul fondo dei pozzetti.
3. Dopo la sedimentazione, il chip viene riaperto e completamente sommerso da terreno di coltura (in questo caso si riempiono anche i microcanali e i canali di alimentazione). Durante questa procedura è molto importante evitare la formazione di bolle d'aria che comprometterebbero la formazione del gradiente.
4. Il chip viene quindi chiuso rimuovendo l'eccesso di terreno.
5. Vengono poi preparate due siringhe contenenti circa 40 ml di terreno di coltura, le quali costituiranno la fonte continua di alimentazione delle microalghe. Una siringa conterrà una concentrazione arricchita del nutriente oggetto di studio, mentre l'altra ne conterrà una impoverita (in questo caso si parla di concentrazione di  $\text{NO}_3^-$ ). Ciò permetterà di creare all'interno di ciascuna fila di pozzetti un gradiente di concentrazione di nitrati con cui sarà possibile valutare l'influenza che essi hanno sulla crescita microalgale. Anche in questo caso, sebbene non sia possibile eliminare completamente le bolle d'aria presenti all'interno delle siringhe, è necessario cercare di ridurre la quantità per evitare che possano entrare nel sistema e bloccare il flusso continuo di nutrienti.
6. Una volta preparate, le due siringhe vengono collegate ad altrettanti tubi Tygon<sup>®</sup> del diametro esterno 1.5 mm che andranno ad inserirsi all'interno dei fori di alimentazione del chip. I due fori in uscita del chip saranno invece collegati (sempre tramite altrettanti tubi Tygon<sup>®</sup>) ad altre due siringhe parzialmente riempite d'acqua<sup>3</sup> (circa 4 mL) che lavorano in aspirazione e che sono alloggiato sul rack porta siringhe della pompa, dal lato opposto rispetto a quelle di alimentazione (pusher block). Questo accorgimento consente di equalizzare le pressioni all'interno dei due canali di alimentazione del chip.
7. Viene quindi impostata sulla pompa una portata pari a 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; ciò permette di mantenere le stesse siringhe per l'intero ciclo di crescita delle

---

<sup>3</sup>Il riempimento di queste siringhe con poco volume d'acqua facilita il processo di aspirazione (lo spostamento del pistone all'interno della siringa).

microalghe (circa 5 giorni), evitando così di perturbare ulteriormente il sistema.

8. Da questo punto in poi, il chip verrà sottoposto, per l'intero arco di crescita microalgale, a due analisi di fluorescenza giornaliere (una al mattino e una nel tardo pomeriggio). Una volta elaborate le immagini, sarà possibile ricavarne il profilo di crescita nel tempo.

## 2.8 Protocollo per la prova fluidodinamica

Il protocollo utilizzato per il test con tracciante è sostanzialmente identico a quello della crescita. Le uniche differenze riguardano la mancanza dell'inoculo microalgale e la sostituzione del contenuto delle siringhe di alimentazione, riempite, in questo caso, di una soluzione contenente il terreno base e poche centinaia di microlitri di colorante alimentare.

## 2.9 Misura della temperatura

Al fine di verificare che la temperatura del sistema rientri all'interno del range ottimale di crescita, si è deciso di monitorarla attraverso uno strumento di misura in grado di darne una lettura rapida e precisa.

Nella misura di temperatura elettrica industriale vengono impiegati comunemente due gruppi di sensori:

- Termoresistenze (RTD)
- Termocoppie (TC)

Entrambi i tipi di sensore hanno i loro vantaggi e svantaggi.

Le termoresistenze *Pt100*, comunemente usate, sono adatte soprattutto per le misure nel campo di temperatura medio-basso (-200...+600 °C). Le termocoppie (a parte alcune eccezioni) hanno i loro vantaggi alle alte temperature (fino a 1700 °C). Alcune termocoppie possono misurare anche temperature più elevate (tungsteno-renio, oro-platino o platino-palladio).

In generale, le termocoppie reagiscono più velocemente rispetto alle termoresistenze. Inoltre, i piccoli diametri di una termocoppia rivestita (0.25, 0.5 o 1 mm) consentono tempi di risposta incredibilmente rapidi (WIKA Alexander Wiegand SE & Co, 2016). Sebbene le termoresistenze offrano nel campo di misura di nostro interesse un grado di precisione superiore, le termocoppie di piccolo diametro sono

l'ideale nei casi che richiedono precisione nella misura della temperatura, grazie al loro tempo di risposta, dimensione, ingombro e solidità. Le applicazioni possono andare dall'attività di laboratorio a casi in cui i cambiamenti di temperatura sono rapidi e richiedono un sensore in grado di recepire variazioni repentine. Inoltre, possono essere leggermente piegate per adattarle a specifiche applicazioni senza modificarne le prestazioni (TC Direct, 2016).

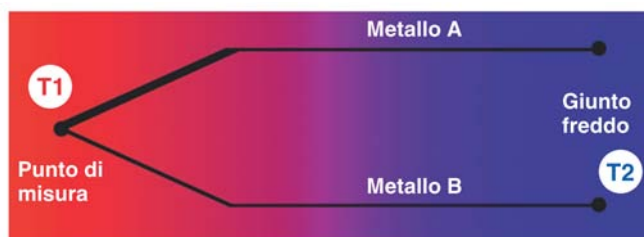
In virtù di questi vantaggi e soprattutto considerando l'economicità di una termocoppia di piccolo diametro rispetto ad una *Pt100* (di piccolo diametro), si è optato di utilizzare in questo lavoro una termocoppia di tipo T (diametro 0.5 mm  $\times$  lunghezza 150 mm, TC Direct) connessa ad un indicatore portatile di temperatura (TC Direct). È importante utilizzare una termocoppia del minor diametro possibile considerando la ridotta dimensione del sistema (diametro di ciascun pozzetto = 4 mm).

La termocoppia di tipo T (Rame (Cu)/Costantana (Cu-Ni)) offre, in particolare, il più alto grado di precisione rispetto alle altre tipologie di termocoppie presenti sul mercato (nel nostro caso  $\pm 1$  °C, classe 2).

### 2.9.1 Funzionamento di una termocoppia

Una termocoppia è costituita da una coppia di conduttori elettrici di diverso materiale uniti tra loro in un punto. Questa giunzione è convenzionalmente chiamata giunto caldo ed è il punto nel quale viene applicata la temperatura da misurare.

L'altra estremità, costituita dalle estremità libere dei due conduttori, è convenzionalmente chiamata giunto freddo (vedi Figura 2.14).



**Figura 2.14:** Rappresentazione schematica di una termocoppia.  
*Fonte: WIKA Alexander Wiegand SE & Co (2016).*

Quando esiste una gradiente di temperatura tra la zona del giunto caldo e la zona del giunto freddo, si può rilevare una differenza di potenziale elettrico (f.e.m.) tra le estremità libere della termocoppia in corrispondenza del giunto

freddo (effetto Seebeck). Tale tensione viene prodotta a causa della diversa densità elettronica dei due conduttori metallici, in combinazione con la differenza di temperatura tra il punto di misura e il giunto freddo. Il valore di potenziale elettrico è funzione diretta della differenza di temperatura, secondo una legge non lineare.

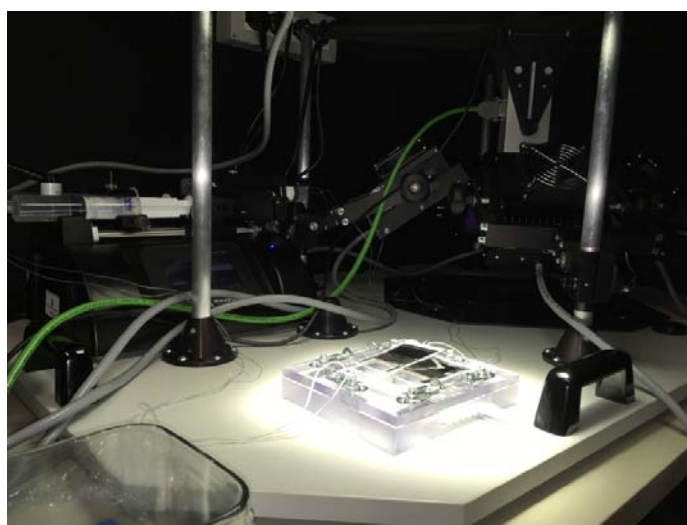
Una termocoppia dunque non misura la temperatura assoluta ma la differenza di temperatura tra il punto di misura e il punto freddo.

Per ottenere il valore di temperatura assoluta del punto di misura, viene usata la cosiddetta “compensazione del giunto freddo”. In passato, ciò veniva ottenuto immergendo il giunto freddo della termocoppia in un bagno di ghiaccio. Negli strumenti attuali, dotati di ingresso per termocoppia (p.es. strumenti di misura portatili), viene inclusa nel circuito dello strumento una compensazione elettronica del giunto freddo (WIKA Alexander Wiegand SE & Co, 2016).

Per concludere il capitolo, si mostra in Figura 2.15 l'intero apparato strumentale utilizzato.



(a)



(b)



(c)

**Figura 2.15:** Foto dell'apparato strumentale (a) e (b) e del misuratore di temperatura connesso al dispositivo di crescita (c).



# Capitolo 3

## Progettazione del sistema di coltura

Nel capitolo si discuterà dell'aspetto progettuale del sistema di coltura, descrivendo i progressi tecnici che hanno consentito di ottenerne una versione finale in grado di soddisfare, dal punto di vista sperimentale, gli obiettivi posti in tesi.

### 3.1 Prototipi iniziali

Il sistema sperimentale da cui si è partiti per valutare la crescita di *Nannochloropsis gaditana* in flusso continuo di nutrienti è costituito da un microfotobioreattore (o chip) in PDMS, chiuso attraverso la sovrapposizione di un ulteriore strato (o layer) di PDMS elastomerico, atto a mantenerne la sterilità interna ed evitare l'evaporazione del terreno di coltura<sup>1</sup>. Il sistema si compone inoltre di un'unità di chiusura del chip realizzata in lamiera necessaria a risolvere le problematiche di tenuta idraulica (vedi Figura 3.1).

Scopo del sistema, costituito da chip, layer e unità di chiusura, è quello di creare velocemente un gradiente di concentrazione delle specie chimiche di cui si vuole studiarne l'effetto sulla crescita (p.es.  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{PO}_4^{3-}$ ). È importante che la formazione del gradiente non sia lo step limitante, altrimenti il ciclo di crescita si completerebbe prima di aver ottenuto concentrazioni stabili nel tempo e l'analisi non avrebbe più senso (il tempo richiesto per raggiungere lo stato stazionario (S.S.) deve essere nettamente inferiore rispetto ad un ciclo di crescita).

Il chip (vedi Figura 3.2) è formato da due canali di alimentazione e 45 pozzetti (o camere di crescita), ciascuno di 40  $\mu\text{l}$  di volume. Sono presenti 3 sezioni, ciascuna delle quali è composta da 3 file di 5 pozzetti comunicanti tra loro e con i canali di alimentazione tramite 6 microcanali a sezione rettangolare ( $W \times H =$

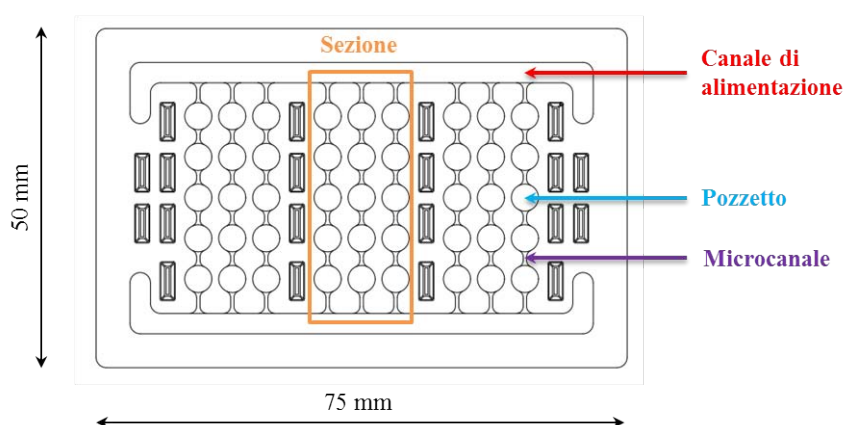
---

<sup>1</sup>Evaporazione causata dai bassi volumi in gioco all'interno di un microsistema e dai lunghi tempi di esposizione all'ambiente esterno nell'arco di un ciclo di crescita (circa 5 giorni).

0.5×0.1 mm). È lungo queste file che può formarsi un gradiente di concentrazione per effetto della sola diffusione molecolare (si avranno quindi 9 repliche di 5 differenti concentrazioni).



**Figura 3.1:** Foto dell'unità di chiusura in lamiera insieme al dispositivo di controllo dell'intensità luminosa, in grado di discriminare, per ciascuna delle tre sezioni che compongono il chip, un diverso valore di irradianza fotonica ( $360, 60$  e  $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).



**Figura 3.2:** Rappresentazione in AutoCAD<sup>®</sup> 2D del primo chip utilizzato.

Nell'utilizzo di questo sistema applicato ad un flusso continuo di nutrienti si sono riscontrate una serie di problematiche che sono causa di un lento processo diffusivo (ben oltre l'arco di tempo necessario al completamento di una prova di crescita) e di disomogeneità tra i gradienti chimici formati lungo le file costituenti il microfotobioreattore:

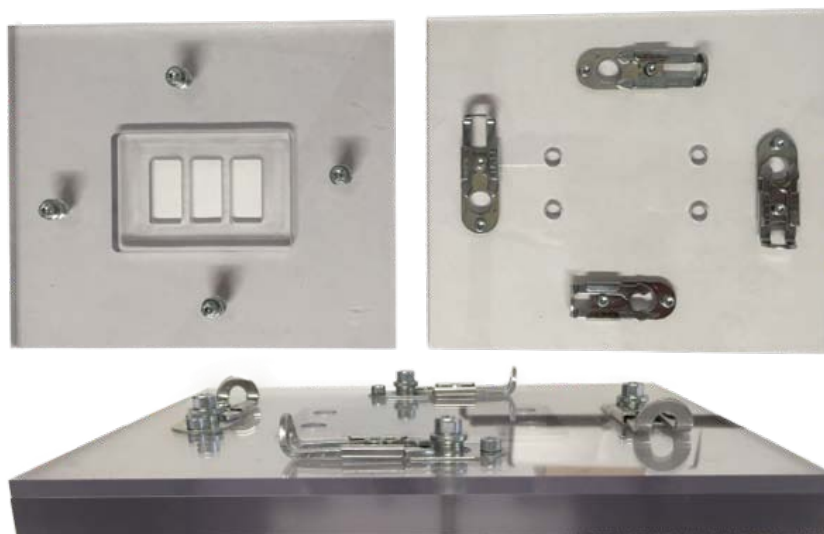
- Mancanza di planarità della lamiera;
- Sistema di avvvitamento con dadi a farfalla che impedisce di mantenere una pressione uniforme lungo tutta la superficie del chip;
- Dimensioni della sezione trasversale dei microcanali troppo ridotte (rallentano notevolmente il tempo per la completa diffusione della specie).

Per tutti questi motivi è stato riprogettato l'intero sistema (chip e unità di chiusura).

### 3.1.1 Progettazione del nuovo dispositivo

Le modifiche al chip interessano esclusivamente le dimensioni della sezione trasversale dei microcanali: la profondità e la larghezza di questi sono state ampliate ad 1 mm. Questo ha permesso di ridurre in modo significativo il tempo necessario alla formazione di un gradiente stabile, mantenendo al contempo le proprietà fisiche tipiche di un microsystema.

Per quanto riguarda l'unità di chiusura, è stato ideato un sistema di bloccaggio a slitta fissato in una camera di policarbonato. L'unità di chiusura è stata dotata nella parte superiore di 4 fori per consentire l'ingresso e l'uscita di altrettanti tubi Tygon<sup>®</sup> del diametro esterno 1.5 mm. Nella parte inferiore è stata realizzata una cavità per l'alloggiamento del chip e 3 aperture necessarie allo scambio di anidride carbonica. Il dispositivo di chiusura è rappresentato in Figura 3.3.

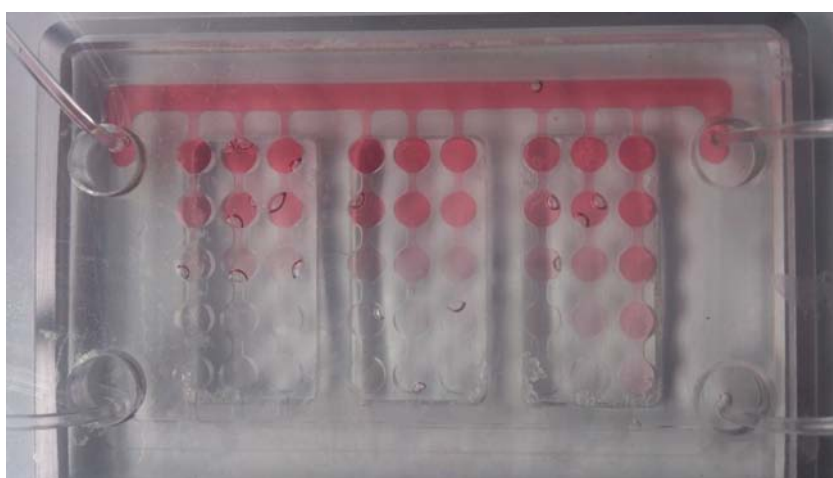


**Figura 3.3:** Foto dell'unità di chiusura in policarbonato.

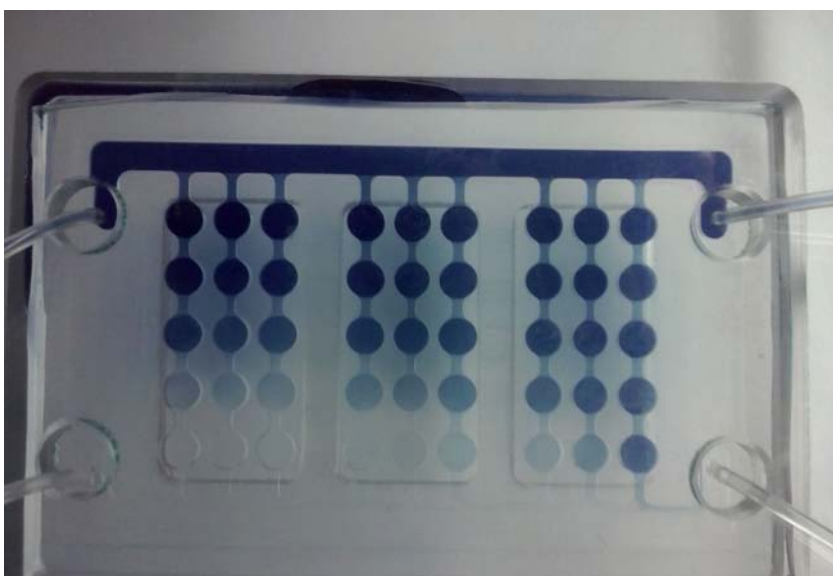
### 3.1.2 Verifica del sistema

Da test fluidodinamici condotti sperimentalmente attraverso l'utilizzo di un tracciante (colorante alimentare), si è riscontrato che i risultati migliori si ottengono collegando anche i due tubi in uscita alla pompa a siringa; ciò permette di evitare che il fluido segua percorsi preferenziali (dettati da minori perdite di carico) e accumuli di pressione interni al chip.

Questo sistema è stato studiato con lo scopo di garantire una compressione uniforme lungo tutta la superficie del chip ed ottenere un gradiente uniforme lungo tutte le 9 file di pozzetti.



(a)



(b)

**Figura 3.4:** Risultati del test con tracciante a 24 ore dall'inizio della prova.

Da prove di crescita condotte sotto lampade a fluorescenza e da prove fluidodinamiche sperimentali si sono tuttavia riscontrate altre problematiche che hanno richiesto un'ulteriore rivisitazione dell'aspetto progettuale relativo all'intero dispositivo.

Dai test con tracciante sono emerse problematiche inerenti il tempo di formazione di un gradiente di concentrazione stabile (quindi il tempo nel raggiungere lo stato stazionario) e la mancanza di omogeneità tra i gradienti chimici formatisi lungo le file di pozzetti. In questo caso, il problema risiede esclusivamente nella sezione prossima all'uscita (vedi Figura 3.4) e potrebbe essere legato a particolari fenomeni causati dall'aspirazione. Inoltre, come dimostrano le due prove condotte attraverso l'utilizzo di due diversi coloranti alimentari (Figura 3.4), dopo circa un giorno il processo di formazione del gradiente non ha ancora raggiunto lo stato stazionario. Per poter studiare l'effetto che la diversa concentrazione di nitrati ha sulla crescita, è necessario che il processo diffusivo che consente la realizzazione del gradiente non sia lo step limitante.

Dai test di crescita sono invece emerse problematiche relative al controllo della temperatura.

La crescita condotta sotto lampade a fluorescenza non ha prodotto alcun risultato: le alte temperature registrate negli esperimenti (circa 34 °C), di gran lunga superiori al valore massimo tollerato dalle microalghe (28 °C), ne hanno infatti causato la rapida morte cellulare.

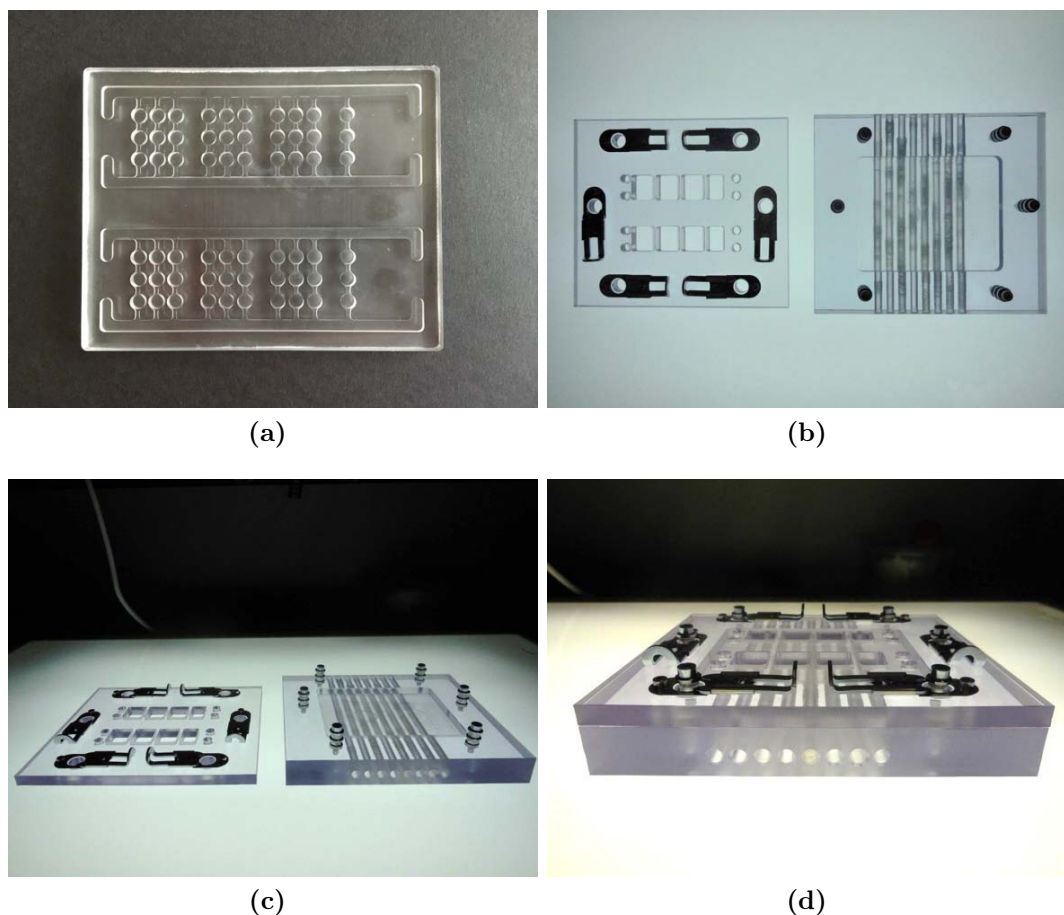
## 3.2 **Versione finale del sistema**

Per ovviare ai problemi riportati nel §3.1.2, si è riprogettato l'intero sistema con modifiche che coinvolgono sia il chip che l'unità di chiusura (vedi Figura 3.5).

### 3.2.1 **Progettazione del nuovo dispositivo**

Come si osserva dalla Figura 3.5, la dimensione del chip è stata ampliata in modo da isolare gli effetti presenti in prossimità dello sbocco (allungando il percorso in uscita dei canali di alimentazione di circa 15 mm, valore corrispondente ad una sezione) e poter condurre due prove in simultaneo (l'idea è quella di valutare la crescita sia in flusso continuo di nutrienti che in discontinuo). Il numero di pozzetti presenti in ciascuna fila è stato poi ridotto a tre per dimezzare il tempo di diffusione. Il chip è stato inoltre equipaggiato di un'ulteriore fila di pozzetti (in prossimità dell'uscita) come strumento accessorio per il controllo di temperatura: all'interno di uno dei tre pozzetti sarà posizionato un sensore di temperatura

(termocoppia) che permetterà di monitorare in tempo reale o registrare (durante la notte) il profilo termico.



**Figura 3.5:** Foto dell'ultima versione del chip (a) e dell'unità di chiusura (b, c, d).

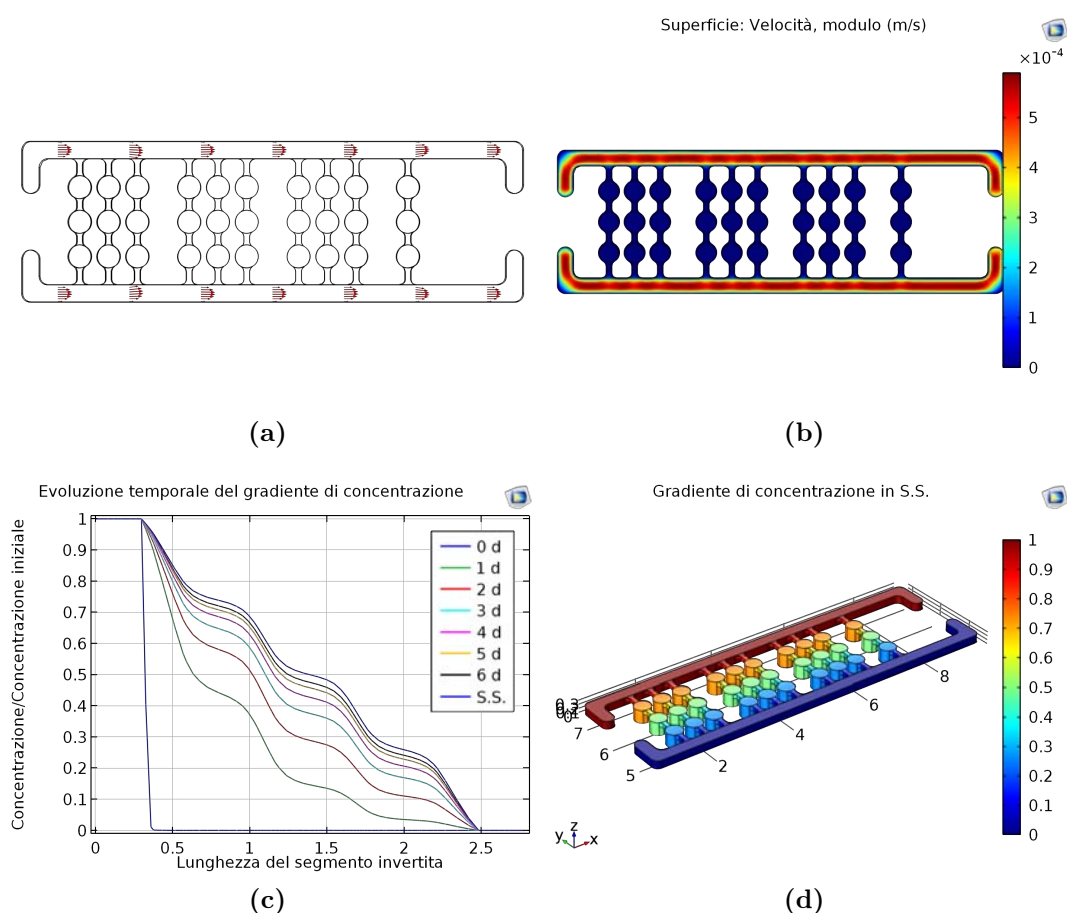
L'unità di chiusura è stata progettata con lo scopo di ottimizzare la temperatura di crescita all'interno dei pozzetti, pur mantenendo alcune impostazioni precedenti risultate valide (chiavistelli a slitta e lastre in policarbonato). In particolare, sono stati creati 8 fori nella parte inferiore dell'unità con lo scopo di far scorrere acqua di raffreddamento per mantenere il sistema alla temperatura ottimale. Le "finestre" per il passaggio dell'anidride carbonica sono state quindi nuovamente spostate nella parte superiore dell'unità per lasciare spazio al sistema di raffreddamento.

Le dimensioni del chip sono  $96 \times 75 \times 5.25$  mm (L×W×H). I pozzetti hanno diametro  $D = 4$  mm e profondità  $H = 3.25$  mm, mentre i microcanali hanno sezione trasversale quadrata ( $1 \times 1$  mm).

Le dimensioni dell'unità di chiusura sono riportate in Appendice B.

### 3.2.2 Modellazione numerica

La valutazione preliminare circa il funzionamento del nuovo dispositivo è stata effettuata tramite simulazione in COMSOL Multiphysics<sup>®</sup>, i cui risultati sono esposti in Figura 3.6.



**Figura 3.6:** Risultati della simulazione computazionale. Profilo di velocità (a, b), evoluzione nel tempo del gradiente di concentrazione (c) e profilo di concentrazione allo stazionario (d).

Dalle figure 3.6a e 3.6b si può notare la presenza di un profilo parabolico di velocità (tipico di un regime laminare) che si sviluppa solamente all'interno dei canali di alimentazione. Al di fuori di questo dominio (microcanali e pozzetti) la velocità è teoricamente nulla. È possibile analizzare i fenomeni di trasporto che caratterizzano ciascun dominio attraverso lo studio di numeri adimensionali quali  $Bo$  (Bodenstein) e  $Re$  (Reynolds).

Il numero di Bodenstein, usato nel trasporto di materia per descrivere il regime di mescolamento all'interno di un reattore, esprime il rapporto tra trasporto

convettivo e trasporto diffusivo:

$$Bo = \frac{vD}{\mathcal{D}}, \quad (3.1)$$

dove  $v$  è la velocità media del fluido,  $D$  è la lunghezza caratteristica del fenomeno (in questo caso il diametro equivalente) e  $\mathcal{D}$  è il coefficiente di diffusione.

Il numero di Reynolds, usato in fluidodinamica per caratterizzare il regime di flusso (laminare o turbolento), è definito come rapporto tra forze inerziali e forze viscosse:

$$Re = \frac{vD}{\nu}, \quad (3.2)$$

dove  $\nu$  è la viscosità cinematica.

Si noti che  $Bo$  e  $Re$  sono correlati attraverso il numero di Schmidt ( $Sc$ ) che esprime il rapporto tra diffusività cinematica e diffusività di materia:

$$Bo = \frac{vD}{\mathcal{D}} = Re \cdot Sc, \quad \text{con } Sc = \frac{\nu}{\mathcal{D}} \quad (3.3)$$

I valori delle variabili e dei parametri presenti in questi gruppi adimensionali sono stati ricavati dalla letteratura o tramite specifiche formule che saranno nel seguito esposte.

I valori di densità e viscosità cinematica sono stati calcolati attraverso una correlazione presente nel lavoro di Sharqawy *et al.* (2010).

I risultati, ottenuti considerando una salinità media di 35 g/kg ed una temperatura di 300 K, sono: 1023 kg/m<sup>3</sup> per la densità ( $\rho$ ) e  $9.05 \times 10^{-7}$  m<sup>2</sup>/s per la viscosità cinematica.

Il diametro equivalente dei canali d'ingresso (sezione rettangolare 2×3 mm) risulta essere pari a 2.4 mm, mentre la velocità media, valutata in COMSOL Multiphysics<sup>®</sup> a partire da una velocità in ingresso di  $1.842 \times 10^{-4}$  m/s, è pari a  $2.774 \times 10^{-4}$  m/s.

Il valore del coefficiente di diffusione in un liquido è stato valutato attraverso l'equazione di Stokes–Einstein:

$$\mathcal{D} = \frac{k_B T}{6\pi\mu r}, \quad (3.4)$$

dove  $k_B$  è la costante di Boltzmann,  $T$  è la temperatura,  $\mu$  è la viscosità dinamica del fluido ( $\nu \cdot \rho$ ) e  $r$  è il raggio della particella sferica (in questo caso il raggio



ionico dei nitrati pari a 179 pm).

Sostituendo in (3.4) i valori numerici, si ottiene:  $\mathcal{D} = 1.326 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$  (in linea con il valore di riferimento presente in letteratura per mezzi liquidi:  $10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ).

È ora possibile procedere con il calcolo dei numeri adimensionali:

- Nei canali di alimentazione:  $Bo = 502$  e  $Re = 0.736$ ;
- Nei microcanali e nei pozzetti:  $Bo$  e  $Re \rightarrow 0$ , essendo  $v \rightarrow 0$ .

L'alto valore del numero di Bodenstein e il basso valore di Reynolds ( $< 2300$ ) ottenuti nel primo punto confermano la presenza di un moto laminare con trasporto convettivo all'interno dei canali di alimentazione. I valori di  $Bo$  e  $Re$  tendenti a zero nei microcanali e nei pozzetti indicano, al contrario, un moto esclusivamente diffusivo in regime di Stokes ( $Re \ll 1$ ), in cui le forze inerziali sono trascurabili rispetto a quelle viscosive.

Le concentrazioni allo stazionario nei pozzetti sono espresse come valore percentuale della più alta concentrazione del nutriente oggetto di studio entrante nel sistema. I valori, in questo caso, corrispondono al 74, 50 e 26% della concentrazione di nitrati entrante nel canale di alimentazione superiore (Figura 3.6d).

In Figura 3.6c è mostrata l'evoluzione temporale del gradiente di concentrazione. Come si può notare, il tempo richiesto per raggiungere lo stazionario è decisamente troppo elevato (oltre 6 giorni), tuttavia l'evidenza sperimentale ha dimostrato un risultato diverso, come meglio esplicitato nel §3.2.3.

### 3.2.3 Verifica del sistema

Dalle prove fluidodinamiche è emerso che lo stazionario è raggiunto in un tempo di circa 24 ore. L'esito dei test con tracciante (in linea con i risultati ottenuti dalle prove condotte con i precedenti dispositivi) suggerisce la possibile esistenza di forze all'interno del chip in grado di accelerare il trasporto diffusivo, forze innescate probabilmente dalla pressione esercitata dall'unità di chiusura.

In Figura 3.7 si riporta il risultato di una prova fluidodinamica ottenuto dopo 24 ore dall'inizio della stessa.

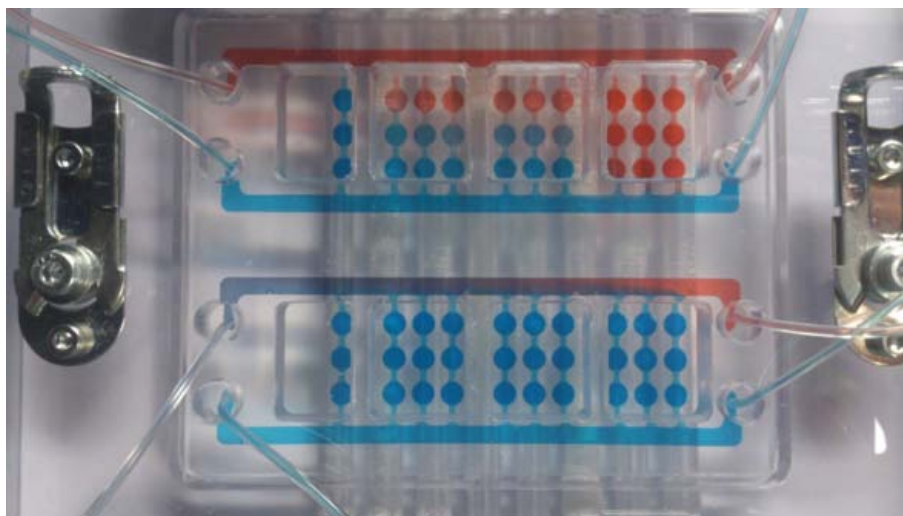
Il test è stato realizzato con due diverse impostazioni in uscita:

- I tubi in uscita, nell'esperimento condotto nella parte superiore del chip, sono stati collegati a due siringhe che lavorano in aspirazione;

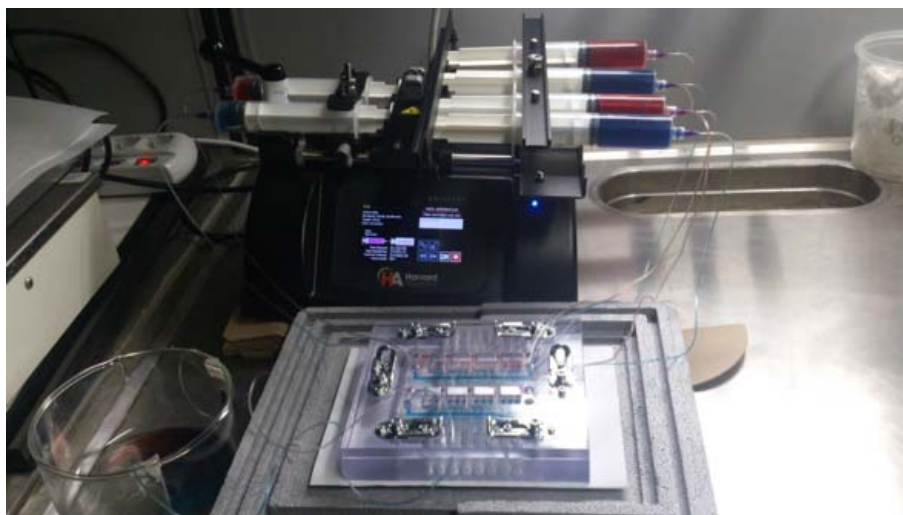
- I tubi in uscita, nell'esperimento condotto nella parte inferiore del chip, sono stati lasciati a pressione atmosferica.

Come si può notare l'uso di siringhe in aspirazione è necessario per la formazione del gradiente chimico.

Dalla Figura 3.7a è anche possibile osservare come la scelta di allungare il percorso finale dei canali di alimentazione abbia eliminato i problemi in uscita esposti precedentemente, gli stessi che si presentano ora in prossimità degli ingressi.



(a)



(b)

**Figura 3.7:** Foto del primo test con tracciante. Gradiente di concentrazione dopo 24 ore dall'inizio del test (a) e apparato sperimentale (b).

In Figura 3.8 si pone a confronto l'esito di un'ulteriore prova fluidodinamica con il gradiente a stazionario ricreato sperimentalmente attraverso i risultati ottenuti dalla simulazione computazionale. Il confronto dimostra, anche in questo caso, che la condizione stabile ed invariante nel tempo mantenuta da forze esterne è raggiunta in un tempo molto più breve rispetto a quanto previsto nel software di simulazione (COMSOL Multiphysics®).



(a)



(b)

**Figura 3.8:** Foto del secondo test con tracciante. Gradiente di concentrazione dopo 24 ore dall'inizio del test (a) e gradiente di concentrazione ricreato dai risultati computazionali (b).

### 3.2.4 Controllo della temperatura

I risultati inerenti il profilo termico, mostrati in Figura 3.9, sono stati ottenuti considerando il fluido statico all'interno del chip (solo conduzione di calore), impostando una temperatura di 34 °C sopra la superficie del layer, una temperatura iniziale di 25 °C ed una temperatura dell'acqua di raffreddamento pari a 5 °C. L'acqua fresca scorre all'interno degli 8 fori presenti nell'unità di chiusura ad una velocità pari a 1 cm/s.

Come si osserva in Figura 3.9e, il profilo di temperatura lungo l'altezza di ciascun pozzetto ha un andamento lineare e si stabilizza dopo un tempo di circa 15 min. Allo stazionario, il valore di temperatura sul fondo dei pozzetti, dove sedimentano le alghe, è circa pari a 23 °C, valore ottimale per la crescita microalgale.

L'andamento lineare è dovuto all'unico meccanismo di trasporto termico che governa il bilancio di energia: la conduzione. L'equazione di bilancio per il caso monodimensionale in stato stazionario si riduce alla **legge di Fourier**:

$$\frac{\partial}{\partial z} \left( \frac{\partial T}{\partial z} \right) = 0 \quad (3.5)$$

L'equazione di Laplace (3.5) è facilmente risolvibile come:

$$T = C_1 z + C_2, \quad (3.6)$$

dove  $C_1$  e  $C_2$  rappresentano le due costanti di integrazione, i cui valori possono essere ottenuti una volta definite le condizioni al contorno.

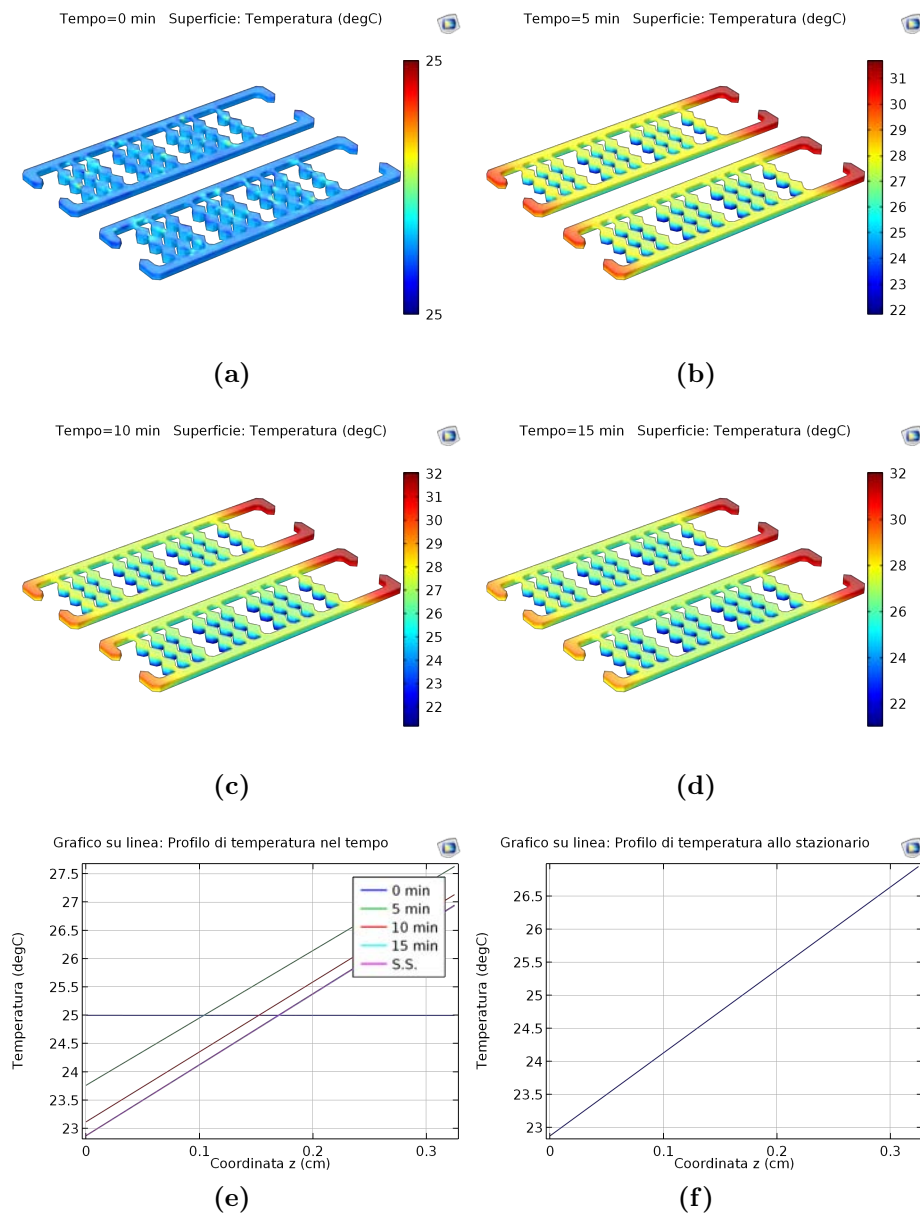
Le prove sperimentali di crescita, i cui risultati saranno esposti nel prossimo paragrafo, sono state condotte senza l'utilizzo del sistema di raffreddamento. La nuova lampada utilizzata per la crescita cellulare (a LED e non più a fluorescenza) ha infatti permesso di mantenere la temperatura al di sotto del limite massimo tollerabile dalle microalghe.

I risultati medi ottenuti dalla termocoppia sono:

- Temperatura all'interno dei pozzetti sotto massimo irraggiamento (ovvero a  $360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) = 26.5 °C;
- Temperatura dell'ambiente esterno = 25.3 °C.

L'alta efficienza delle luci a LED permette quindi una minore dissipazione dell'energia sotto forma di calore rispetto alle precedenti lampade a fluorescenza. Questo consente di evitare un eccessivo riscaldamento ambientale che risulterebbe letale per la crescita microalgale.

Il sistema di raffreddamento, sebbene non sia stato impiegato in questa tesi, rimane un valido strumento per condurre prove di crescita a differenti temperature ed indagare l'effetto del calore sulla crescita.



**Figura 3.9:** Risultati della simulazione termica effettuata con il software COMSOL Multiphysics<sup>®</sup>. Temperatura all'interno del chip a 0, 5, 10 e 15 min (a, b, c, d), evoluzione nel tempo del profilo di temperatura (e) e profilo di temperatura allo stazionario lungo l'altezza dei pozzetti (f).



# Capitolo 4

## Risultati sperimentali e discussione

L'ultimo capitolo concerne i risultati sperimentali raggiunti. Sono state condotte prove sperimentali attraverso cui è stato possibile valutare le eventuali differenze esistenti tra un sistema a flusso continuo di nutrienti rispetto a uno discontinuo e l'impatto che una diversa concentrazione di nitrati ha sulla crescita cellulare. Saranno inoltre presentati due diversi modelli matematici da cui sarà possibile confrontare quantitativamente i risultati sperimentali ottenuti.

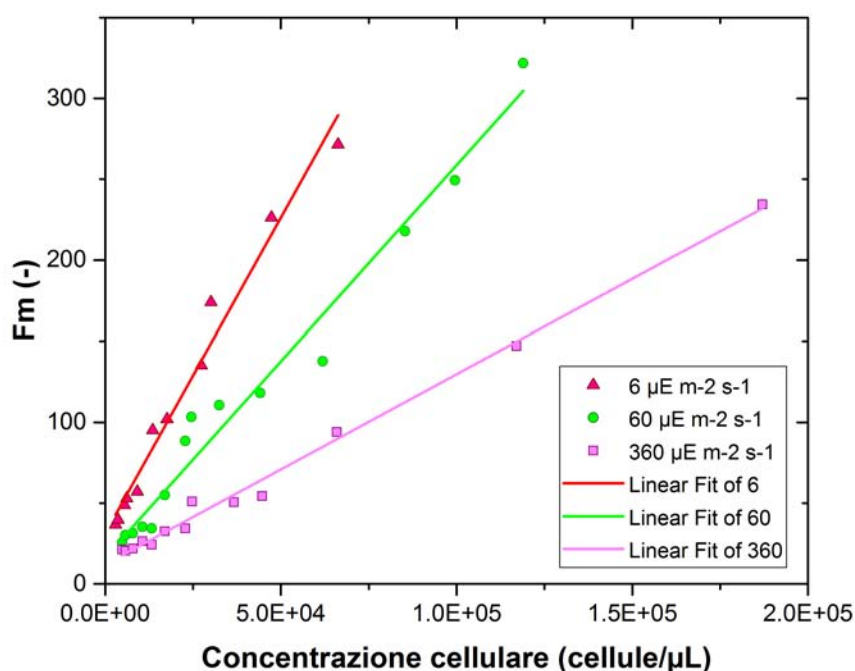
### 4.1 Correlazione Fluorescenza-Concentrazione

Come già discusso nei capitoli precedenti, la tecnica attraverso cui è stato possibile monitorare nel tempo la crescita di *Nannochloropsis gaditana* sfrutta il segnale di fluorescenza emesso dai pigmenti di clorofilla presenti nel campione posto in esame. La crescita cellulare sarà poi quantificata attraverso una correlazione che leghi i valori di fluorescenza massima a quelli di concentrazione microalgale. In Figura 4.1 sono esposti i risultati sperimentali legati alla procedura di taratura descritta nel §2.6.

I punti sperimentali ottenuti cadono all'interno di un intervallo di operabilità i cui limiti sono definiti dal minimo valore rilevabile dal fluorimetro e dal massimo valore legato alla saturazione del segnale di fluorescenza (all'aumentare della concentrazione cellulare i valori di  $F_m$  resterebbero costanti). Al di sopra del valore massimo, la correlazione concentrazione vs. fluorescenza massima perde la linearità; in questo caso non sarebbe più possibile ricavare una retta di taratura.

Ciascuna correlazione è stata ottenuta a partire da un unico valore di irraggiamento (l'intero chip è stato quindi irradiato ad unico e specifico valore di intensità luminosa), poiché il contenuto di clorofilla in ciascuna microalga resta costante solo se rimangono costanti anche le condizioni di luce.

Osservando il grafico di Figura 4.1 si può constatare come, a parità di concentrazione cellulare, le microalghe adattate ad intensità luminose più alte presentano un valore di fluorescenza massima inferiore rispetto a quelle acclimatate ad irraggiamenti più bassi. Ciò è altresì in linea col fatto che le cellule adattate ad irraggiamenti minori dispongano di un contenuto di clorofilla superiore, atto a mantenere un'efficiente attività fotosintetica anche in condizioni di luce limitante.



**Figura 4.1:** Risultati della correlazione lineare Fluorescenza-Concentrazione al variare dell'irraggiamento.

Nell'ambiente naturale, infatti, gli organismi fotosintetici sono in grado di affrontare frequenti cambiamenti di luce (di uno o due ordini di grandezza). Per far fronte a tali mutamenti, le microalghe (o in generale le piante) hanno sviluppato diversi meccanismi di acclimatazione. In condizioni di luce limitante, l'organismo aumenta la pigmentazione, ovvero incrementa il numero di unità fotosintetiche, mentre sotto irraggiamento sovra-ottimale la pigmentazione risulta ridotta (Masojídék *et al.*, 2004). In quest'ultimo caso, un eccesso di radiazione luminosa potrebbe portare a fotoprodotto tossici per l'organismo e danneggiare seriamente il suo apparato fotosintetico se il meccanismo di estinzione non fotochimica (NPQ) non fosse in grado di dissiparlo efficacemente sotto forma di calore.



I valori numerici dei parametri, ottenuti dalla regressione lineare dei dati sperimentali esposti in Figura 4.1, sono espressi, in funzione dell'irraggiamento, nell'equazione (4.1).

$$\begin{aligned}F_m^{360} &= 0.00118 \cdot C^{360} + 12.01 \\F_m^{60} &= 0.00242 \cdot C^{60} + 16.31 \\F_m^6 &= 0.0039 \cdot C^6 + 31.29\end{aligned}\tag{4.1}$$

## 4.2 Risultati prove di crescita senza gradiente

L'obiettivo della prima prova di crescita riguarda la valutazione delle possibili differenze esistenti tra un sistema in flusso continuo di nutrienti e uno in discontinuo. La crescita è stata studiata inoculando il chip ad un unico valore di concentrazione microalgale e a tre diversi irraggiamenti (6, 60 e 360  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) attraverso l'uso di un filtro fotografico.

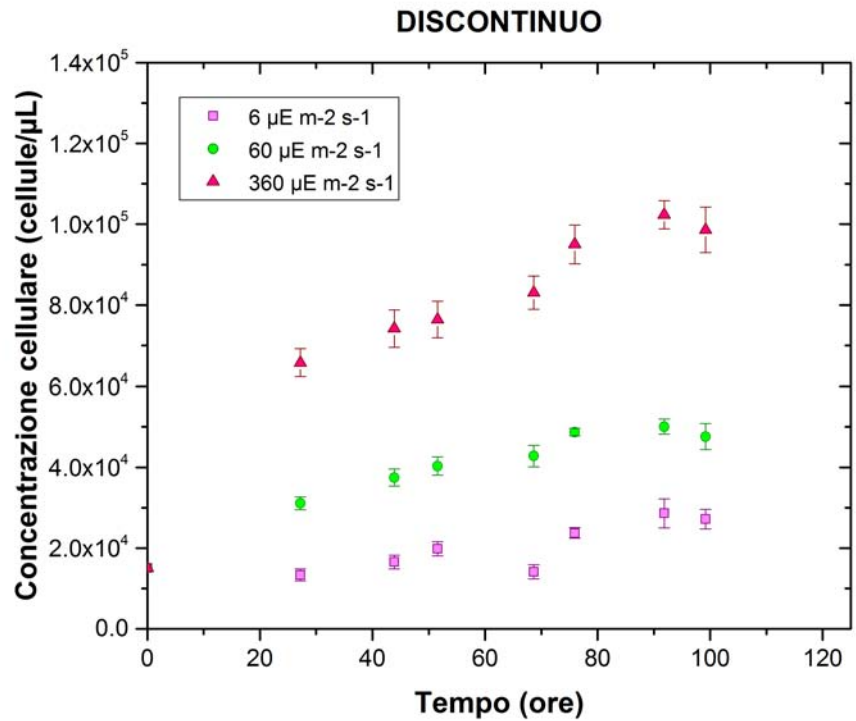
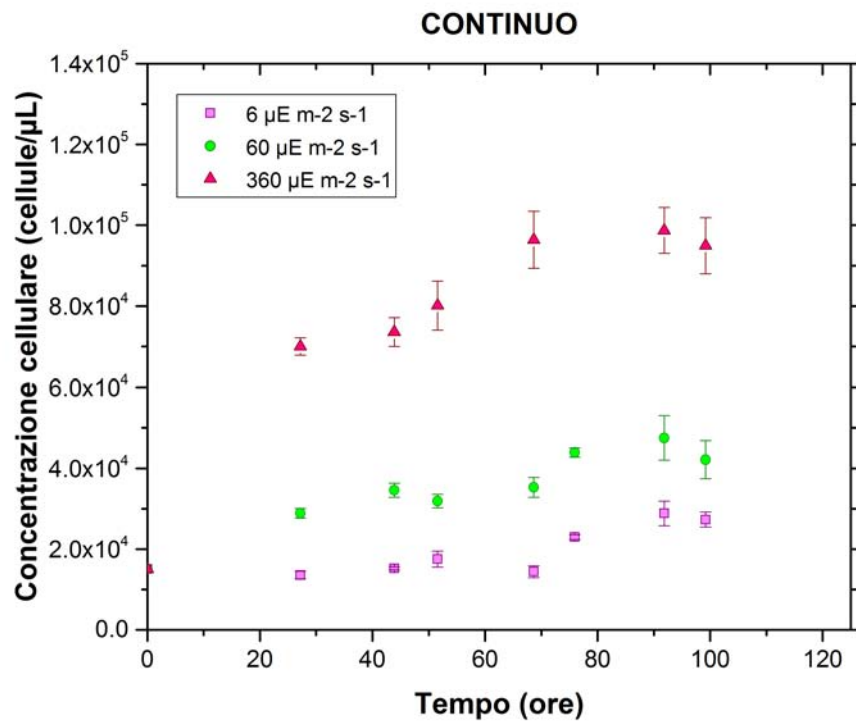
Il valore di concentrazione iniziale, pari a  $1.508 \times 10^{-4}$  cellule/ $\mu\text{l}$ , è stato scelto per sopperire ad un problema legato alla scarsa rilevazione del segnale di fluorescenza da parte della CCD-camera; esso, infatti, esprime la massima concentrazione ammissibile in grado di generare un segnale di fluorescenza abbastanza forte da essere rilevato e di mantenere la crescita (fino allo stazionario) all'interno del range di linearità definito dalla retta di taratura.

Per ciascun tipo di crescita (continuo e discontinuo) sono state effettuate tre repliche e i risultati ottenuti sono dati dalle medie dei tre valori.

Si è partiti da cellule adattate a luce media (60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), poste in seguito alle specifiche intensità luminose.

Questa prova iniziale, come dichiarato precedentemente, ha lo scopo di valutare quali possano essere le differenze, in termini di crescita, tra un sistema soggetto a un flusso continuo di nutrienti rispetto a uno in discontinuo. Pertanto, le concentrazioni di nutrienti entranti nel sistema in flusso continuo, attraverso i canali di alimentazioni, risulteranno essere le stesse.

I risultati ottenuti sono mostrati nei due grafici di Figura 4.2, realizzati applicando fin dall'istante iniziale le correlazioni concentrazione vs. fluorescenza massima, specifiche di ciascun irraggiamento.



**Figura 4.2:** Confronto tra curve di crescita in flusso continuo (a) e discontinuo di nutrienti (b), parametrizzate secondo l'intensità luminosa.

L'inoculo è stato preparato partendo da cellule ambientate in beuta a media luce ( $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e fatte poi crescere anche ad altre intensità luminose. Ciò comporta un aumento o una diminuzione nel tempo (a seconda dell'irraggiamento) del contenuto di clorofilla rispetto al valore iniziale, che influisce sul segnale di fluorescenza massima.

Fino all'adattamento al nuovo flusso luminoso, non sarebbe pertanto possibile associare i valori di fluorescenza alla sola crescita e, a rigore, sarebbe necessario, ai fini del calcolo delle concentrazioni, passare da una retta di taratura all'altra, conoscendo la dinamica con cui evolve il contenuto della clorofilla al variare dell'irraggiamento. Non essendo però possibile ottenere tale informazione, si è deciso di procedere applicando fin da subito (al tempo  $t = 0$ ) le correlazioni matematiche specifiche per ciascun flusso luminoso, ipotizzando che l'adattamento alla luce, in un microsistema come questo, avvenga nel giro di poche ore.

Le curve di crescita medie di Figura 4.2 sono state approssimate con un modello di tipo logistico e uno di tipo lineare.

La funzione logistica descrive una curva sigmoidale di equazione:

$$C(t) = \frac{C_{SS}}{1 + e^{-k(x-x_c)}} \quad (4.2)$$

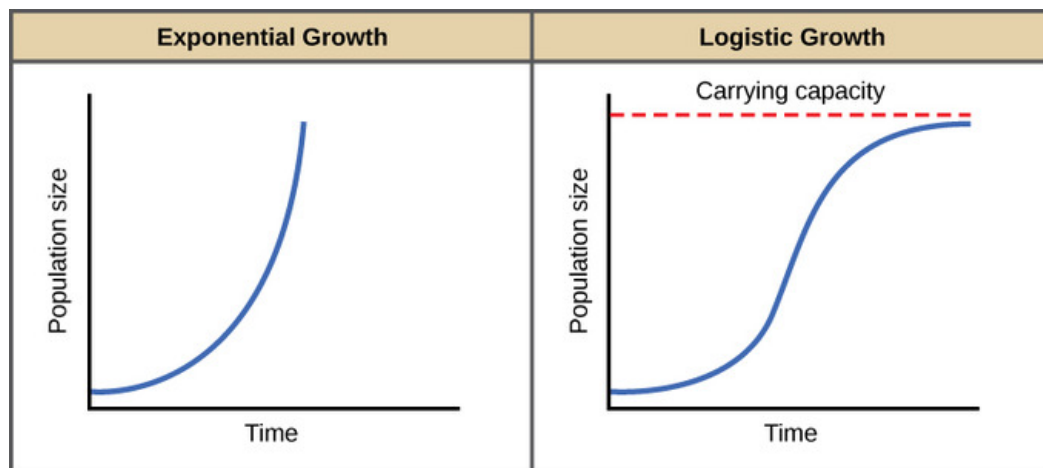
dove:

- $C_{SS}$ , valore massimo della curva, esprime la concentrazione allo stazionario;
- $k$  è la pendenza della curva e rappresenta la velocità (o tasso) di crescita;
- $x_c$  è il punto medio della sigmoide.

L'equazione fu pubblicata per la prima volta da Pierre F. Verhulst nel 1838 per descrivere le auto-limitazioni di crescita di una popolazione biologica. Nel mondo reale, infatti, le risorse sono limitate e la crescita esponenziale non può continuare all'infinito.

Un grafico della funzione logistica, posta a confronto con una crescita esponenziale, è rappresentato in Figura 4.3.

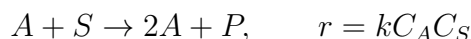
Dal grafico di Figura 4.3 si può osservare come, in entrambi i casi, lo stadio di crescita iniziale sia caratterizzato da un andamento approssimativamente esponenziale dovuto alla presenza di pochi "individui" e ampie risorse disponibili. Nel momento in cui i nutrienti iniziano a scarseggiare, la crescita nel modello logistico rallenta, fermandosi definitivamente nel punto in cui l'ambiente non è più in grado di sostenere i livelli di crescita della popolazione (*carrying capacity*).



**Figura 4.3:** Confronto tra curva di crescita esponenziale e logistica.

Le curve di crescita sono state approssimate anche con un modello di tipo lineare. In questo caso si è cercato di descrivere matematicamente la crescita dei microorganismi attraverso una relazione lineare ricavata dai punti sperimentali appartenenti al tratto di curva esponenziale.

La crescita in fase esponenziale può essere semplificata come una reazione chimica del tipo:



In cui  $A$  rappresenta il nostro microorganismo,  $S$  (substrato) i nutrienti che la cellula assimila per riprodursi, mentre  $P$  designa i prodotti metabolici. La velocità di reazione ( $r$ ) è espressa come prodotto tra costante di crescita ( $k$ ), concentrazione cellulare ( $C_A$ ) e concentrazione di substrato ( $C_S$ ).

In presenza di un eccesso di nutrienti, la concentrazione di substrato può ritenersi costante e pari al valore iniziale ( $C_{S0}$ ). Il termine di reazione può pertanto essere semplificato come  $r = k'C_A$ , in cui  $k'$  rappresenta la costante di crescita comprensiva del termine costante legato alla concentrazione di substrato.

Da un semplice bilancio di specie applicato ad un reattore discontinuo, è possibile ottenere l'equazione differenziale che descrive la crescita microalgale nella fase esponenziale:

$$\frac{dC_A}{dt} = +k'C_A \quad (4.3)$$

che integrata dall'istante iniziale ( $t = 0$ ) al generico tempo  $t$  dà:

$$\ln C_A(t) = \ln C_{A0} + k't \quad (4.4)$$

L'equazione (4.4) descrive il modello di crescita lineare, avente come unico parametro  $k'$  (tasso di crescita).

I valori di tutti parametri ottenuti dalle regressioni con il modello logistico e con quello lineare sono riportati in Tabella 4.1, mentre i grafici dei fitting, ricavati attraverso MATLAB<sup>®</sup>, sono raccolti in Appendice C. Si sottolinea che in alcuni casi non è stato possibile ricavare i parametri del modello logistico a causa della mancata convergenza durante la procedura di fitting dei dati sperimentali; i valori, nella fattispecie, sono stati regrediti mediante un diverso software: Origin<sup>®</sup>, che, tuttavia, non ha permesso di ottenere i valori relativi agli errori standard.

**Tabella 4.1:** Tabella riassuntiva dei parametri di fitting relativi alle curve di crescita in flusso continuo e discontinuo di nitrati.

Luce	Modello	Parametri	Continuo	Discontinuo
360 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Logistico	$C_{SS}$ [cellule/ $\mu\text{l}$ ]	$95822 \pm 5086$	$98118 \pm 5749$
		$k$ [ $\text{ore}^{-1}$ ]	$0.068424 \pm 0.017089$	$0.055874 \pm 0.014098$
		$x_c$ [ore]	$19.319 \pm 4.309$	$22.382 \pm 4.709$
	Lineare	$k'$ [ $\text{ore}^{-1}$ ]	$0.0078418 \pm 0.0016141$	$0.007069 \pm 0.001694$
60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Logistico	$C_{SS}$ [cellule/ $\mu\text{l}$ ]	$48408 \pm 6804$	$50513 \pm 1903$
		$k$ [ $\text{ore}^{-1}$ ]	$0.031531 \pm 0.012395$	$0.043018 \pm 0.006164$
		$x_c$ [ore]	$21.124 \pm 10.994$	$18.604 \pm 3.015$
	Lineare	$k'$ [ $\text{ore}^{-1}$ ]	$0.004299 \pm 0.002175$	$0.007751 \pm 0.001533$
6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Logistico	$C_{SS}$ [cellule/ $\mu\text{l}$ ]	<sup>a</sup> 28854	<sup>a</sup> 28601
		$k$ [ $\text{ore}^{-1}$ ]	<sup>a</sup> 0.02533	<sup>a</sup> 0.02626
		$x_c$ [ore]	<sup>a</sup> 25.504	<sup>a</sup> 21.722
	Lineare	$k'$ [ $\text{ore}^{-1}$ ]	$0.001907 \pm 0.004225$	$0.001885 \pm 0.007124$

<sup>a</sup> Valore ottenuto da Origin<sup>®</sup>.

I risultati ottenuti (vedi Figura 4.2 e Tabella 4.1) non sembrano dimostrare alcuna differenza nella valutazione della crescita di *Nannochloropsis gaditana* in un sistema a flusso continuo di nutrienti piuttosto che in uno discontinuo, come si evince dai valori non dissimili dei parametri regrediti da entrambi i modelli nei

due casi di funzionamento. La crescita, pertanto, sembrerebbe non essere limitata dalla quantità di nutrienti presenti in un microsistema in discontinuo.

È possibile altresì osservare che la crescita è fortemente influenzata dall'intensità luminosa: le microalghe crescono in maniera significativa con l'aumentare del flusso luminoso. Appare evidente, inoltre, come le cellule irradiate a  $360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  abbiano avuto una crescita notevolmente superiore rispetto alle quelle esposte a media e bassa luce ( $60$  e  $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Ciò è evidenziato, a prescindere dalla configurazione di flusso dei nutrienti (continuo o discontinuo), dai valori di pendenza (tassi di crescita) e dalle concentrazioni a stazionario di ciascun irraggiamento (vedi Tabella 4.1).

Dal confronto tra i due modelli (logistico e lineare) si può infine riscontrare una difformità legata all'unico parametro comune: la velocità (o tasso) di crescita. I valori attinenti al modello lineare, in particolare, risultano essere notevolmente inferiori in relazione ai rispettivi del tipo logistico. Ciò è dovuto (nel modello lineare) alla difficile interpretazione di quale sia il miglior set di dati sperimentali appartenenti alla fase di crescita esponenziale entro cui valutare il valore di pendenza. La scarsa presenza di punti sperimentali iniziali, inoltre, lo rende un modello poco affidabile anche da questo punto di vista. Di conseguenza, il modello da preferire nella stima dei parametri di crescita è senz'altro quello logistico, tuttavia, se si fosse in grado di ottenere più punti sperimentali negli istanti di tempo che precedono la crescita esponenziale, sarebbe possibile migliorare l'accuratezza di entrambi i modelli, permettendo una migliore definizione della fase di adattamento (*fase lag*) ed una migliore linearizzazione della fase di crescita esponenziale.

### 4.3 Risultati prove di crescita con gradiente

L'obiettivo di questa seconda prova di crescita riguarda la verifica sperimentale della formazione di un gradiente di concentrazione di nitrati e la valutazione dell'impatto che essi hanno sulla crescita.

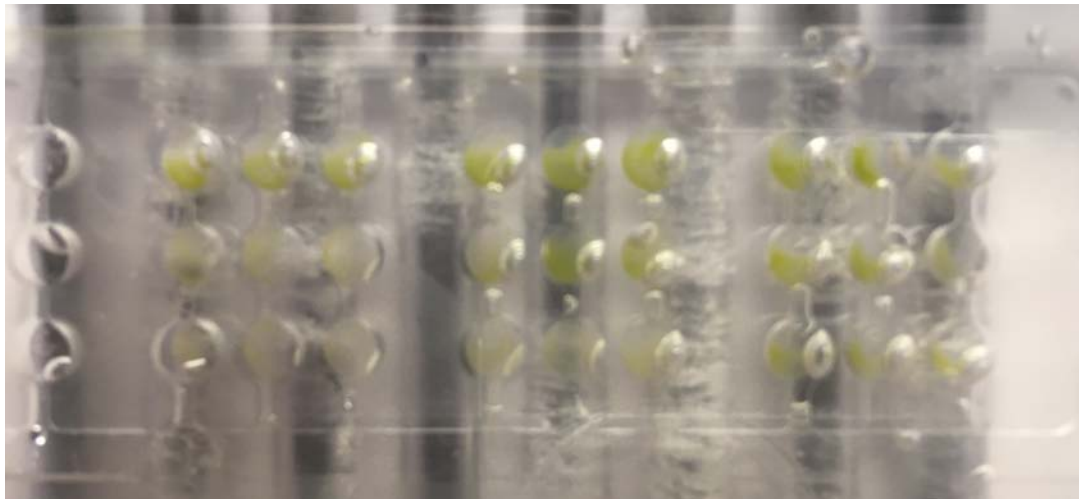
Anche in questo caso, la crescita è stata studiata inoculando il chip ad un unico valore di concentrazione microalgale e a tre diversi irraggiamenti ( $6$ ,  $60$  e  $360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), attraverso l'uso di un filtro fotografico. Tuttavia, come già anticipato nel capitolo 3, la presenza di problemi di trasporto in prossimità degli ingressi ha impedito la formazione del gradiente nella sezione esposta alla più bassa intensità luminosa ( $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Pertanto, nel seguito si farà riferimento

solamente ai risultati relativi agli irraggiamenti ad alta e media luce ( $360$  e  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

A dimostrazione di quanto asserito, si mostra in Figura 4.4 una fotografia del chip scattata al termine della prova di crescita. L'immagine illustra chiaramente la presenza di una diversa concentrazione microalgale nelle file di pozzetti appartenenti alle sole due sezioni del chip prossime all'uscita (irradiate a  $360$  e  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), dimostrando in maniera inequivocabile il successo ottenuto nella formazione di un gradiente stabile di nitrati e l'effetto che ne ha portato sulla crescita.

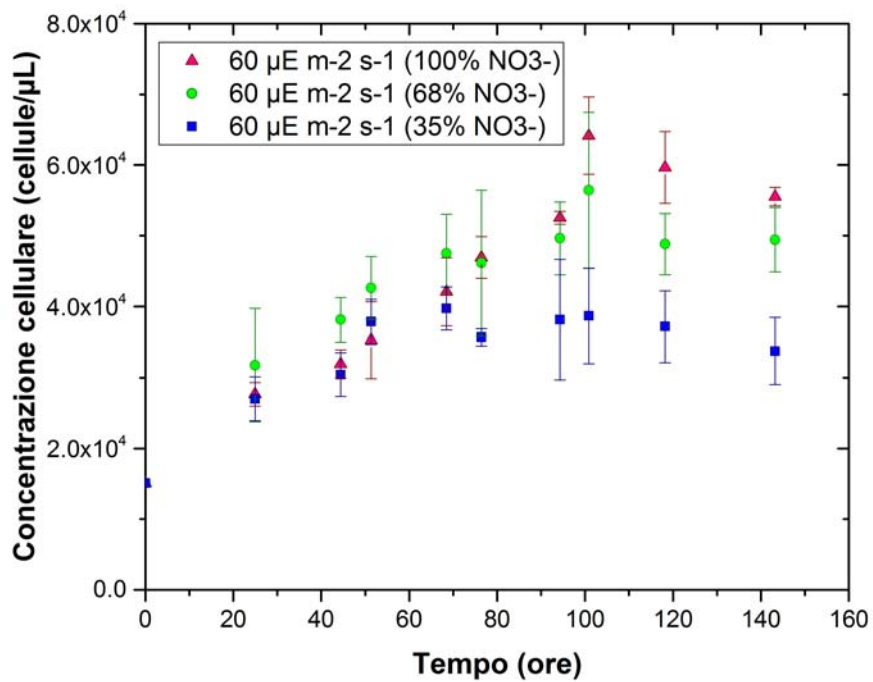
La crescita è stata condotta a partire da una concentrazione di inoculo pari a  $1.508 \times 10^{-4}$  cellule/ $\mu\text{l}$  e da cellule adattate a luce media ( $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), poste in seguito alle specifiche intensità luminose.

Affinché si possa formare un gradiente chimico lungo ciascuna fila di pozzetti, è necessario che le concentrazioni di nitrati entranti nel sistema in flusso continuo, attraverso i canali di alimentazioni, siano diverse. Per questo motivo, a un canale d'ingresso è stata iniettata una soluzione di nutrienti priva di nitrati, mentre all'altro una contenente una concentrazione (di  $\text{NO}_3^-$ ) tale da riprodurre, nella riga di pozzetti più vicina all'alimentazione ricca di nitrati, la composizione standard del mezzo di coltura di *Nannochloropsis gaditana*.

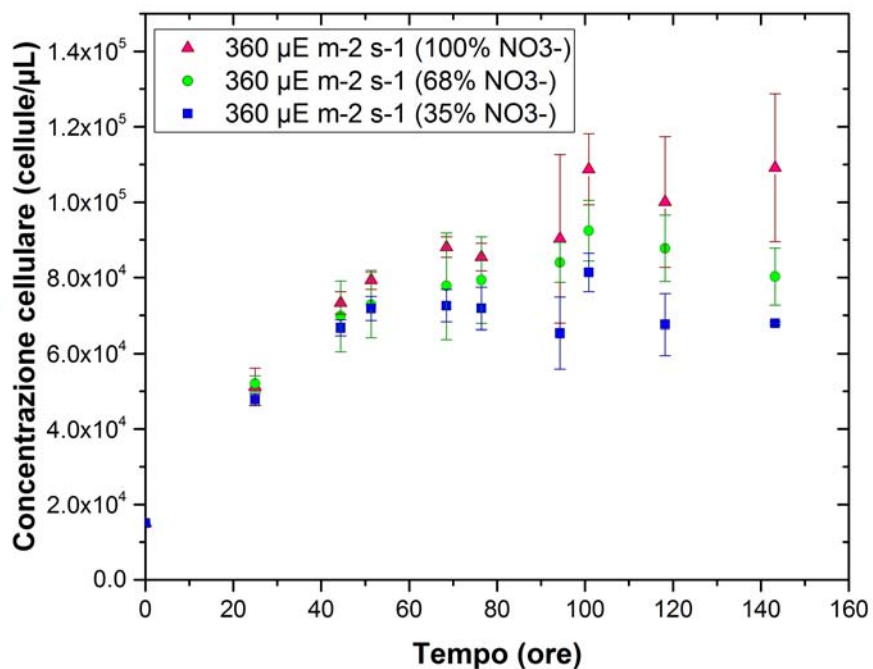


**Figura 4.4:** Foto del chip al termine del ciclo di crescita.

Sono state effettuate 3 repliche; i risultati sono stati mediati e riportati nei grafici di Figura 4.5.



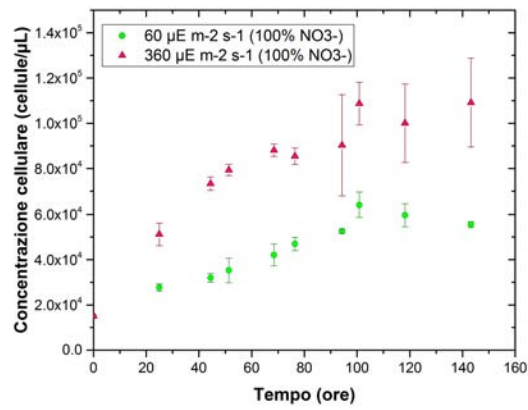
(a)



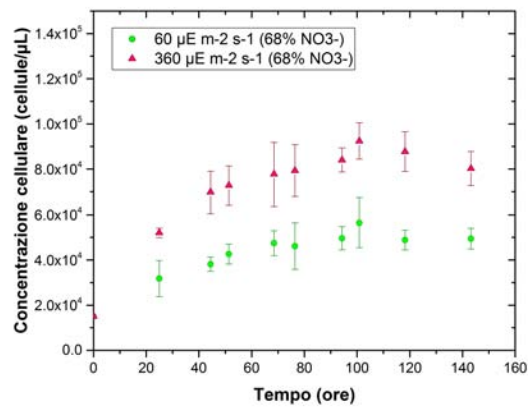
(b)

Figura 4.5: Confronto tra curve di crescita a 60 (a) e 360  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (b), parametrizzate secondo la concentrazione di nitrati.

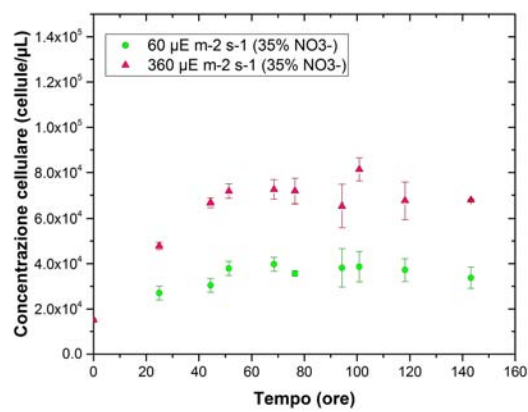




(a)



(b)



(c)

**Figura 4.6:** Confronto tra curve di crescita a concentrazione di nitrati pari a 100% (a), 68% (b) e 35% (c), parametrizzate secondo l'intensità luminosa.

Ciascun grafico è stato elaborato ad irraggiamento costante e parametrizzato in funzione della concentrazione di nitrati<sup>1</sup>.

Da un punto di vista qualitativo è possibile osservare come i punti sperimentali iniziali tendano a essere molto simili tra loro (fino quasi a sovrapporsi), andando poi a differenziarsi con maggior chiarezza all'aumentare del tempo. La spiegazione di questo comportamento può essere data dal fatto che il gradiente di concentrazione di nitrati, nei primi punti sperimentali, sia ancora in fase di transizione, richiedendo ulteriore tempo per raggiungere lo stazionario. Per confermare tale ipotesi sarebbe utile poter monitorare l'andamento del processo diffusivo attraverso un marcatore inerte fluorescente in grado di definire con maggior precisione il tempo necessario alla completa formazione del gradiente chimico.

È possibile notare, inoltre, che la diversa concentrazione di nitrati sembra avere un effetto molto meno marcato sulla crescita di quanto non ce l'abbia una differente illuminazione. Ciò è reso ancor più evidente confrontando i risultati ottenuti in Figura 4.5 con quelli elaborati a concentrazione di nitrati costante e parametrizzati in funzione dell'irraggiamento (vedi Figura 4.6).

**Tabella 4.2:** Tabella riassuntiva dei parametri di fitting relativi alle curve di crescita a diverse concentrazioni di nitrati.

Luce	Modello	Parametri	360 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
100% $\text{NO}_3^-$	Logistico	$C_{SS}$ [cellule/ $\mu\text{l}$ ]	$103090 \pm 4337$	$63405 \pm 5517$
		$k$ [ore <sup>-1</sup> ]	$0.047872 \pm 0.009211$	$0.030723 \pm 0.007534$
	Lineare	$x_c$ [ore]	$28.32 \pm 4.04$	$39.83 \pm 7.91$
		$k'$ [ore <sup>-1</sup> ]	$0.017002 \pm 0.001431$	$0.0096975 \pm 0.0008528$
68% $\text{NO}_3^-$	Logistico	$C_{SS}$ [cellule/ $\mu\text{l}$ ]	$84795 \pm 2154$	$51305 \pm 1678$
		$k$ [ore <sup>-1</sup> ]	$0.06438 \pm 0.00992$	$0.046501 \pm 0.008102$
	Lineare	$x_c$ [ore]	$20.383 \pm 2.688$	$17.481 \pm 3.613$
		$k'$ [ore <sup>-1</sup> ]	$0.013174 \pm 0.001859$	$0.0094104 \pm 0.0009441$
35% $\text{NO}_3^-$	Logistico	$C_{SS}$ [cellule/ $\mu\text{l}$ ]	$71701 \pm 2055$	$37514 \pm 1239$
		$k$ [ore <sup>-1</sup> ]	$0.0887 \pm 0.0194$	$0.05859 \pm 0.01454$
	Lineare	$x_c$ [ore]	$15.987 \pm 3.087$	$7.679 \pm 4.118$
		$k'$ [ore <sup>-1</sup> ]	$0.01577 \pm 0.00135$	$0.009446 \pm 0.002581$

<sup>1</sup>Il 68% di  $\text{NO}_3^-$ , per esempio, sta a significare che i dati di crescita provengono dalla riga di pozzetti avente una concentrazione di nitrati pari al 68% del valore standard del mezzo di coltura (a cui corrisponde un valore pari al 100%).

I risultati numerici, esposti in Tabella 4.2, mostrano inequivocabilmente che la più alta crescita cellulare avviene nelle microalghe irradiate ad alta luce, a prescindere dalla concentrazione di nitrati considerata.

Anche in questo caso, è possibile riscontrare le stesse problematiche inerenti la scarsa affidabilità del modello lineare. Per tale motivo, i risultati ottenuti dalla regressione lineare e riassunti in Tabella 4.2 non saranno ulteriormente commentati.

È altresì vero che le microalghe tendono a crescere in maggior misura (vedi parametro  $C_{SS}$ ) in presenza di una concentrazione di nitrati superiore (in questo caso pari a quella del mezzo di coltura standard di *Nannochloropsis gaditana*), sebbene il tasso di crescita dimostri un andamento nettamente in contrasto con quanto appena dichiarato (vedi parametro  $k$ ): la velocità di crescita in questo caso tende a diminuire al crescere della concentrazione di  $\text{NO}_3^-$ .

Una maggiore concentrazione di nitrati sembrerebbe dunque avere un effetto inibitorio in grado di rallentare la cinetica di crescita cellulare ( $k$  più piccole), pur raggiungendo valori di concentrazione microalgale allo stazionario superiori ( $C_{SS}$  più grandi). Un'altra spiegazione potrebbe essere legata alla variazione del contenuto di clorofilla nelle microalghe a seguito dell'adattamento ad una diversa concentrazione di nitrati. In tal caso, per poter valutare correttamente l'influenza dei nitrati sulla crescita, sarebbe necessario stabilire una correlazione tra quantità di nitrati e fluorescenza emessa (che presume la conoscenza di come evolve il contenuto di clorofilla in funzione della concentrazione di  $\text{NO}_3^-$ ).

Sarebbe dunque utile, in futuro, monitorare il comportamento di crescita microalgale per concentrazioni di nitrati superiori a quella massima prevista in questa prova sperimentale in modo da verificare che l'andamento dei tassi di crescita e delle concentrazioni allo stazionario siano in linea con i risultati fin qui ottenuti.

Si noti, infine, come le crescite a  $360$  e  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , per concentrazione di nitrati pari a quella contenuta nel mezzo standard di coltura di *Nannochloropsis gaditana* (100% di  $\text{NO}_3^-$ ), presentino valori pienamente confrontabili con i risultati ottenuti dalle crescite senza gradiente del §4.2 (cfr. parametri  $k$  e  $C_{SS}$  di Tabella 4.2 e 4.1). Ciò dimostra l'affidabilità dei risultati conseguiti attraverso COMSOL Multiphysics<sup>®</sup>, dato che il valore di concentrazione di nitrati, iniettati nel canale di alimentazione, è stato calcolato sulla base delle soluzioni ottenute dalla simulazione computazionale.



# Conclusioni

L'obiettivo di questo studio concerne la progettazione di un microsistema per la crescita di microalghe, a flusso continuo di nutrienti, capace di formare un gradiente chimico stabile nel tempo e discriminare l'effetto che luce e concentrazione di nitrati hanno sulla crescita fotosintetica della specie microalgale *Nannochloropsis gaditana*.

La crescita microalgale è stata valutata *in vivo* misurando la fluorescenza emessa dalla clorofilla, in quanto l'applicazione di tecniche classiche, quali microscopio ottico o conta cellule automatico, sono impraticabili in sistemi su microscala. L'idea è dunque quella di utilizzare la fluorescenza della clorofilla come stima della concentrazione cellulare: monitorando l'incremento nel contenuto di clorofilla del campione sarà poi possibile ricavare attraverso una retta di taratura la concentrazione cellulare del campione stesso.

Il monitoraggio della temperatura, necessario al mantenimento di una crescita ottimale, è stato realizzato attraverso una termocoppia di tipo T, in grado di darne una lettura rapida e precisa.

Le difficoltà incontrate in questo lavoro riguardano, in principal modo, le bolle d'aria entranti nel sistema attraverso le siringhe di alimentazione. L'interruzione dei collegamenti tra pozzetti, microcanali e canali di alimentazione, causata dalla loro presenza, infatti, comprometterebbe irrimediabilmente un'intera prova di crescita.

Altre problematiche riscontrate nello studio hanno interessato il notevole aumento della temperatura del sistema in prove di crescita condotte sotto lampade a fluorescenza e la mancanza di uniformità nella formazione del gradiente lungo le 9 file che compongono il chip. La progettazione di un nuovo sistema che garantisca una compressione uniforme lungo tutta la superficie del chip, il collegamento dei tubi in uscita dal chip ad altre due siringhe che operano in aspirazione e l'utilizzo di luci a LED, tuttavia, ha reso possibile il superamento di questi problemi.

Il dispositivo creato ha consentito di valutare, attraverso due distinte prove sperimentali, l'effetto che il tipo di configurazione con cui sono stati alimentati

i nutrienti (flusso continuo o discontinuo) e la diversa concentrazione di nitrati hanno sulla crescita microalgale.

I risultati, ottenuti dalla regressione dei parametri attraverso un modello logistico, non evidenziano, nel primo caso, alcuna differenza nel valutare la crescita di *Nannochloropsis gaditana* in un sistema a flusso continuo di nutrienti piuttosto che in uno discontinuo.

Nel secondo caso, invece, le microalghe tendono a crescere in maggior misura in presenza di una concentrazione di nitrati superiore (raggiungendo un valore a stazionario più alto), sebbene la velocità di crescita dimostri un andamento nettamente in contrasto con quanto affermato in precedenza: la velocità tende a diminuire al crescere della concentrazione di  $\text{NO}_3^-$ .

Una maggiore concentrazione di nitrati sembrerebbe dunque avere un effetto inibitorio in grado di rallentare la cinetica di crescita cellulare (velocità di crescita più piccole), pur raggiungendo valori di concentrazione microalgale allo stazionario superiori. Un'altra spiegazione potrebbe essere legata alla variazione del contenuto di clorofilla nelle microalghe a seguito dell'adattamento ad una diversa concentrazione di nitrati. In tal caso, per poter valutare correttamente l'impatto dei nitrati sulla crescita, sarebbe necessario stabilire una correlazione tra quantità di nitrati e fluorescenza emessa (che presume la conoscenza di come evolve il contenuto di clorofilla in funzione della concentrazione di  $\text{NO}_3^-$ ).

Si sottolinea, infine, come la crescita sia fortemente influenzata anche dall'intensità luminosa, come dimostrano i risultati ottenuti da entrambe le prove sperimentali: le microalghe crescono in maniera significativa all'aumentare dell'irraggiamento (crescita in particolar modo accentuata in condizioni di alta luce, pari a  $360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

I limiti dello studio concernono la verifica che il gradiente di nitrati, una volta formatosi, rimanga effettivamente stabile nel tempo, uniforme in tutte le file di pozzetti che compongono il chip e in linea con i risultati ottenuti dalla simulazione computazionale. Per questo motivo sarebbe necessario poter monitorare in tempo reale la dinamica con cui evolve nel tempo la diffusione del nutriente. Ciò sarà reso possibile nelle prossime prove sperimentali attraverso dei marcatori inerti e fluorescenti: i destrani.

Altre limitazioni interessano la mancata formazione del gradiente nella sezione del chip esposta a bassa luce, dovuta probabilmente a particolari fenomeni creati in prossimità degli ingressi, e l'utilizzo delle correlazioni concentrazione vs. fluorescenza massima, specifiche di ciascun irraggiamento, fin dall'istante iniziale della crescita. L'inoculo, tuttavia, è stato preparato a partire da cellule ambientate in beuta a media luce ( $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e fatte poi crescere anche ad altre

intensità luminose, pertanto, fino all'adattamento al nuovo flusso luminoso, non sarebbe possibile associare i valori di fluorescenza alla sola crescita e, a rigore, sarebbe necessario, ai fini del calcolo delle concentrazioni, passare da una retta di taratura all'altra, conoscendo la dinamica con cui evolve il contenuto della clorofilla al variare dell'irraggiamento.

I possibili sviluppi futuri riguardano il monitoraggio della crescita microalgale per concentrazioni di nitrati superiori a quella massima prevista dagli esperimenti condotti in questa tesi, in modo da verificare che l'andamento dei tassi di crescita e delle concentrazioni allo stazionario siano in linea con i risultati fin qui ottenuti. Altri possibili progressi futuri interessano lo studio degli effetti sulla crescita di altri nutrienti, quali p.es. fosfati ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), e la possibilità di condurre esperimenti a diverse temperature, sfruttando (previa verifica) le potenzialità del dispositivo creato: i fori presenti nella parte inferiore dell'unità di chiusura atti a far scorrere acqua di raffreddamento per mantenere il sistema alla temperatura ottimale.





# Appendice A

## Terreno di coltura

Il mezzo di coltura utilizzato da *Nannochloropsis gaditana* (f/2) è costituito da una base di sale marino (32 g/l) e soluzione tampone Tris-HCl (pH 8) in concentrazione 40 mM più una soluzione di arricchimento (Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975) descritta in Tabella A.1.

**Tabella A.1:** Composizione della soluzione di arricchimento utilizzata nella preparazione del mezzo di coltura per *Nannochloropsis gaditana*.

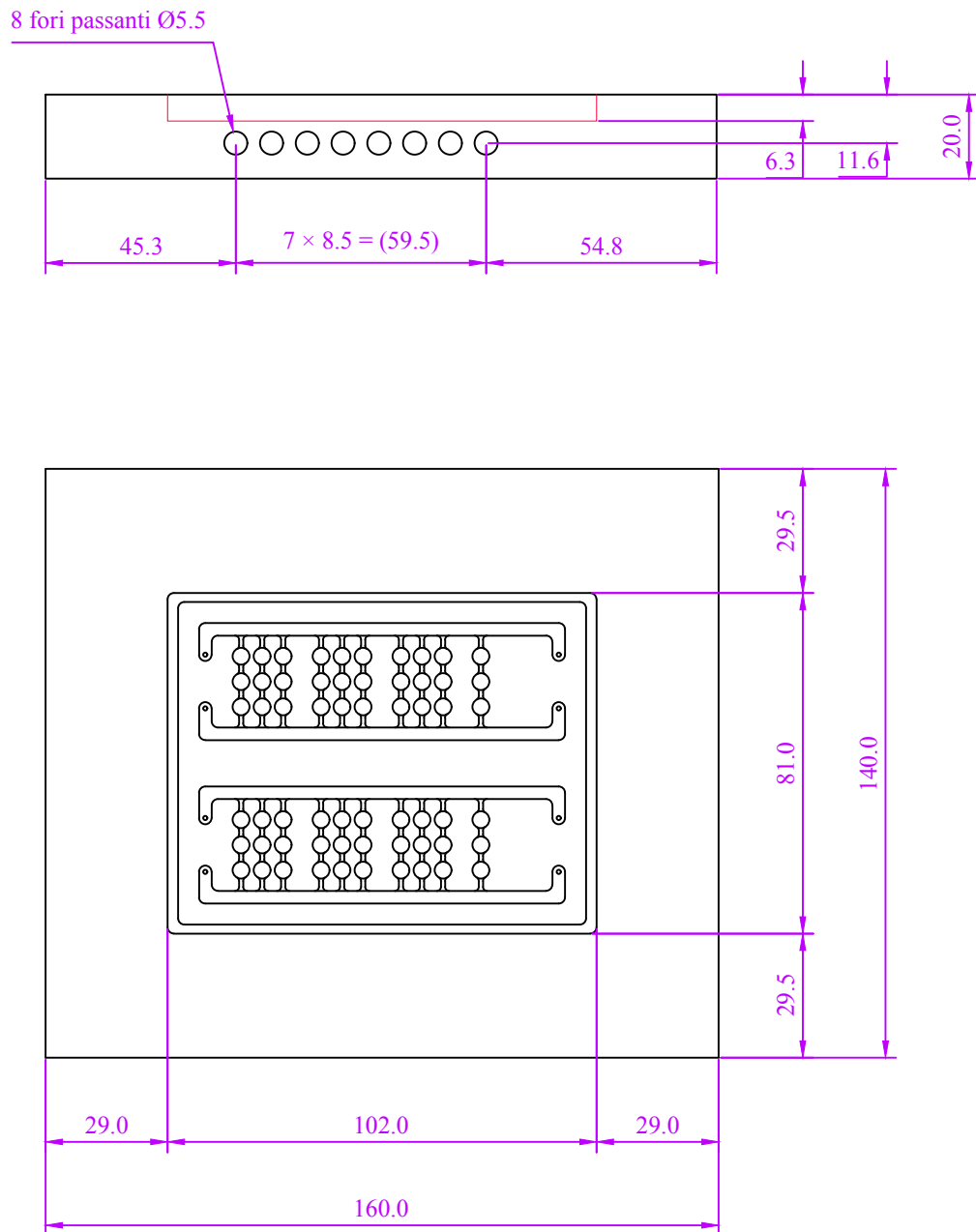
Componenti	Quantità
Acqua di mare naturale filtrata-sterile	1000 mL
<i>Nutrienti principali</i>	
NaNO <sub>3</sub>	75 mg/L
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	5 mg/L
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9 H <sub>2</sub> O	30 mg/L
<i>Tracce</i>	
Na <sub>2</sub> · EDTA	4.36 mg/L
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	3.15 mg/L
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.01 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.022 mg/L
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.01 mg/L
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0.18 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.006 mg/L
<i>Vitamine</i>	
Tiamina · HCl	0.1 mg/L
Biotina	0.5 µg/L
B <sub>12</sub>	0.5 µg/L



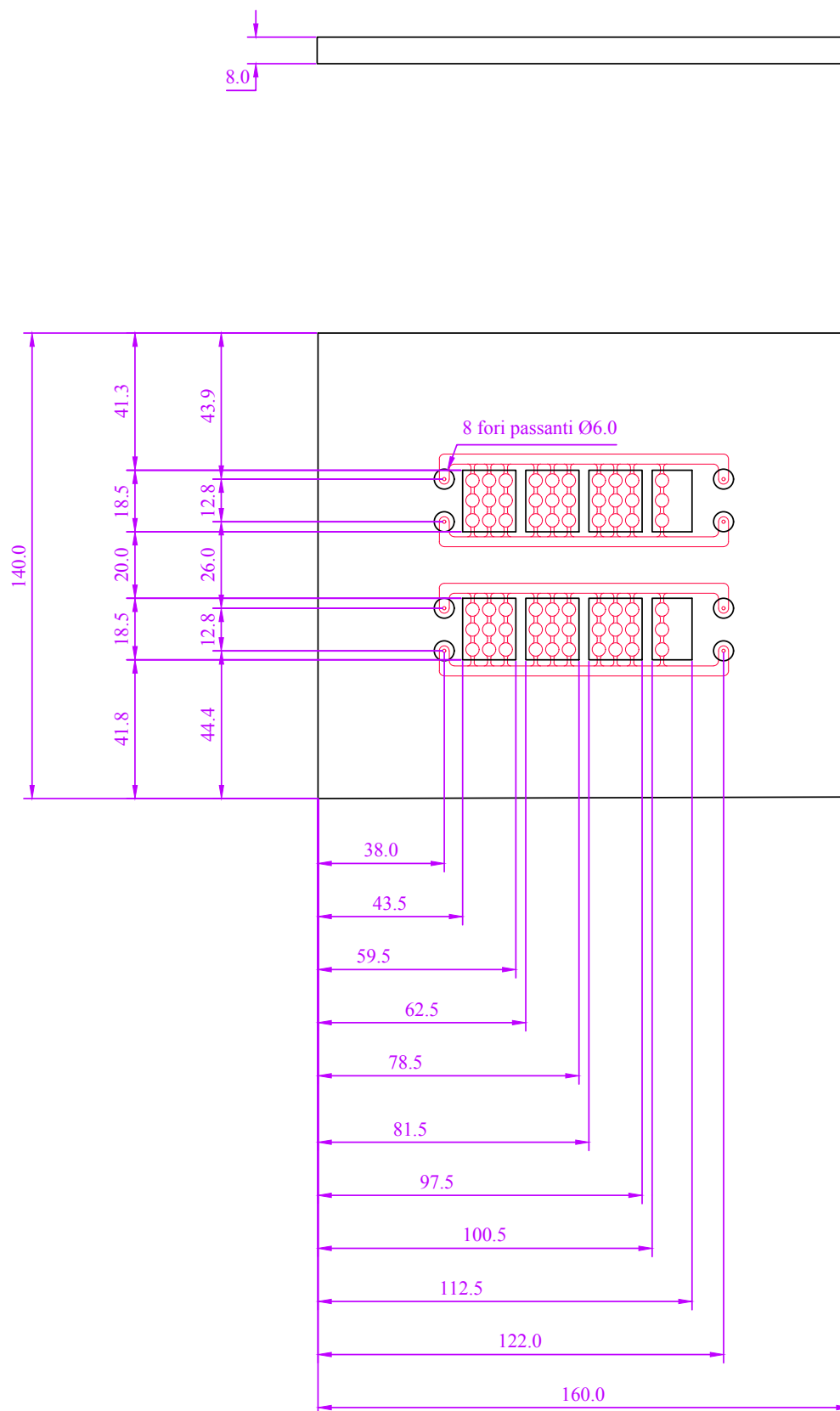
# Appendice B

## Progetto meccanico dell'unità di chiusura

Si riportano, in Figura B.1 e B.2, i disegni quotati inerenti il progetto meccanico dell'unità di chiusura finale utilizzata negli esperimenti condotti in questo studio.



**Figura B.1:** Disegno meccanico, in AutoCAD<sup>®</sup>, relativo alla parte inferiore dell'unità di chiusura.



**Figura B.2:** Disegno meccanico, in AutoCAD<sup>®</sup>, relativo alla parte superiore dell'unità di chiusura.



# Appendice C

## Fitting dei dati sperimentali

Raccolta contenente le rappresentazioni grafiche relative ai fitting delle curve di crescita ottenute dall'elaborazione dei dati sperimentali.

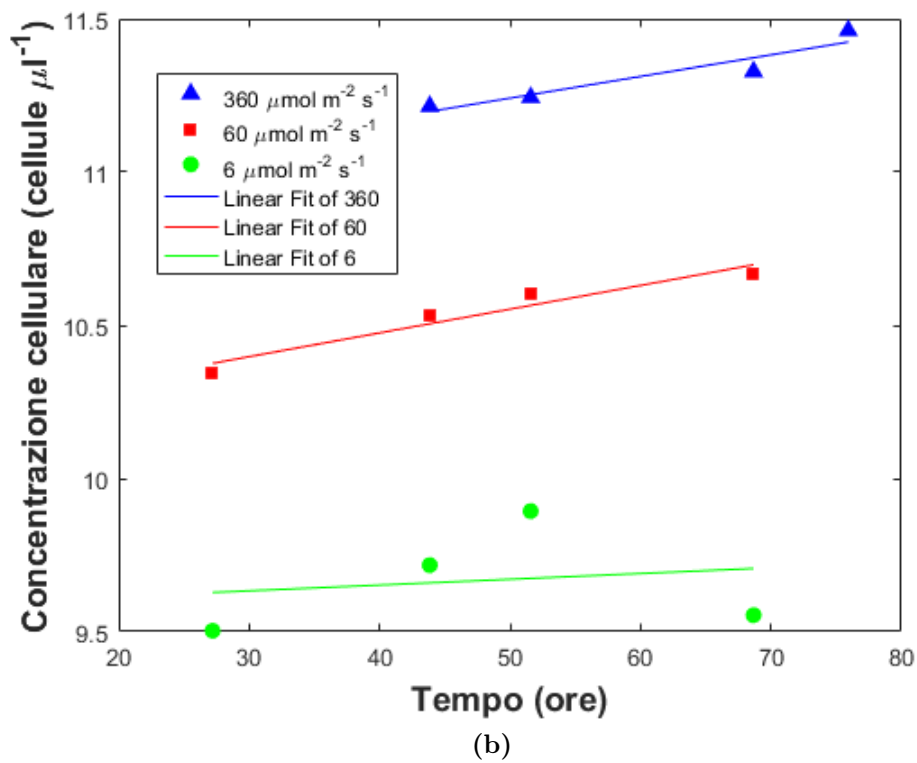
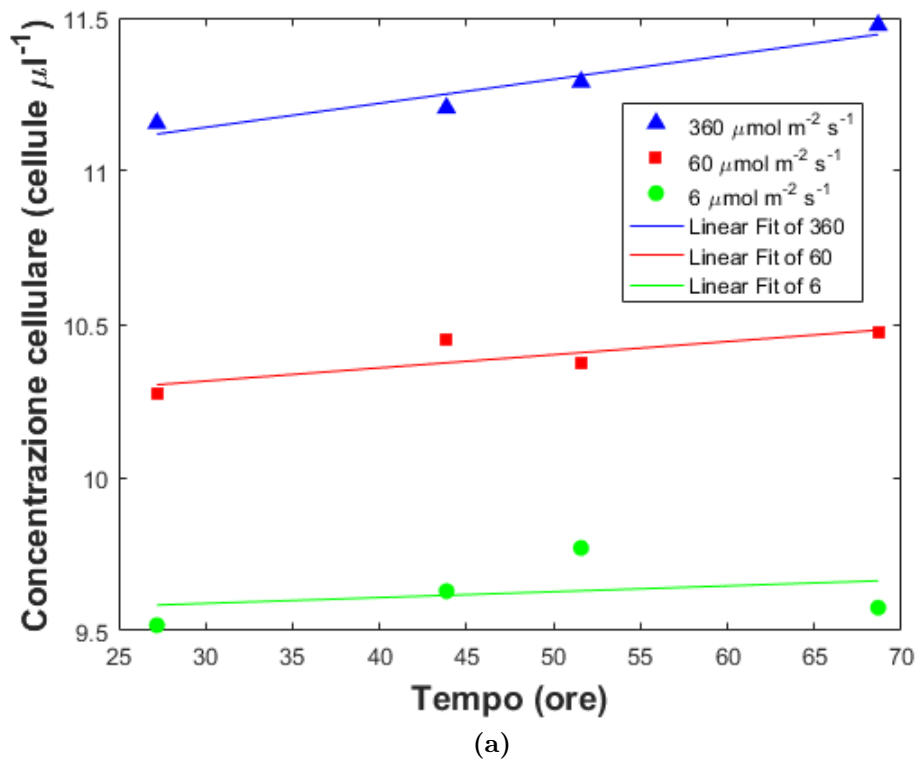


Figura C.1: Fitting lineare relativo alle curve di crescita in flusso continuo (a) e discontinuo (b) di nutrienti.



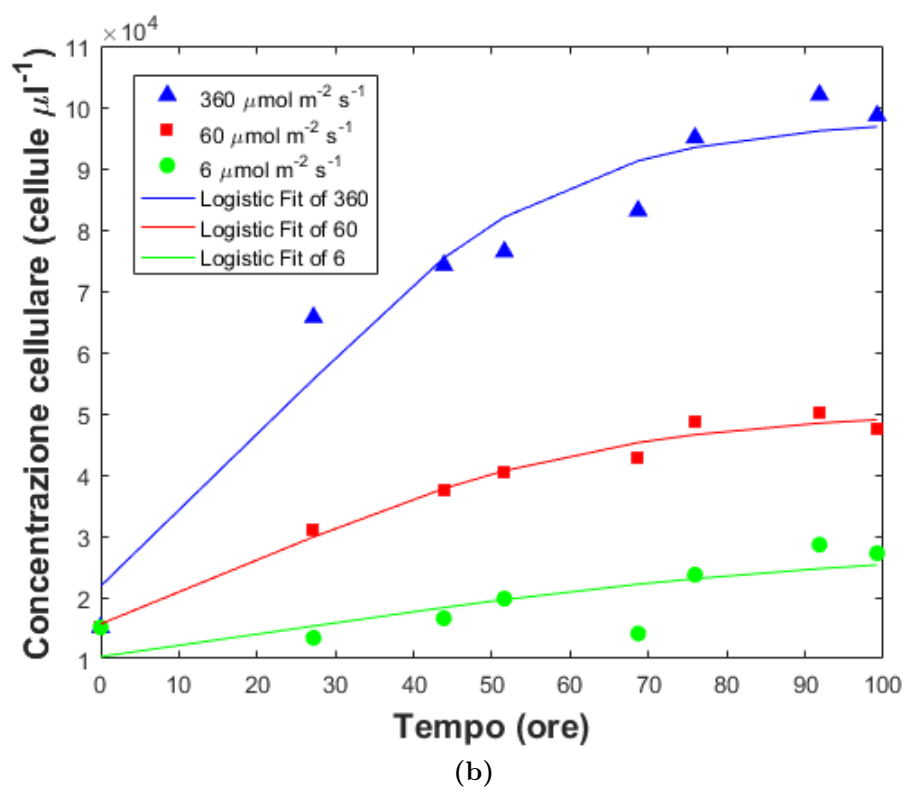
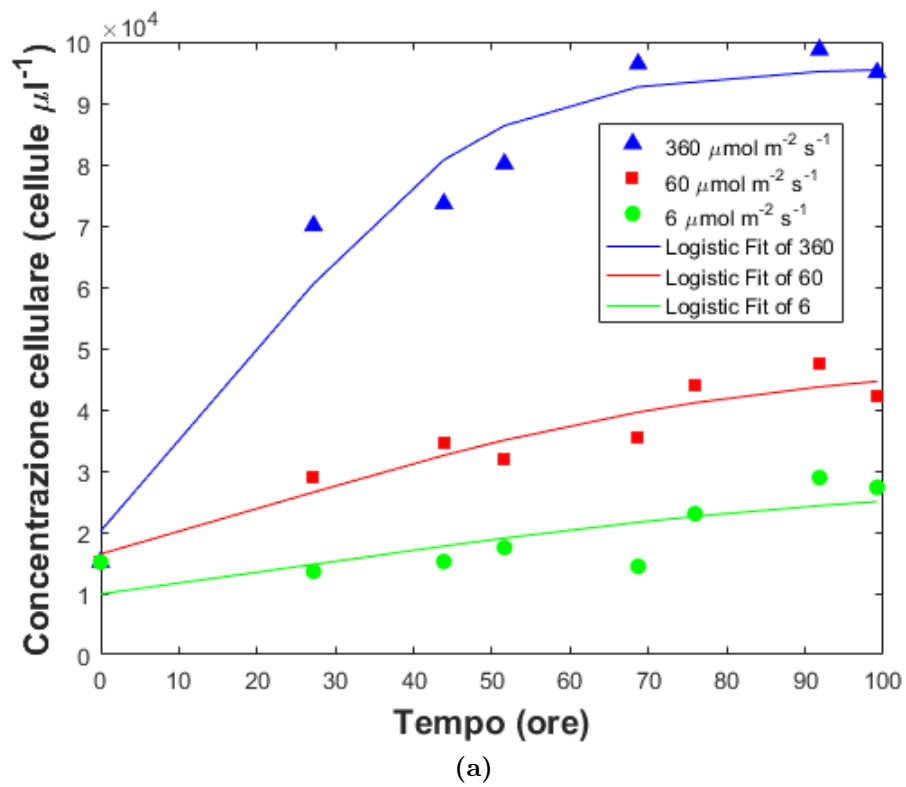
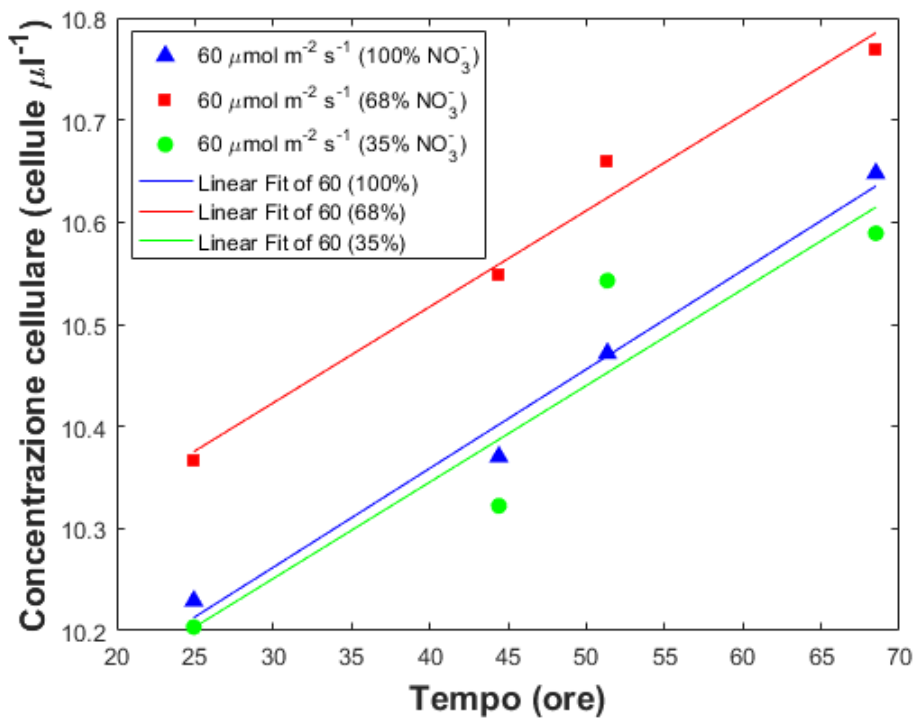
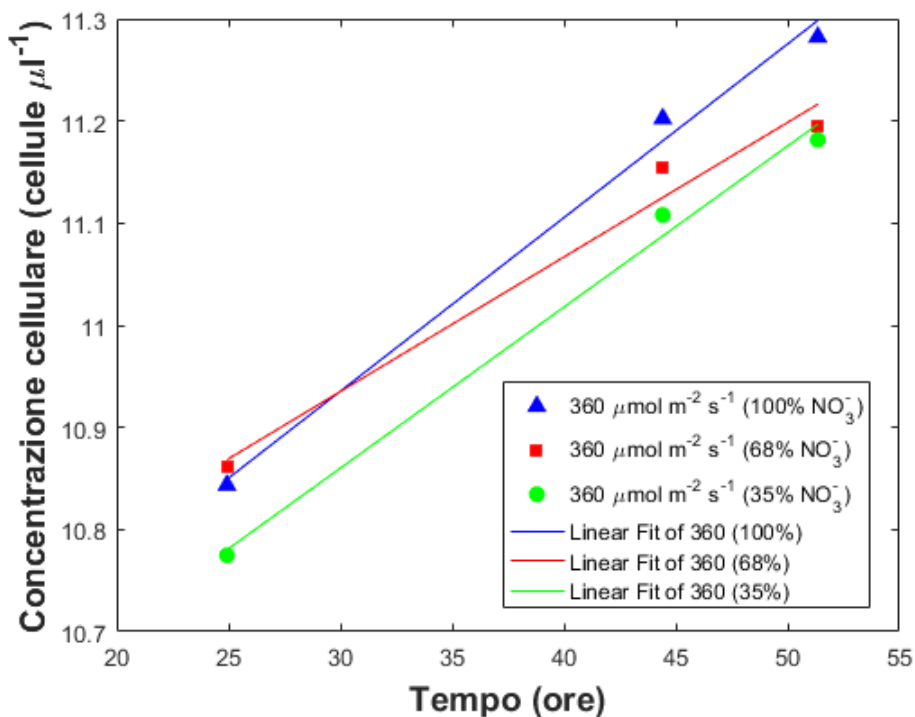


Figura C.2: Fitting logistico relativo alle curve di crescita in flusso continuo (a) e discontinuo (b) di nutrienti.

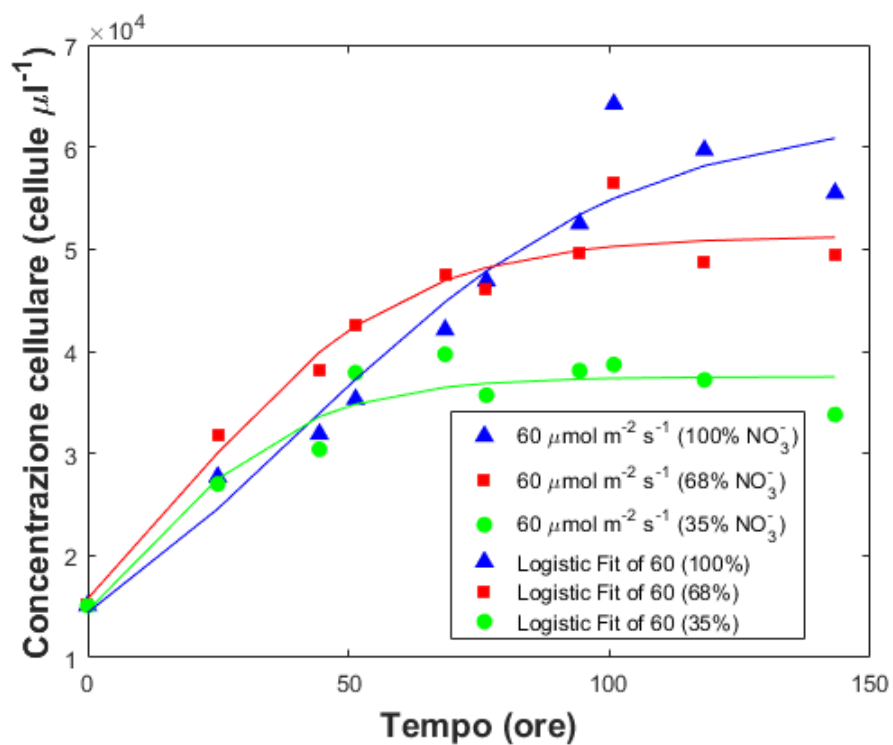


(a)

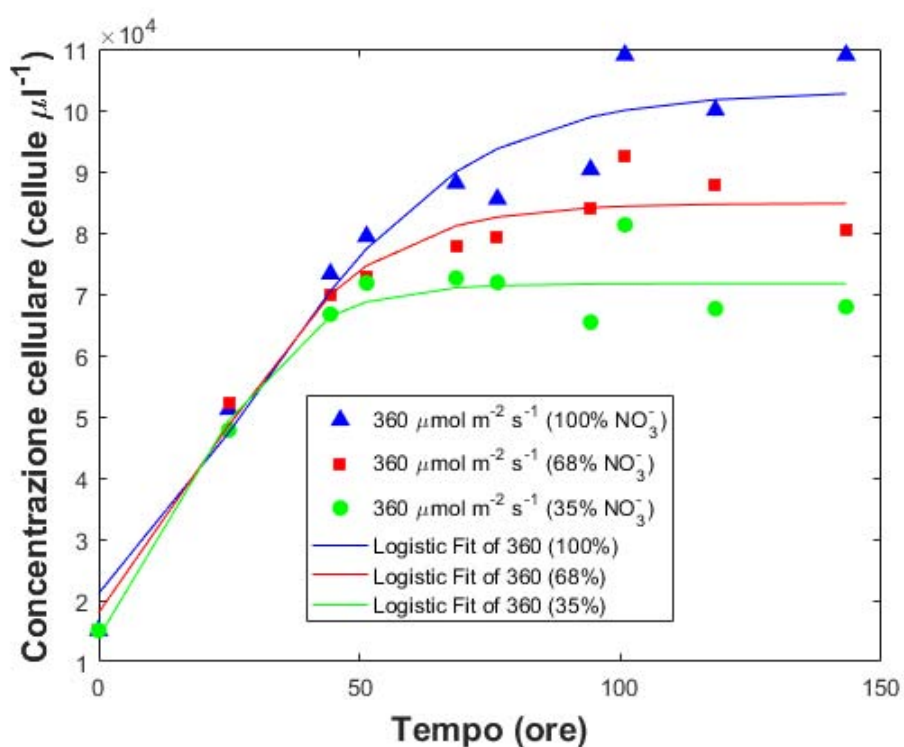


(b)

**Figura C.3:** Fitting lineare relativo alle curve di crescita con gradiente, valutate a  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (a) e  $360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (b), parametrizzate in della funzione concentrazione di nitrati.



(a)



(b)

Figura C.4: Fitting logistico relativo alle curve di crescita con gradiente, valutate a  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (a) e  $360 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (b), parametrizzate in funzione della concentrazione di nitrati.



# Bibliografia

- Amaro, H. M., A. C. Guedes e F. X. Malcata (2011). «Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel». In: *Applied Energy* **88**, pp. 3402–3410.
- Amicarelli, V., A. Paiano e L. Lobefaro (2012). *Le microalghe nel settore dei biocombustibili. Sviluppo e sostenibilità*. URL: <http://www.enea.it/it/pubblicazioni/EAI/anno-2012/n.-2-marzo-aprile-2012/le-microalghe-nel-settore-dei-biocombustibili.-sviluppo-e-sostenibilita> (visitato il 26/09/2016).
- Barbato, F. (2009). *Tecniche di coltura di microalghe*. URL: [http://old.enea.it/produzione\\_scientifica/pdf\\_brief/Barbato\\_Microalghe.pdf](http://old.enea.it/produzione_scientifica/pdf_brief/Barbato_Microalghe.pdf) (visitato il 22/09/2016).
- Brennan, L. e P. O. Martins (2009). «Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products». In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **14**, pp. 557–577.
- Cheirsilp, B. e S. Torpee (2012). «Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation». In: *Bioresource Technology* **110**, pp. 510–516.
- ELVESYS R&D team (2015a). *Harvard Apparatus PHD ULTRA advanced syringe pump : a review*. URL: <http://www.elfeflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/syringe-pumps-and-microfluidics/pulseless-syringe-pump-for-microfluidics/short-review-about-harvard-apparatus-phd-ultra-advanced-syringe-pump/> (visitato il 26/09/2016).
- (2015b). *Introduction to lab-on-a-chip 2015 : review, history and future*. URL: <http://www.elfeflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/introduction-to-lab-on-a-chip-2015-review-history-and-future/> (visitato il 26/09/2016).

- ELVESYS R&D team (2015c). *Microfluidic for cell biology: concepts and methodologies*. URL: <http://www.elflow.com/microfluidic-tutorials/cell-biology-imaging-reviews-and-tutorials/microfluidic-for-cell-biology/concepts-and-methodologies/> (visitato il 26/09/2016).
- (2015d). *Microfluidics: a general overview of microfluidics*. URL: <http://www.elflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/microfluidics/> (visitato il 26/09/2016).
- (2015e). *Microfluidics and microfluidic devices: a review*. URL: <http://www.elflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/microfluidics-and-microfluidic-device-a-review/> (visitato il 26/09/2016).
- (2015f). *PDMS : a review*. URL: <http://www.elflow.com/microfluidic-tutorials/microfluidic-reviews-and-tutorials/the-poly-dimethyl-siloxane-pdms-and-microfluidics/> (visitato il 26/09/2016).
- (2015g). *PDMS in biology research: a critical review on pdms lithography for biological studies*. URL: <http://www.elflow.com/microfluidic-tutorials/cell-biology-imaging-reviews-and-tutorials/microfluidic-for-cell-biology/pdms-in-biology-researches-a-critical-review-on-pdms-lithography-for-biological-studies/> (visitato il 26/09/2016).
- Giuliano, G., O. Demurtas e P. Ferrante (2013). *Le microalghe come bio-fabbriche per composti ad elevato valore aggiunto*. URL: <http://www.enea.it/it/publicazioni/EAI/anno-2013/biotecnologie-per-lo-sviluppo-sostenibile/le-microalghe-come-bio-fabbriche-per-composti-ad-elevato-valore-aggiunto> (visitato il 22/09/2016).
- Lee, Y. K. (2016). «Microalgae Cultivation Fundamentals». In: *Algae Biotechnology - Products and Processes*. A cura di Faizal Bux e Yusuf Chisti, pp. 1–18.
- Masojídek, J., M. Koblížek e G. Torzillo (2004). «Photosynthesis in Microalgae». In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. A cura di Amos Richmond. Blackwell Science, pp. 20–37.
- Mata, T. M., A. A. Martins e N. S. Caetano (2010). «Microalgae for biodiesel production and other applications: A review». In: *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, pp. 217–232.
- Monetti, F. (2016). «Sviluppo di micro-fotobioreattori per la crescita di microalghe». *Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Industriali*. Università degli Studi di Padova.

- Özçimen, D., M. Ö. Gülyurt e B. İnan (2016). «Algal Biorefinery for Biodiesel Production». In: *BIODIESEL - Feedstocks, Production and Applications*. A cura di Zhen Fang, pp. 25–48.
- Panigrahi, P. K. (2016). *TRANSPORT PHENOMENA IN MICROFLUIDIC SYSTEMS (1<sup>st</sup> ed.)* Wiley.
- Perin, G., E. Cimetta, F. Monetti, T. Morosinotto e F. Bezzo (2016). «Novel micro-photobioreactor design and monitoring method for assessing microalgae response to light intensity». In: *Algal Research* **19**, pp. 69–76.
- Proto Labs (2016). *Stereolitografia*. URL: <http://www.protolabs.it/3d-printing/stereolithography/> (visitato il 26/09/2016).
- PSI (2009). *FLUORCAM - Instruction Manual*.
- Schneider, R. C. S., T. R. Bjerk, P. D. Gressler, M. P. Souza, V. A. Corbellini e E. A. Lobo (2016). «Potential Production of Biofuel from Microalgae Biomass Produced in Wastewater». In: *BIODIESEL - Feedstocks, Production and Applications*. A cura di Zhen Fang, pp. 3–16.
- Sharqawy, M. H., J. H. Lienhard V e S. M. Zubair (2010). «Thermophysical properties of seawater: A review of existing correlations and data». In: *Desalination and Water Treatment* **16**, pp. 354–380.
- Sighicelli, M. (2010). «Impatto degli stress biotici e abiotici sulla risposta fotochimica delle piante: analisi d'immagine dell'emissione di fluorescenza della clorofilla». *Tesi di Dottorato di Ricerca in Ecologia Forestale*. Università degli Studi della Tuscia.
- Taiz, L. e E. Zeiger (2010). *PLANT PHYSIOLOGY (5<sup>th</sup> ed.)* Sinauer Associates Inc.
- TC Direct (2016). *Termocoppia di piccolo diametro diam. 0,25, 0,50 e 0,75 mm con spina mini*. URL: [http://www.tcdirect.it/Default.aspx?level=2&department\\_id=200/2](http://www.tcdirect.it/Default.aspx?level=2&department_id=200/2) (visitato il 26/09/2016).
- Waggoner, B. (1995a). *Introduction to the Chromista*. URL: <http://www.ucmp.berkeley.edu/chromista/chromista.html> (visitato il 26/09/2016).
- (1995b). *Introduction to the Chrysochyta*. URL: <http://www.ucmp.berkeley.edu/chromista/chrysochyta.html> (visitato il 26/09/2016).
- (1995c). *Introduction to the Cyanobacteria*. URL: <http://www.ucmp.berkeley.edu/bacteria/cyanointro.html> (visitato il 26/09/2016).
- (1995d). *Introduction to the "Green Algae"*. URL: <http://www.ucmp.berkeley.edu/greenalgae/greenalgae.html> (visitato il 26/09/2016).
- (1995e). *Introduction to the Rhodophyta*. URL: <http://www.ucmp.berkeley.edu/protista/rhodophyta.html> (visitato il 26/09/2016).

- WIKA Alexander Wiegand SE & Co (2016). *Applicazione delle termocoppie*. URL: [http://de-de.wika.de/upload/DS\\_IN0023\\_it\\_it\\_54291.pdf](http://de-de.wika.de/upload/DS_IN0023_it_it_54291.pdf) (visitato il 26/09/2016).
- Wolkers, H., M. Barbosa, D. Kleinegris, R. Bosma e R. H. Wijffels (2011). *Microalgae: the green gold of the future? : large-scale sustainable cultivation of microalgae for the production of bulk commodities*. URL: [http://www.groenegrondstoffen.nl/downloads/Boekjes/12Microalgae\\_UK.pdf](http://www.groenegrondstoffen.nl/downloads/Boekjes/12Microalgae_UK.pdf) (visitato il 22/09/2016).
- Yeesang, C. e B. Cheirsilp (2011). «Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand». In: *Bioresource Technology* **102**, pp. 3034–3040.