

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**

**BILANCI DI POPOLAZIONE DI UNA COLTURA
MICROALGALE IN FOTOBIOREATTORI: SIMULAZIONI
NUMERICHE E VALIDAZIONE SPERIMENTALE**

Relatore: Prof. Alberto Bertucco

Correlatori: Ing. Matteo Strumendo

Dott.ssa Eleonora Sforza

Laureanda: VALENTINA FIORENZATO

ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014

Riassunto

Il lavoro di tesi si è sviluppato in due attività correlate: è stato approfondito lo studio della dinamica di crescita di una coltura microalgale attraverso la raccolta di dati sperimentali e, successivamente, grazie allo sviluppo di un modello matematico basato su un'equazione di bilancio di popolazione, è stato fornito un quadro razionale che permette di comprendere e controllare la coltivazione delle microalghe nei sistemi di reazione.

Sono state svolte alcune prove sperimentali presso i laboratori del Dipartimento di Ingegneria Industriale, utilizzando dei fotobioreattori di scala ridotta batch e chemostat; durante queste prove sono stati raccolti dati di concentrazione di biomassa, sia in numero che in peso, e di distribuzione di dimensioni delle cellule.

In condizioni di crescita batch si sono indagate due diverse intensità di luce incidente, $150 \mu\text{mol di fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $350 \mu\text{mol di fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mentre in condizioni di crescita continue si è indagata l'intensità di luce a $150 \mu\text{mol di fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a tre diversi tempi di permanenza.

I dati raccolti sono stati, in seguito, sfruttati per stimare i parametri presenti nei modelli matematici utilizzati per rappresentare la cinetica di crescita di una singola cellula e i termini di nascita/morte per divisione cellulare, da inserirsi nell'equazione di bilancio di popolazione.

Indice

INTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1 - Le microalghe come fonte di energia	3
1.1 Introduzione: situazione energetica e ambientale e successivo sviluppo di biocombustibili	3
1.2 Le microalghe.....	7
1.4.2 Fasi di crescita delle microalghe	8
1.4.3 Fattori che influenzano la crescita delle microalghe	9
1.4.4 La luce	10
1.4.1.1 Processo di fotosintesi.....	10
1.4.1.2 Influenza della luce sulla coltivazione di microalghe.....	12
1.2.1 Vantaggi e criticità connessi all'uso di alghe come fonte energetica	13
1.3 Sistemi di coltura per le microalghe.....	17
1.3.1 Open ponds.....	18
1.3.2 Fotobioreattori	19
1.4 I processi di trattamento e trasformazione delle microalghe.....	21
1.5 Obiettivo di tesi	25
CAPITOLO 2 - Bilanci di popolazione di una coltura microalgale	27
2.1 Introduzione	27
2.2 La struttura generale di un bilancio di popolazione	29
2.3 La modellazione di colture microalgali.....	29
2.3.1 La distribuzione degli stati cellulari	31
2.3.2 Sviluppo delle equazioni di bilancio di popolazione.....	32
2.4 Velocità di crescita di una cellula	36
2.4.1 Cinetica di Monod	37
2.4.2 Cinetica di Blanckman.....	38

2.4.3 Cinetica di Moser.....	38
2.4.4 Cinetica di Bertalanffy.....	38
2.5 Probabilità specifica di divisione	39
2.6 Distribuzione degli stati di nascita	41
2.7 Intensità di morte.....	43
2.8 Alcune proprietà dei bilanci di popolazione	43
CAPITOLO 3 - Attività sperimentale	47
3.1 Materiali e metodi	47
3.1.1 Specie utilizzata.....	47
3.1.2 Terreni di coltura	48
3.1.3 Apparecchiature.....	49
3.1.3.1 Lampade.....	52
3.1.4 Metodi di misurazione e strumentazione.....	52
3.1.4.1 Misura di densità ottica.....	52
3.1.4.2 Conta cellulare	54
3.1.4.3 Peso secco	55
3.1.4.4 Distribuzione di massa.....	56
3.1.4.5 Misura di densità di una singola cellula.....	59
3.1.5 Procedure.....	60
3.2 Risultati sperimentali e discussione	62
3.2.1 Dati raccolti per l'esperimento batch a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	62
3.2.2 Dati raccolti per gli esperimenti batch a $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	68
3.2.3 Dati raccolti per l'esperimento continuo a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	74
3.2.3.1 Profili di produttività.....	80
CAPITOLO 4 - Modellazione matematica della cinetica di crescita di una cellula.....	85
4.1 Cinetica di crescita di una singola cellula	85
CAPITOLO 5 - Metodi numerici.....	93
5.1 Metodi numerici per la risoluzione di bilanci di popolazione.....	93

5.2 Descrizione del metodo FCMOM	95
5.2.1 Sviluppo delle equazioni implementate in Matlab	95
5.2.2 Termini di crescita, di nascita/morte per divisione e di washout	100
5.2.3 Bilanci di materia dei nutrienti e modello di attenuazione della luce	101
CAPITOLO 6 - Risultati e discussione	103
6.1 Simulazioni dell'esperimento batch a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	104
6.1.1 Simulazione a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ senza dipendenza da substrati	112
6.2 Simulazioni del primo esperimento batch a $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	113
6.3 Simulazioni del secondo esperimento batch a $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	120
6.4 Simulazioni dell'esperimento in continuo a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	122
6.5 Sintesi	128
CONCLUSIONI	129
NOMENCLATURA	131
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	135

Introduzione

Negli ultimi anni, tra gli argomenti che trovano ampi spazi di discussione non solo in ambito scientifico ma anche in ambito politico e sociale, vi sono la progressiva riduzione delle riserve di combustibili fossili e la gravità dell'inquinamento che essi provocano.

Di fronte a questo scenario di incertezza dell'attuale approvvigionamento energetico e alla luce di una futura crescita della domanda di energia, diventa cruciale ridurre l'impiego dei combustibili tradizionali, ancor prima del loro effettivo esaurimento.

Tra le possibili soluzioni che possono essere adottate, vi è la promozione e lo sviluppo di fonti di energia pulita e rinnovabili, come i biocarburanti. Dopo l'introduzione dei biocombustibili di prima e seconda generazione, vengono ora studiati quelli di terza generazione prodotti a partire dalle microalghe.

Le microalghe sono organismi fotosintetici che utilizzano la luce, l'anidride carbonica e altri nutrienti disciolti in acqua per la sintesi di molecole complesse, come i carboidrati e i lipidi; sono considerate tra le biomasse più promettenti da sfruttare a scopi energetici in quanto possiedono diversi vantaggi come la richiesta di minori superfici di coltivazione, che riduce di conseguenza l'impatto sul mercato dei prodotti alimentari, e la caratteristica di avere delle rese di produzione di oli convertibili in biodiesel sensibilmente più alte rispetto a quelle di altre specie vegetali.

Al momento la produzione di biomassa algale non è ancora diffusa su scala industriale a causa di diverse problematiche importanti non ancora risolte: tra queste vi è l'ottimizzazione dei sistemi di coltura, in particolare dei fotobioreattori, che risultano come la tecnologia più promettente da utilizzare per una produzione su larga scala.

In quest'ottica si inserisce il lavoro di questa Tesi: la crescita di una coltura di microalghe in un fotobioreattore da laboratorio, operante sia in condizioni batch sia continue, viene prima approfondita attraverso la raccolta di dati sperimentali e, in seguito, modellata da un'equazione di bilancio di popolazione; l'obiettivo è di riuscire ad elaborare un modello predittivo che sia in grado di descrivere in modo razionale i principali fenomeni coinvolti e che possa essere usato per ottimizzare il processo di produzione senza dover necessariamente svolgere nuove prove sperimentali.

La Tesi si struttura in sei capitoli.

Nel primo capitolo viene delineata la situazione energetica globale. Si descrivono le microalghe come possibile fonte di energia alternativa, assieme ai vantaggi e alle criticità che comportano; si illustrano i sistemi di produzione e i processi di *downstream* a cui la biomassa algale può essere sottoposta (come ad esempio quello di produzione di olio da convertire in biodiesel).

Nel secondo capitolo viene sviluppato il bilancio di popolazione utilizzato per rappresentare la dinamica di crescita di una coltura algale in fotobioreattori batch e chemostat; si riportano, inoltre, i modelli matematici, da inserirsi nell'equazione di bilancio, per riprodurre i termini di nascita/morte per divisione cellulare, mentre la cinetica di crescita di una singola cellula viene presentata in modo dettagliato, separatamente, nel capitolo 4 dopo i risultati sperimentali.

Nel terzo capitolo viene esposta l'attività sperimentale svolta: in una prima sezione si descrivono la specie algale studiata, le analisi condotte e la relativa strumentazione impiegata, mentre nella seconda si riportano i dati sperimentali raccolti durante le diverse prove svolte.

Nel quinto capitolo si introduce il metodo numerico FCMOM, applicato per risolvere l'equazione di bilancio e vengono raccolte tutte le equazioni matematiche implementate nel software Matlab[®].

Nel sesto capitolo, infine, si riportano e si discutono i risultati ottenuti dalle simulazioni a confronto con i dati sperimentali, i quali vengono, inoltre, sfruttati per stimare alcuni dei parametri presenti nei modelli matematici impiegati per descrivere i processi di crescita, nascita e divisione cellulare.

La Tesi si conclude con alcune considerazioni finali sul lavoro svolto e una breve descrizione dei possibili sviluppi futuri.

Capitolo 1

Le microalghe come fonte di energia

In questo capitolo si illustra brevemente l'attuale situazione energetica, gravata da risorse di origine fossile ormai in via di esaurimento e da un incremento delle emissioni di gas ad effetto serra.

Dopo lo sviluppo dei biocarburanti di prima e seconda generazione, particolare attenzione viene ora rivolta nei confronti delle tecniche di terza generazione che prevedono, come materie prime per la produzione di biocombustibili, le microalghe.

Vengono quindi descritti i vantaggi di un loro utilizzo e le difficoltà che non sono ancora state risolte e che rendono al momento non fattibile una loro produzione su larga scala; viene successivamente fornito un quadro introduttivo riguardo i processi di coltivazione, di pretrattamento e trasformazione a cui possono essere sottoposte.

Il capitolo riporta infine l'obiettivo di tesi.

1.1 Introduzione: situazione energetica e ambientale e successivo sviluppo di biocombustibili

Negli ultimi anni, una delle problematiche principali di interesse, non solo in ambito scientifico ma anche in ambito politico e sociale, è la progressiva riduzione delle riserve di combustibili fossili.

Attualmente i combustibili fossili rappresentano ancora la più consistente fonte energetica di sfruttamento da parte dell'uomo: secondo i dati dell'ENEA (Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile) il loro contributo al soddisfacimento della domanda di energia è più dell'80% (www.enea.it). Questa percentuale si suddivide nel contributo maggiore dato dal petrolio, che ricopre una fetta di circa il 40%, in quello del carbone con il 25% e del gas naturale con il 20% (Brennan e Owende, 2010).

Non è possibile verificare la stima esatta delle giacenze di combustibili tradizionali, ma è evidente che, in futuro, queste diventeranno sempre più scarse: secondo i dati dell'EIA (U.S Energy Information Administration) nel caso di greggio si ipotizza l'esaurimento dai 24 ai 57 anni da oggi (www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/index.html). Il graduale consumo delle fonti di

origine fossile potrebbe essere compensato con l'apertura di nuovi pozzi ma nel corso degli ultimi anni si sono incontrate crescenti difficoltà nelle operazioni di estrazione e trasformazione.

Ai problemi citati precedentemente si aggiunge la gravità dell'inquinamento che i combustibili tradizionali causano. Essi possono avere un notevole impatto sull'ambiente – basti pensare alle perdite di petrolio dalle navi negli oceani che hanno causato il danneggiamento dell'ecosistema marino - ma l'aspetto più critico è la grande produzione dei cosiddetti gas serra denominati *greenhouse gas* (GHG). In Figura 1.1 viene mostrato ad esempio il profilo delle emissioni dei GHG (in milioni di tonnellate di CO₂ equivalente) dal 1990 al 2010 negli Stati Uniti.

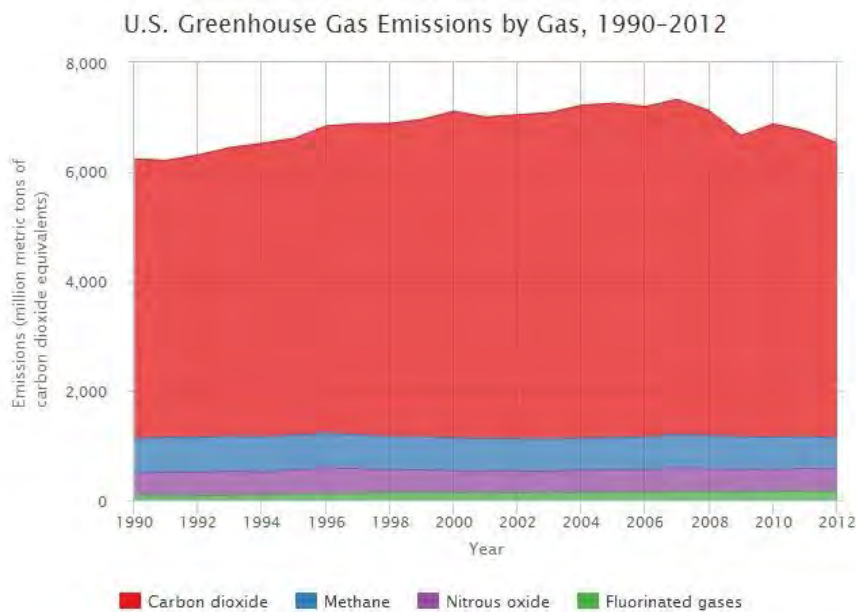


Figura 1.1. Profilo delle emissioni di gas serra in milioni di tonnellate equivalenti di CO₂ dal 1990 al 2012 negli Stati Uniti (www.epa.gov/climatechange/ghgemissions/usinventoryreport.html).

I gas serra rappresentano la maggiore causa del '*global warming*', ovvero dell'innalzamento della temperatura media vicino alla superficie terrestre in quanto tendono a trattenere il calore emesso dalla terra riscaldata dalla radiazione solare.

Negli ultimi anni, secondo i dati di EPA (United States Environmental Protection Agency) si è registrato un incremento di 0.7 °C a causa delle elevate concentrazioni di GHG in atmosfera e si prevede un ulteriore innalzamento fino a 6.4 °C nei prossimi 100 anni.

Tale fenomeno ha comportato cambiamenti climatici importanti come piogge più intense e inondazioni più frequenti; lo scioglimento dei ghiacciai ha causato, inoltre, un innalzamento del livello dei mari e il maggiore assorbimento della CO₂, presente in atmosfera, negli oceani ha determinato un abbassamento del loro livello di pH con conseguenze gravi sull'ecosistema marino (www.epa.gov/climatechange).

Il gas serra principale è l'anidride carbonica; l'agenzia ENEA stima che il superamento del limite di 450 ppm di CO₂ costituirebbe il punto di non ritorno dell'inquinamento globale e comporterebbe a cambiamenti climatici irreversibili. Da qui deriva la necessità di ridurre con urgenza l'impiego dei combustibili di origine fossile ancor prima dell'esaurimento dei relativi giacimenti.

Gli strumenti per soddisfare la crescente domanda di energia e la mitigazione dell'inquinamento ambientale e dei cambiamenti climatici sono il risparmio energetico, il miglioramento dell'efficienza energetica, la cattura e l'immagazzinamento della CO₂ e l'impiego di fonti energetiche rinnovabili.

Tra le fonti di energia alternativa, con le quali sostituire progressivamente quelle di origine fossile, iniziano a rivestire un ruolo sempre più importante i biocarburanti, ovvero i combustibili prodotti a partire da biomassa, come il bioetanolo e il biodiesel.

La biomassa è materiale vegetale o animale di origine recente (non geologica), disponibile su base rinnovabile; a differenza delle fonti fossili presenta il vantaggio di avere una velocità di produzione confrontabile con quella di consumo e di assorbire la CO₂ durante la fase di crescita.

I biocarburanti permettono, inoltre, di limitare le emissioni di gas serra; secondo le direttive 2009/28/CE e 2009/30/CE la riduzione deve essere almeno del 35% e dal gennaio 2017 almeno del 50%. In Tabella 1.1 si riportano le percentuali di riduzione standard delle emissioni dei GHG per diversi biocombustibili: si può osservare che il valore minimo del 35% non viene rispettato nel caso di etanolo da cereali e di biodiesel da semi di soia e di palma.

Tabella 1.1. Percentuali di riduzione standard delle emissioni di gas ad effetto serra (http://ec.europa.eu/energy/renewables/reports/reports_en.htm).

Biocarburante	Riduzione standard delle emissioni di gas ad effetto serra
Etanolo da cereali (combustibile di processo non specificato)	16%
Etanolo da barbabietola	52%
Etanolo da canna da zucchero	71%
Etanolo da paglia di cereali	85%
ETBE	50% del valore relativo all'etanolo
Biodiesel da semi di colza	38%
Biodiesel da semi di girasole	51%
Biodiesel da semi di soia	31%
Biodiesel da semi di palma	19%
Diesel Fischer Tropsch da residui legnosi	95%

Si possono distinguere tre tipologie di biocarburanti: i biocombustibili di prima, di seconda e di terza generazione (Brennan e Owende, 2010).

I biocarburanti di prima generazione vengono prodotti a partire da colture alimentari come il mais, il grano e la canna da zucchero o da oli vegetali. Questi combustibili presentano come vantaggi l'utilizzo di tecnologie di lavorazione disponibili a livello commerciale e una relativa competitività con i combustibili fossili, ma mostrano, tra le limitazioni più importanti, la competizione con la produzione di colture destinate al mercato alimentare che porterebbe ad un aumento del prezzo delle materie prime e il problema dell' *'indirect land use change'*. Ad esempio, qualora crescesse la domanda di bioetanolo da cereali, la zona di coltivazione dovrebbe aumentare e questo porterebbe ad una riduzione delle foreste e quindi della CO₂ assorbita. Al momento non esistono ancora dei modelli di previsione di tale fenomeno.

I biocarburanti di seconda generazione sono prodotti a partire da residui o scarti di processi alimentari, attività agricole o di silvicoltura; esempi di tecniche di seconda generazione sono la produzione di etanolo da lignocellulosa e la conversione enzimatica di oli vegetali. Nella maggior parte dei casi non vengono realizzati su scala industriale ma solo su scala ridotta, in particolare dove vi è una buona disponibilità di materiale ligneo-cellulosico di scarto. Questo rappresenta uno delle principali problematiche relative al loro utilizzo. Rispetto alla prima categoria presentano però il vantaggio della riduzione delle aree coltivate di produzione.

Infine, ci sono i biocarburanti di terza generazione, ricavati a partire dalle microalghe. A questa classe si presta ora un'attenzione sempre più crescente.

Le microalghe, come si illustrerà più approfonditamente nel seguito, sono organismi fotosintetici, che utilizzano l'anidride carbonica per produrre una vasta gamma di molecole, come i trigliceridi, i carboidrati e le proteine, convertibili in carburanti per autotrazione.

Inoltre, esse possono essere ingegnerizzate per realizzare farmaci, prodotti alimentari e cosmetici.

1.2 Le microalghe

Le microalghe sono organismi procarioti o eucarioti; possono avere struttura unicellulare o multicellulare e vivere singolarmente o riunite in colonie.

Questi microorganismi sono presenti in tutti gli ecosistemi della terra in quanto sono in grado di adattarsi a diverse condizioni ambientali. Sono più largamente diffusi in ambienti caratterizzati da acqua dolce e salata dove costituiscono la base della catena alimentare.

Oltre alla grande diffusione, sono caratterizzate da una grande biodiversità: esistono più di 50000 specie microalgali che si diversificano per la forma, il colore, le dimensioni e i meccanismi metabolici; un numero limitato, circa 4000 specie, viene studiato a fini energetici e si suddivide essenzialmente in procarioti (Cyanobacteria), eucarioti (Chlorophyta) e diatomee (Baccillariophyta) (Ghasemi *et al.*, 2012).

In Figura 1.2 sono state raggruppate diverse immagini di generi di alghe coltivate commercialmente; sotto ogni foto sono elencati gli attuali utilizzi principali: alcuni di questi generi vengono impiegati per accumulare lipidi, adatti alla produzione di biodiesel, altri invece per la produzione di molecole ad azione nutraceutica come acidi grassi omega-3 a catena lunga e carotenoidi.



Figura 1.2. Immagini di diversi generi di alghe con i loro rispettivi utilizzi commerciali (www.enea.it).

1.4.2 Fasi di crescita delle microalghe

Le microalghe, come le altre colture unicellulari, presentano una curva di crescita caratteristica quando vengono coltivate in condizioni batch. La crescita può essere suddivisa essenzialmente in 4 fasi, le quali possono risultare più o meno evidenti a seconda delle condizioni di coltura (Figura 1.3).

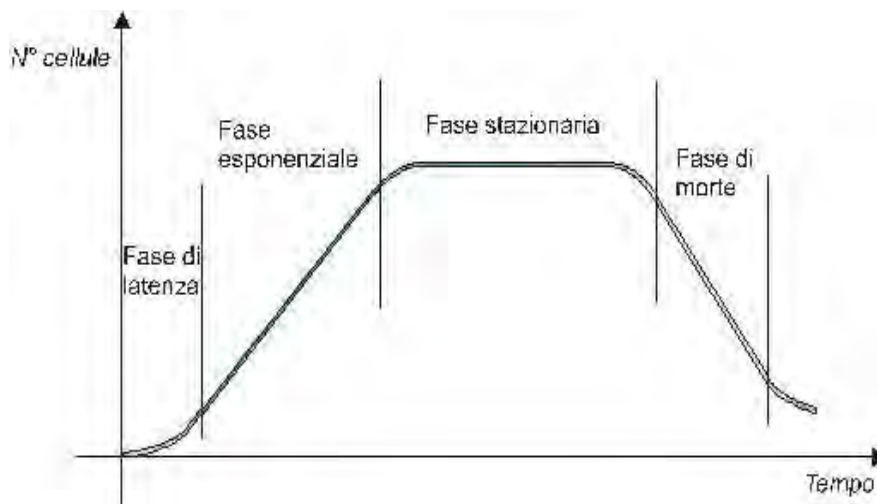


Figura 1.3. Schematizzazione di una curva caratteristica di crescita di microalghe in colture batch (<http://curba.racine.ra.it/local/biologia/ipertesto%20ridotto/curvacrescita.htm>).

Il processo inizia con un primo stadio di latenza (*fase lag*) durante il quale le microalghe tendono ad adattarsi alle nuove condizioni di crescita imposte, in particolare alla luce. Si

riscontra qui un consumo rapido dei nutrienti accompagnato però da una crescita lenta della concentrazione cellulare.

Alla fase lag segue quella esponenziale/logaritmica, durante la quale la concentrazione di biomassa tende ad aumentare in modo esponenziale in condizioni di substrato non limitante. In questo stadio si registra la velocità di crescita massima.

Poi, a causa del progressivo esaurimento dei nutrienti, le cellule iniziano a sospendere il processo di divisione e a morire; la concentrazione tende quindi ad assestarsi fino a raggiungere un valore costante nel momento in cui la velocità di divisione delle cellule eguaglia quella di morte.

La curva termina infine con uno stadio di morte durante il quale la coltura si esaurisce in seguito all'aumento della lisi cellulare.

1.4.3 Fattori che influenzano la crescita delle microalghe

Gli elementi vitali per la crescita delle microalghe sono la luce naturale o artificiale, l'anidride carbonica (di provenienza anche secondaria come da gas di scarico di centrali elettriche) e alcuni nutrienti disciolti in acqua come azoto, fosforo, potassio e ferro.

È inoltre necessario che ci sia un giusto equilibrio tra i diversi parametri come l'ossigeno, il pH, la temperatura e l'intensità di luce.

La crescita delle microalghe è influenzata quindi da diversi fattori raggruppabili in 3 categorie:

- fattori abiotici come luce, temperatura, concentrazione di nutrienti, O₂, CO₂, pH, salinità e presenza di sostanze tossiche;
- fattori biotici come presenza di patogeni quali batteri, funghi e virus;
- fattori operativi come spessore del reattore, mescolamento, tempo di residenza.

Una crescita ottimale richiede ad esempio un pH compreso tra 7 e 9, valore che può essere influenzato dalla quantità di CO₂ e di nutrienti presenti nel terreno di coltura, e temperature miti tra i 17°C e i 27°C. A temperature più basse il tasso di crescita delle microalghe si riduce mentre a temperature più alte si va incontro a morte cellulare (Ghasemi *et al.*, 2012).

Per garantire un'esposizione più omogenea alla luce ed evitare sedimentazione, il sistema di coltura può poi essere dotato di un agitatore; se il volume in gioco è piccolo, può invece essere sufficiente la sola aerazione di CO₂.

1.4.4 La luce

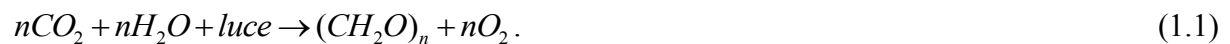
Tra le variabili che influenzano maggiormente la crescita, presentate precedentemente, quella più importante è la luce.

1.4.1.1 Processo di fotosintesi

La fotosintesi è un processo biochimico durante il quale le piante, come le alghe, producono sostanze organiche (principalmente carboidrati) a partire da carbonio inorganico presente in genere sottoforma di anidride carbonica e da acqua, utilizzando appunto come fonte di energia la luce.

Non tutta la luce viene sfruttata per il processo ma solo quella corrispondente alla porzione di spettro magnetico con lunghezze d'onda tra 400 nm e 700 nm. La radiazione appartenente a questo range viene chiamata 'fotosinteticamente attiva' ed è indicata con il termine PAR.

I meccanismi biochimici coinvolti possono essere riassunti con la seguente reazione generale:



Il processo di fotosintesi avviene all'interno di organuli chiamati cloroplasti (Figura 1.4). Questi sono composti da un sistema di membrane organizzato in strutture dette 'grana', ovvero sottoforma di pile di sacchetti appiattiti (tilacoidi) all'interno dei quali si trovano le molecole di clorofilla raggruppate in unità fotosistemiche.

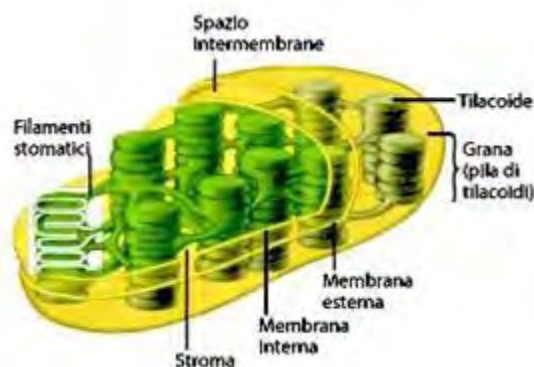


Figura 1.4 Sezione di un cloroplasto (http://www.itasruii.it/files/fotosintesi_clorofilliana_5.pdf).

I fotosistemi sono quindi un insieme di molecole di pigmento disposte in modo da circondare delle molecole di clorofilla speciali (clorofilla a). Tutte queste molecole sono in grado di catturare la luce ma solo quelle di clorofilla a sono in grado di passare ad uno stato eccitato che attiva la reazione fotosintetica: le molecole che hanno solo funzione di captazione sono dette 'antenna' mentre quelle che hanno funzione di attivazione della fotosintesi 'centri di reazione'.

L'energia luminosa viene pertanto assorbita da una delle molecole antenna e trasferita da un pigmento all'altro fino a raggiungere il centro di reazione.

Le conoscenze attuali indicano che nelle cellule vegetali ci sono due tipi di fotosistemi: il fotosistema I (PSI) e II (PSII).

Nel fotosistema II l'energia luminosa assorbita dai pigmenti del complesso antenna è trasferita a una molecola reattiva di clorofilla a detta P680 (P sta per pigmento e 680 è la lunghezza d'onda in nm di eccitazione della molecola): gli elettroni vengono così promossi da orbitali atomici a energia inferiore a orbitali atomici a energia superiore.

L'unità OEC (complesso evolvente ossigeno), parte integrante del fotosistema II, scinde quindi la molecola di acqua in un ossigeno, 2 protoni e 2 elettroni i quali andranno a sostituire quelli persi dalla clorofilla P680.

Gli elettroni liberati dal centro di reazione vengono invece immessi lungo una catena di trasporto costituita dalle seguenti molecole trasportatrici: plastochinone A, plastochinone B, complesso citocromo bf, plastocianina.

Durante il trasporto gli elettroni liberano energia (usata per immettere protoni dallo stroma, fluido in cui sono immersi i tilacoidi, all'interno della membrana tilocoidale) e giungono al fotosistema I che, come il secondario, per effetto della luce, ne ha persi. Le molecole di clorofilla a sono in questo caso eccitate da una lunghezza d'onda di 700 nm (la clorofilla è denominata quindi P700).

Gli elettroni liberati dal PSI vengono trasferiti alla proteina ferredossina (Fd) che riduce la molecola di NADP⁺ in NADPH. Il processo è chiamato ferredossina NADP reductasi.

I protoni invece liberati dalla fotolisi dell'acqua, assieme alla proteina di membrana ATP sintetasi, sintetizzano la molecola di ADP in ATP.

I meccanismi di reazione finora descritti (Figura 1.5) rientrano nella cosiddetta fase luminosa del processo fotosintetico in cui le molecole di ATP e NADPH rappresentano i prodotti finali.

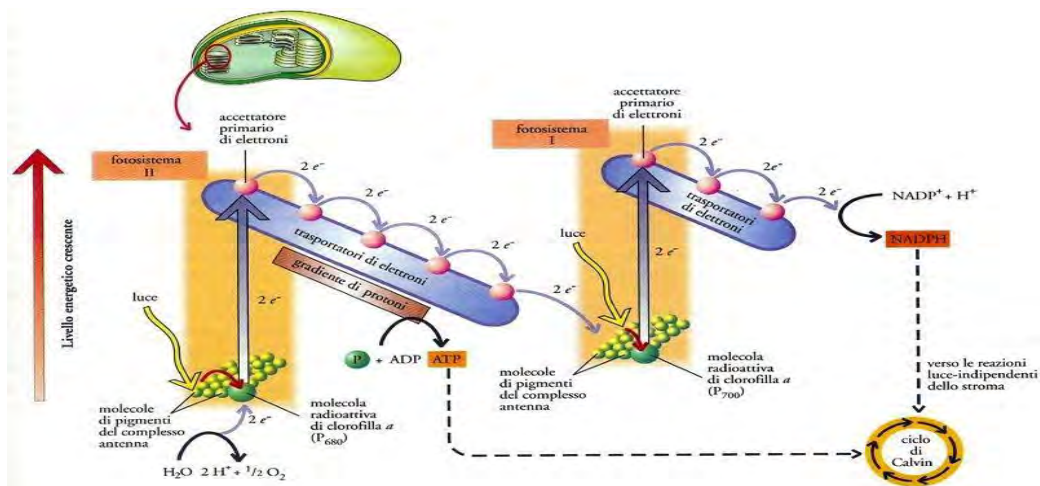
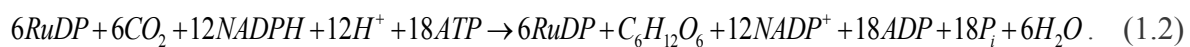


Figura 1.5. Rappresentazione della fase luminosa del processo fotosintetico all'interno di un tilacoide (http://www.itasruiu.it/files/fotosintesi_clorofilliana_5.pdf).

A questa fase segue quella al buio o di fissazione del carbonio, durante la quale l'ATP e l'NADPH vengono consumate secondo la reazione:



Da 2 molecole di gliceraldeide prodotte si forma quindi il glucosio, monomero di base per la costruzione di una catena carboidratica.

Al processo di fotosintesi si oppone poi quello di respirazione cellulare, ciclo ossidativo dei prodotti usati dalle piante come nutrienti. Durante questa fase viene liberata anidride carbonica.

1.4.1.2 Influenza della luce sulla coltivazione di microalghe

L'irradianza o l'intensità di luce fornita alle microalghe è definita come il flusso di fotoni che attraversa nel tempo la superficie di esposizione del bioreattore e viene espressa in genere con l'unità di misura $\mu\text{mol di fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

La luce, come si è già spiegato, è necessaria alla crescita della biomassa ma, se presente in eccesso, può danneggiare le cellule (Gris *et al.*, 2013). I fenomeni in gioco sono lo stress ossidativo e la fotoinibizione ed entrambi comportano una riduzione dell'efficienza fotosintetica. In risposta all'eccesso di radiazione, gli organismi fotosintetici possono essere coinvolti in 2 tipi di meccanismi. Il primo meccanismo prevede la continua riparazione dei

componenti fotosistemici danneggiati, in particolare di quelli appartenenti al PSII. Il secondo meccanismo coinvolge invece la riduzione delle sostanze ossidate attraverso la dissipazione dell'energia in eccesso sotto forma di calore. In entrambe le situazioni si ha una limitazione dell'efficienza di utilizzo della luce in quanto essa non viene impiegata per il processo di fotosintesi. Nell'ottica di ottimizzare la produttività questi fenomeni devono pertanto essere minimizzati.

Un altro fattore da considerare riguarda il fatto che le colture microalgali possono raggiungere concentrazioni tali da causare una disomogeneità nella distribuzione della luce all'interno del fotobioreattore.

Ciò significa che le cellule più vicine alla superficie del reattore esposta direttamente a illuminazione assorbono la maggior parte della radiazione disponibile e attivano uno dei 2 meccanismi descritti precedentemente, dissipando energia utile, mentre quelle situate nella zona buia ne ricevono meno, crescendo di conseguenza più limitatamente (Richmond *et al.*, 2003).

Tale fenomeno è indicato con il termine '*self-shading*' per il fatto che le cellule stesse tendono ad oscurarsi tra di loro.

Per massimizzare l'efficienza di utilizzo della luce può essere favorevole l'impiego di fotobioreattori con un cammino ottico più sottile ma è necessario tener sempre presente che, per spessore troppo piccoli, i fenomeni di fotoinibizione e saturazione non sono più trascurabili.

Un altro aspetto, infine, da non trascurare è il movimento continuo della biomassa dovuto all'eventuale sistema di agitazione presente e al gorgogliamento nella fase acquosa della CO₂. Le cellule pertanto si spostano continuamente dalle zone buie a quelle di luce del bioreattore; l'alternanza luce-buio può essere positiva o negativa in termini di produzione in base alla frequenza (Gris *et al.*, 2013).

1.2.1 Vantaggi e criticità connessi all'utilizzo di alghe come fonte energetica

Le microalghe presentano una serie di caratteristiche che le rendono al momento la sola fonte di biocombustibile in grado di sostenere la domanda globale di energia per il trasporto.

Tra i principali vantaggi connessi al loro utilizzo si annovera l'elevato contenuto di olio, che può superare il 70 % del peso secco (in media il contenuto è del 50%). Nel caso di semi vegetali, come la soia, la frazione lipidica è al massimo del 20%.

Le microalghe, rispetto ad altre biomasse, hanno infatti la tendenza ad accumulare molti lipidi se vengono sottoposte a condizioni di stress come la deprivazione di azoto. Questi microrganismi mostrano inoltre un'elevata resa di olio per ettaro, fattore che comporta una riduzione dei terreni di coltura e di conseguenza una minimizzazione dell'impatto sul mercato dei prodotti alimentari.

In Tabella 1.2, a conferma di quanto detto, si riportano dati relativi al contenuto lipidico, al rendimento in olio, al suolo utilizzato e alla resa in biodiesel per diversi feedstocks quali il mais, la soia e le microalghe divise in 3 categorie generali sulla base della percentuale di olio.

Tabella 1.2. Contenuto di lipidi, resa in olio e biodiesel, area utilizzata per la coltivazione di diversi tipi di biomassa come mais, soia e microalghe (dati presi da Chisti 2007, Demirbas 2011, Lagioia et al. 2011, Mata et al. 2010 e rielaborati da ENEA).

Materia prima	Contenuto lipidico (% olio/s.s.)	Rendimento in olio (L olio/ha)	Suolo utilizzato (m²/kg biodiesel)	Resa in biodiesel (kg biodiesel/ha)
Mais	4	172	66	152
Soia	18	446-636	18	562
Jatropha	28	741-1.892	15	656
Camelina	42	915	12	809
Colza	41	974	12	946
Girasole	40	1.070	11	1.156
Olio di palma	36	5.366-5.950	2	4.747
Microalghe (basso contenuto in olio)	30	58.700	0,2	51.927
Microalghe (medio contenuto in olio)	50	97.800	0,1	86.515
Microalghe (elevato contenuto in olio)	70	136.900	0,1	121.104

Tra le specie algali a più alto contenuto lipidico, ne esistono molte appartenenti alle classi delle alghe verdi come *Neochloris oleabundas*, *Chlorella sp.* e *Scenedesmus obliquus*; grazie a questa caratteristica sono al momento tra le specie più studiate a scopi energetici.

Nella Tabella 1.3 viene indicata la frazione di olio presente in diverse specie microalgali, tra cui quelle sopra citate.

Un'altra proprietà che rende le microalghe come le biomasse più promettenti da sfruttare a fini energetici è la sola richiesta per la crescita di elementi facilmente disponibili e non di prodotti chimici come erbicidi o pesticidi.

Questi microorganismi inoltre, grazie alla fissione di CO₂ durante la fase di crescita, contribuiscono a ridurre le sue emissioni in atmosfera (Benemann, 1997) e sono in grado di crescere su acque di scarico grazie al fosforo e all'azoto contenuti in esse, limitando così i costi relativi a trattamenti di depurazione delle acque (Li *et al.*, 2008).

Tabella 1.3. Contenuto di olio per diverse specie algali (dati presi da Ahmad 2011, Bruton et al 2009, Chisti 2007, Demirbas 2011, Mata et al 2010 e rielaborati da ENEA).

Microalga	Contenuto lipidico (% s.s.)	Microalga	Contenuto lipidico (% s.s.)
<i>Ankistrodesmus sp.</i>	24-31	<i>Neochloris oleabundans</i>	29-65
		<i>Nitzschia sp.</i>	16-47
<i>Botrycoccus braunii</i>	25-75	<i>Pavlova lutheri</i>	35
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	16-40	<i>Pavlova salina</i>	31
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18-57
<i>Chlorella</i>	18-57	<i>Prymnesium parvum</i>	22-38
<i>Dunaliella sp.</i>	17-67	<i>Scenedesmus dimorphus</i>	16-40
<i>Ellipsoidion</i>	27	<i>Scenedesmus obliquus</i>	11-55
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33	<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Monallanthus salina</i>	22	<i>Skeletonema</i>	13-51
		<i>Spirulina</i>	4-9
<i>Nannochloropsis sp.</i>	12-68	<i>Stichococcus</i>	33

Al momento il costo del olio di origine algale risulta comunque essere molto più elevato di quello di un combustibile tradizionale a causa dell'esistenza di diverse problematiche importanti non ancora risolte. Se ne elencano soltanto alcune, qui di seguito:

- massimizzazione delle portate ponderali di biomassa e del contenuto di lipidi;
- riduzione dei costi operativi, in particolare di quelli relativi all'acquisto dei nutrienti da utilizzare per la crescita - sono in corso studi sul loro riciclo nelle operazioni a valle dei reattori o sull'utilizzo sostitutivo di acque di scarico contaminate da azoto e fosforo (Chisti, 2014);
- ottimizzazione dei sistemi di coltura e delle operazioni di downstream, come le fasi di separazione della biomassa dalla fase acquosa e di essiccazione, che risultano essere molto dispendiose dal punto di vista energetico (Malcata, 2011).

La produzione di microalghe a scopi energetici avviene per ora in impianti pilota come in vasche delle dimensioni di 10 m² fino ad impianti da 60 ha (Lagioia *et al.* 2011, Nigam e Singh 2010, Thrumond 2011).

Il costo dell'olio di origine algale dipende da molti fattori come la resa di biomassa, il contenuto dei lipidi e i costi relativi alla loro estrazione; il prezzo inoltre sarà influenzato ancora per molto tempo da quello del petrolio.

In Chisti (2007) viene utilizzata un'equazione per stimare il costo del biocarburante affinché questo sia competitivo dal punto di vista economico con il diesel di origine petrolifera:

$$Coa = 25.9 \cdot 10^{-3} \cdot Cp . \quad (1.3)$$

dove Coa è il prezzo dell'olio microalgale in \$/gallone e Cp quello del petrolio in \$/barile.

Ad esempio se il costo del petrolio sale a 100\$/barile, quello del biocombustibile deve essere non più di 2.59 \$/gallone per risultare competitivo a livello economico con il diesel tradizionale.

1.3 Sistemi di coltura per le microalghe

La coltivazione delle alghe può essere realizzata in condizioni batch, semi-batch o continue.

La scelta del ceppo influenza molto il prodotto che si vuole ottenere; per la produzione di biodiesel ad esempio si preferiscono le specie a più alto contenuto lipidico e caratterizzate da maggiori velocità di crescita.

I sistemi di reazione vengono in genere suddivisi in due categorie in base al contatto o meno con l'ambiente esterno: sistemi all'aperto e sistemi al chiuso.

I sistemi chiusi vengono denominati con il termine fotobioreattori mentre quelli aperti con il termine *open ponds*. In tabella 1.4 vengono riassunte le principali differenze tra questi.

Tabella 1.4. Confronto qualitativo tra sistemi di reazione aperti e chiusi (dati presi da Ghasemi 2012 e rielaborati).

	Open pond	Fotobioreattori
Rischi di contaminazione	Alta	Bassa
Perdite di CO₂	Alta	Bassa
Perdite per evaporazione	Alta	Bassa
Efficienza fotosintetica	Bassa	Alta
Rapporto area/volume	Bassa	Alta
Area necessaria	Alta	Bassa
Controllo del processo	Difficile	Facile
Produttività di biomassa	Bassa	Alta
Costi di investimento	Bassa	Alta
Costi operativi	Bassa	Alta
Costi per la separazione	Alta	Bassa
Scale-up	Facile	Difficile

1.3.1 *Open ponds*

I bacini aperti sono caratterizzati da ampie superfici sottoposte solo alla luce solare, costituiscono la tecnologia più consolidata e utilizzata in quanto sono i più semplici e presentano costi di esercizio e di capitale inferiori. Circa il 98% delle alghe sono prodotte in questo modo (Thurmond, 2011).

Rispetto ai fotobioreattori tuttavia la crescita delle alghe e il controllo delle condizioni di esercizio, come pH e temperatura, sono difficili da gestire, i rischi di una possibile contaminazione della coltura sono maggiori e il rapporto area/volume presenta un valore

basso intorno a $3\text{-}10\text{ m}^{-1}$ che limita così la produttività (in genere la concentrazione di biomassa secca è $0.1\text{-}0.2\text{ g/l}$ - Ghasemi *et al.*, 2012).

I sistemi aperti sono scavati nel terreno reso impermeabile da membrane plastiche oppure sono a livello del terreno; i più utilizzati sono quelli inclinati, dove si sfrutta la forza di gravità per il mescolamento della biomassa e le vasche a circuito (*raceponds*) dove il movimento delle microalghe è dato da pale rotanti. La seconda tipologia è utilizzata ad esempio per la coltivazione della spirulina (Ghasemi *et al.*, 2012). Nella Figura 1.6 è mostrato un esempio reale di *raceponds* e la sua relativa schematizzazione.

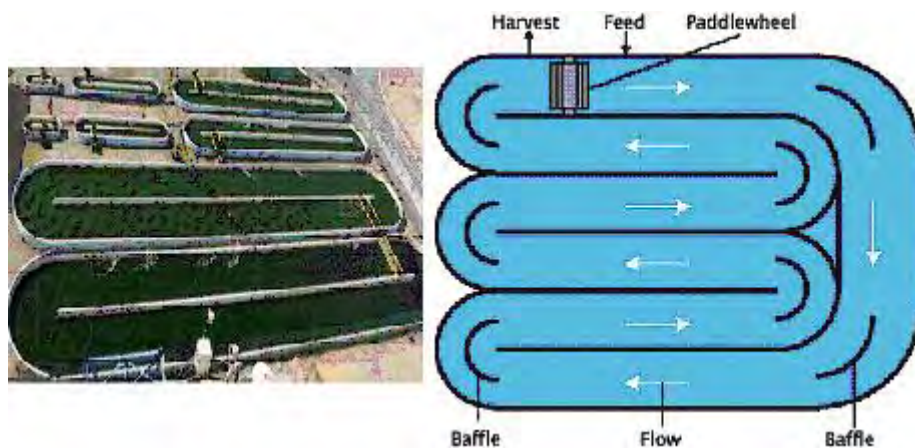


Figura 1.6. Open pond (www.responsiblebusiness.eu).

La temperatura si mantiene principalmente per evaporazione di una parte dell'acqua in cui cresce la biomassa. Il sistema è comunque fortemente influenzato dalle condizioni climatiche, dato che fattori come la temperatura e la luce variano continuamente durante il giorno e durante l'anno.

1.3.2 Fotobioreattori

I fotobioreattori sono stati introdotti per cercare di superare i problemi connessi all'utilizzo dei sistemi aperti: permettono un controllo più semplice dei parametri operativi come il pH e la temperatura, sono caratterizzati da un rischio inferiore di contaminazione in quanto non sono a contatto con l'ambiente esterno e possiedono un rapporto area/volume superiore di $25\text{-}125\text{ m}^{-1}$ tale da garantire il raggiungimento di concentrazioni di biomassa secca di $2\text{-}5\text{ g/l}$

(Ghasemi *et al.*,2012). Tuttavia presentano dei costi operativi e di investimento molto più elevati e sono quindi ancora in fase di studio.

Possono essere posizionati internamente o esternamente e sfruttare luce naturale o artificiale.

Ne esistono di diverse tipologie: tubolari, elicoidali, colonne a bolle, pannelli (*flat-panels*).

I materiali con cui vengono costruiti devono essere non tossici, avere grande trasparenza ottica, resistenza meccanica e stabilità chimica e, infine, possedere un basso costo.

Tra le varie tipologie elencate i sistemi chiusi più utilizzati sono i fotobioreattori tubolari e i *flat-panels*.

I fotobioreattori tubolari, come si vede in Figura 1.7, sono costituiti da una serie di tubi paralleli, dritti e trasparenti, di plastica o vetro, del diametro non superiore a 0.1 m e con una lunghezza inferiore a 80 m (Chisti, 2007).



Figura 1.7. Fotobioreattore tubolare (www.acquacoltura.jonica.it).

I *flat-panels*, come quello in Figura 1.8, sono costituiti da 2 lastre di materiale trasparente, come il vetro o il policarbonato, tenute assieme in modo tale che lo spessore ottenuto sia sottile.



Figura 1.8. Fotobioreattore *flat-panel* (http://deltafarmpress.com/mag/farming_commodities_future_algae/index.html).

Questo tipo di configurazione garantisce uno sfruttamento più efficace della luce in quanto si ha una distribuzione di fotoni più omogenea.

1.4 I processi di trattamento e trasformazione delle microalghe

La biomassa algale deve subire opportuni trattamenti prima di poter essere sfruttata per la produzione di *fuels*.

Allo stadio di coltivazione segue quindi quello di raccolta: il materiale di partenza da processare è una sospensione acquosa molto diluita con concentrazioni di 0.1-8 g/l; i processi di separazione della biomassa dalla fase acquosa possono essere condotti in modo fisico, chimico o biologico a seconda delle dimensioni delle cellule (Chisti, 2007).

Le tecniche più comunemente utilizzate sono la filtrazione, la sedimentazione e la centrifugazione.

I costi relativi all'operazione di *harvesting* dipendono principalmente dalle concentrazioni di biomassa che si sono ottenute nei reattori e dalla percentuale di solidi sospesi che si desidera raggiungere (in genere si vogliono ottenere concentrazioni di 10-450 g/l).

Lo stadio di separazione permette di eliminare la maggior parte dell'acqua intercellulare; la perdita di quella intracellulare avviene successivamente tramite essiccazione in stufa.

La biomassa così trattata può ora essere sottoposta a diversi processi di downstream suddivisi, come riportato in Figura 1.9, in operazioni di conversione termochimica e in operazioni di conversione biochimica.

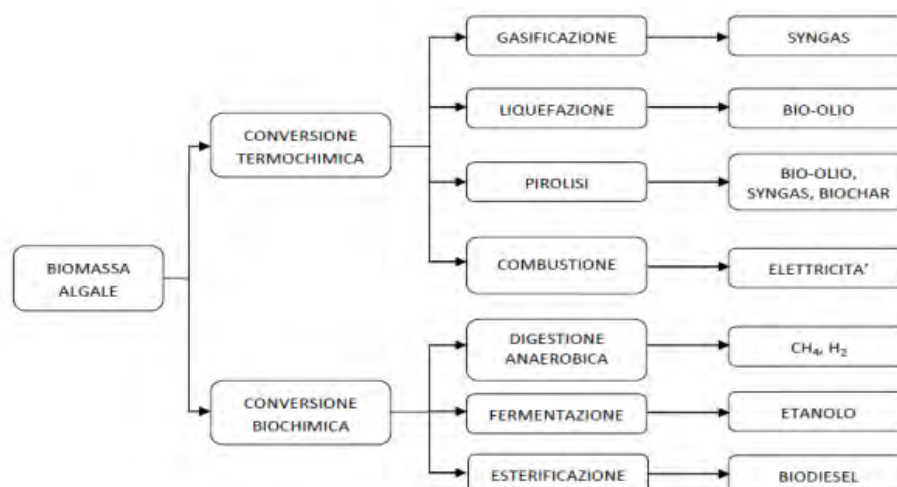


Figura 1.9. Processi di trasformazione delle alghe (Brennan e Owende, 2010).

Nella prima categoria rientrano:

- la combustione diretta della biomassa solida per produrre calore ed elettricità;
- la gassificazione, processo dove si lavora a temperature sopra gli 800°C, in difetto di O₂ per ottenere i syngas, miscela di CO e H₂ usata per produrre metanolo, green diesel tramite reazione di Fischer Tropsch o in turbine per generare potenza;
- la liquefazione ad olio;
- la pirolisi, processo dove si riscalda la biomassa a temperature tra i 500 e gli 800 °C in assenza di O₂ per arrivare ad olio, syngas e char (residuo carbonioso usato come fertilizzante per terreni).

Alla seconda categoria appartengono:

- i processi di digestione anaerobica dove tutte e 3 le frazioni biochimiche dell'alga vengono convertite in metano o idrogeno;
- i processi di fermentazione dove le catene carboidratiche vengono scomposte in molecole di glucosio da microorganismi come *Saccharomyces cerevisiae*. Il glucosio viene convertito poi in etanolo e CO₂, in mancanza di O₂, secondo la prima reazione riportata in Figura 1.10; si formano dei sottoprodotti che possono essere utilizzati come fertilizzanti o come mangimi per animali. La fermentazione prevede principalmente l'impiego di glucosio come materia prima di base; altri zuccheri non vengono sfruttati a causa della produzione maggiore di rifiuti, problema che si pensa di poter risolvere con microorganismi geneticamente modificati. L'etanolo viene ottenuto in soluzione acquosa in concentrazioni del 7-15%; viene quindi concentrato tramite operazioni di distillazione azeotropica o processi più innovativi come la separazione con membrane;
- i processi di transesterificazione per la produzione di una miscela di esteri alchilici nota come biodiesel a partire dai lipidi accumulati (estratti dalle microalghe in genere grazie all'utilizzo di solventi organici) e da alcoli. Tra gli alcoli maggiormente impiegati vi è il metanolo (Figura 1.10); il biodiesel che si realizza in questo caso è denominato FAME (acronimo che sta per 'fatty acid methyl esters').

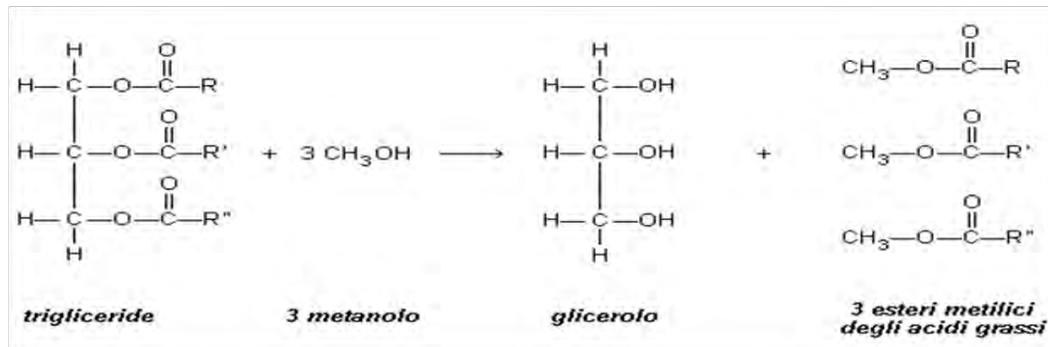


Figura 1.10. Reazioni di fermentazione per la produzione di bioetanolo e di transesterificazione per la produzione di biodiesel.

Negli ultimi anni si è interessati ad applicare le microalghe principalmente in operazioni di fermentazione ed transesterificazione per ottenere rispettivamente etanolo e diesel biodegradabili (in figura 1.11 viene rappresentato un diagramma generale di flusso che riassume gli stadi di lavorazione necessari per la produzione di biodiesel a partire da biomassa algale).

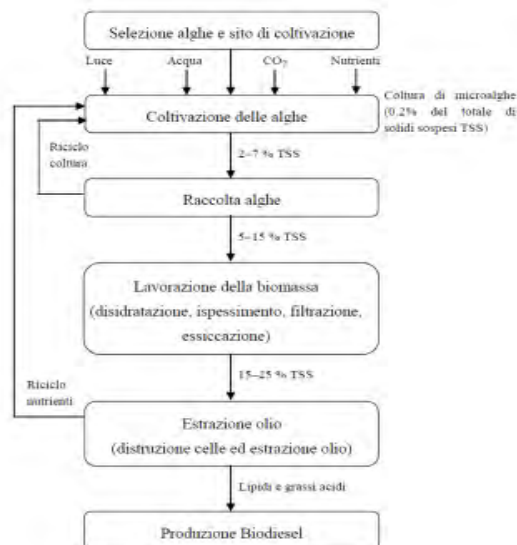


Figura 1.11. Diagramma di flusso che riassume i processi di produzione del biodiesel a partire da microalghe (Mata et al., 2010).

A livello industriale questi processi vengono per ora condotti utilizzando come feedstocks altre tipologie di biomassa (cereali, oli vegetali).

Rispetto al bioetanolo che presenta la stessa struttura chimica dell'etanolo tradizionale, è evidente che il biodiesel ha una composizione chimica diversa. Il biodiesel, a differenza di quello di origine fossile, non è tossico. Nei motori convenzionali, miscelato al 2-10% con il diesel tradizionale (un'ulteriore aggiunta comporterebbe a modifiche dei motori esistenti), riduce le emissioni di composti organici parzialmente ossidati, di CO₂, di solfati e di idrocarburi policiclici aromatici.

In Tabella 1.5 si riportano i dati relativi ad un confronto tra le caratteristiche primarie del diesel normale e quelle di diesel ottenuti da semi vegetali e da microalghe.

Tabella 1.5. Proprietà del diesel di origine fossile e del biodiesel ottenuto a partire da biomasse diverse (dati presi da Amin 2009, di Canakci 2008, di Cencic et al. 2007, Dinh et al. 2009, Fukuda et al. 2001, Yamane et al. 2001 e rielaborati da ENEA).

Proprietà	Biodiesel da alghe	Biodiesel da soia	Biodiesel da colza	Biodiesel da girasole	Diesel
Densità (kg/L)	0,864	0,884	0,882	0,860	0,838
Viscosità (mm ² /s, cSt a 40 °C)	5,2	4	4,83	4,6	1,9-4,1
Flash point (°C)	115	131/178	155/180	183	75
Punto di solidificazione (°C)	-12	-4	-10,8	-7	-50 /+10
Punto di intorbidamento (°C)	2	1	-4/-2	1	-17
Numero di cetano	52	45/51	53/56	49	40-55
PCI (MJ/kg)	41	37,8	37,2	38,9	42

1.5 Obiettivo di tesi

Alla luce dei problemi presentati brevemente nei paragrafi precedenti, le applicazioni attuali delle microalghe riguardano principalmente gli ambiti alimentare, farmaceutico e cosmetico.

Per poter passare da settori contraddistinti da basse capacità e da prodotti ad alto valore aggiunto al settore energetico, che necessita di elevati volumi di produzione e prezzi notevolmente più bassi sono richiesti intensi sforzi di ricerca. Questi devono essere finalizzati in particolare allo sviluppo e ottimizzazione dello *scale up* di fotobioreattori, considerati al momento come i più promettenti sistemi di coltura per le microalghe.

In quest'ottica si inserisce il seguente lavoro di tesi con un duplice obiettivo:

- approfondire, attraverso la raccolta di dati sperimentali, come la crescita algale, a livello non solo macroscopico come concentrazione ma anche microscopico come dimensione media delle cellule, è influenzata da diversi parametri biologici/operativi, in particolare dalla luce;
- modellare matematicamente la crescita di una coltura di microalghe in un fotobioreattore considerando sistemi reattivi operanti sia in condizioni batch sia continue con la prospettiva di riuscire a progettare un reattore da poter poi utilizzare per una produzione su più larga scala.

Rispetto a molti altri lavori presentati in precedenza, l'approccio matematico non si basa più sulla formulazione diretta di bilanci macroscopici da applicare alla biomassa ma sullo sviluppo di un'equazione di bilancio di popolazione, dove la variabile considerata per caratterizzare lo stato delle cellule è la massa.

La risoluzione del modello permette di ottenere così più informazioni biologiche; tra queste le più importanti sono la concentrazione microalgale sia in termini di cellule sia in termini ponderali e le distribuzioni di massa.

Capitolo 2

Bilanci di popolazione di una coltura microalgale

Il capitolo 2 introduce il concetto di ‘modello di bilancio di popolazione’ o ‘equazione di bilancio di popolazione’ (‘population balance equations’ PBE) ; alla definizione di PBE segue una descrizione della sua struttura generale e delle sue potenziali applicazioni.

Il capitolo termina con lo sviluppo matematico di un modello di bilancio adatto a rappresentare la dinamica di crescita di una coltura microalgale in fotobioreattori che operano sia in condizioni continue sia in condizioni batch.

2.1 Introduzione

In molti processi di interesse scientifico e tecnologico si è interessati a descrivere il comportamento di una popolazione di individui che si distinguono tra di loro per effetto di uno o più parametri caratteristici.

Ad esempio nei processi di cristallizzazione vengono prodotti cristalli che differiscono per le loro dimensioni, nei processi di produzione di materie plastiche le catene polimeriche si differenziano per la lunghezza e quindi per il peso molecolare ma anche in altri settori, come in quello economico o sociologico, è interessante descrivere popolazioni di persone classificate sulla base del loro reddito o della loro età...

In tutti questi casi i bilanci di popolazione sono lo strumento adatto a modellare la dinamica di distribuzione degli stati di una popolazione di entità; permettono infatti di descrivere come il numero di individui in una popolazione e le loro proprietà cambiano nel tempo e con le condizioni di crescita.

Negli ultimi anni si è iniziato a prestare sempre più attenzione a questo tipo di modellazione e la ragione principale è nell’elevato numero di applicazioni in cui può essere utilizzata. Nella figura 2.1 a) e b) si rappresentano rispettivamente l’andamento del numero di articoli

pubblicati in merito all'argomento dal 1985 al 2013 e il numero di citazioni che evidenziano l'importanza dei bilanci di popolazione.

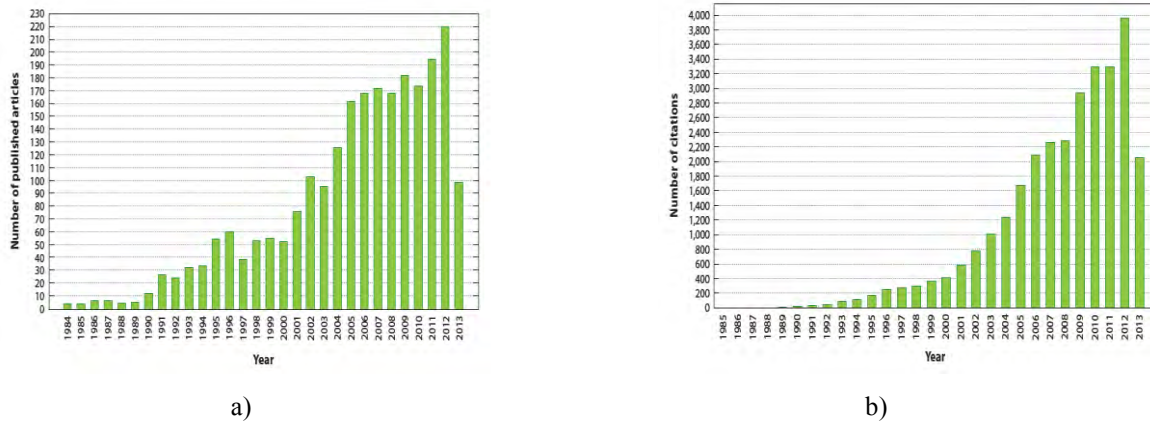


Figura 2.1. Numero di articoli pubblicati (a) e numero di citazioni (b) sui bilanci di popolazione per anno (Ramkrishna, 2014).

Nel campo ingegneristico, i bilanci di popolazione possono essere utilizzati sia per rappresentare popolazioni di particelle inanimate sia popolazioni di cellule vitali.

I processi principali che possono essere descritti sono i seguenti:

- cristallizzazioni e precipitazioni;
- dissoluzioni;
- deposizioni;
- granulazioni;
- comminuzioni;
- polimerizzazioni;
- reazioni multifase;
- crescita di colture di cellule.

Come si può notare, sono numerose le aree in cui possono essere applicati.

Il campo di interesse in questa tesi è la crescita di colture cellulari in quanto l'obiettivo dello studio è la modellazione della coltivazione di microalghe unicellulari in fotobioreattori.

2.2 La struttura generale di un bilancio di popolazione

Prima di procedere con lo sviluppo della modellazione applicata al sistema biologico studiato, si descrive brevemente la struttura generale di un bilancio di popolazione secondo Ramkrishna (2014).

L'equazione di bilancio di popolazione prevede di modellare un sistema composto da un numero discreto o continuo di entità che interagiscono o meno con l'ambiente fisico circostante, generalmente assunto come una fase continua (Ramkrishna, 2014).

Le particelle in questione sono descritte da un vettore che contiene delle coordinate interne, proprietà scelte per rappresentare le entità in sé (ad esempio la massa o la taglia), e delle coordinate esterne, che coincidono solitamente con la posizione temporale e fisica del loro centro di massa nel sistema. Lo spazio congiunto delle coordinate è chiamato 'spazio di stato particellare' o '*particle state space*' (Ramkrishna, 2000).

Le variabili esterne sono in genere continue mentre quelle interne possono essere sia continue che discrete e vengono scelte in base all'applicazione che si considera (ad esempio la taglia in un processo di cristallizzazione).

L'equazione di bilancio di popolazione rappresenta dunque un bilancio di conservazione nel numero di entità/particelle.

La descrizione globale del sistema è fornita da questo accoppiato con le usuali equazioni di conservazione della massa, della quantità di moto e di energia per la fase continua.

La fase particellare e quella continua in cui le entità sono disperse possono infatti influenzarsi tra di loro molto strettamente. A volte, per semplificare la trattazione, si stabilisce che non ci sia interazione tra le 2 fasi, per cui i bilanci relativi all'ambiente circostante non vengono nemmeno presi in considerazione.

2.3 La modellazione di colture microalgali

Una classificazione dei modelli matematici applicati a sistemi biologici, in particolare a colture microbiche, è stata proposta da Tsuchiya (Tsuchiya *et al.*, 1966).

I modelli possono essere di tipo distribuito o segregato: quelli distribuiti trattano la popolazione cellulare come un'unica fase distribuita uniformemente, mentre quelli segregati (ovvero i bilanci di popolazione) descrivono la bio-fase attraverso una distribuzione di stati

cellulari, ovvero una funzione di frequenza che indica la probabilità che una cellula, presa in modo casuale, si trovi in uno specifico stato.

In un modello distribuito si assume dunque che le cellule siano tutte simili tra loro mentre in un modello segregato si tiene in considerazione del fatto che la popolazione contiene cellule con differenti caratteristiche. Lo stato cellulare può essere rappresentato da una misura di taglia, massa, età, contenuto proteico o altro ancora.

I modelli segregati sono i più complessi e prevedono in genere la presenza di equazioni integro-differenziali alle derivate parziali; in base al numero di parametri considerato per descrivere lo stato fisiologico di una cellula possono essere distinti in non strutturati, dove una sola variabile interna viene utilizzata per caratterizzare la cellula, e strutturati, dove invece più variabili vengono trattate e quindi la distribuzione degli stati diventa una funzione di frequenza multidimensionale (Eakmann *et al.*, 1966).

Un'ulteriore classificazione può prevedere l'interazione o meno della coltura di cellule con l'ambiente circostante; nel caso in cui si tenga conto di tale aspetto, il bilancio di popolazione viene accoppiato in genere con bilanci ponderali sui nutrienti (Eakmann *et al.*, 1966).

In questa tesi viene sviluppato un modello segregato e non strutturato per una coltura di microalghe unicellulari, dove si tiene conto di un'interazione con l'ambiente fisico di crescita; la coordinata interna considerata per rappresentare lo stato fisiologico della cellula in modo completo è la sua massa. Diversi autori hanno costruito modelli di dinamica di popolazione basati sull'età cellulare; secondo Eakman la massa può essere un indice migliore dello stato fisiologico della cellula (Eakman *et al.*, 1966) per i seguenti motivi:

- la massa è più direttamente e facilmente connessa a variabili cellulari come volume, area superficiale, età (nell'ultimo caso ad esempio si può intuire facilmente che le cellule più grandi sono quelle più vecchie);
- la massa può essere relazionata a variabili di popolazione come concentrazione ponderale di biomassa;
- la velocità di crescita in massa di una cellula può essere trattata in modo deterministico grazie a modelli già disponibili in letteratura;
- la massa può essere ricavata da una sola osservazione ad un certo istante di tempo mentre l'età richiede osservazioni in un intervallo;
- la massa si conserva con la divisione cellulare (ovvero la somma delle masse delle cellule nate è pari a quella della cellula madre).

2.3.1 La distribuzione degli stati cellulari

Si assume che il numero di cellule sia tale per cui la coordinata interna di massa può essere considerata una variabile continua (la distribuzione degli stati non è quindi rappresentata in forma grafica da un istogramma ma da una curva continua).

Si definiscono allora le seguenti grandezze generali:

- z = massa della cellula

- $f(z, t)dz$ = frazione di cellule con massa tra z e $z + dz$ al tempo t

- $N(t)$ = densità di popolazione al tempo t (ovvero concentrazione totale di cellule al tempo t)

- $W(z, t)dz$ = concentrazione in numero di cellule con massa tra z e $z + dz$ al tempo t

Le variabili $W(z, t)$ ed $f(z, t)$ sono relazionate tra loro attraverso N nel seguente modo:

$$W(z, t) = N(t) \cdot f(z, t) \quad (2.1)$$

e devono soddisfare le seguenti condizioni di vincolo:

$$\int_z f(z, t) dz = 1 \quad (2.2)$$

$$\int_z W(z, t) dz = N(t) \quad (2.3)$$

dove l'integrale è calcolato su tutti i possibili stati z assunti dalle cellule.

Le equazioni che descrivono come queste funzioni variano nel tempo e a diverse condizioni di crescita sono denominate bilanci di popolazione.

Spesso le distribuzioni vengono rappresentate in modo sintetico attraverso i momenti $\mu(t)$, così definiti:

$$\mu_{if}(t) = \int_z z^i \cdot f(z, t) dz \quad (2.4)$$

$$\mu_{iW}(t) = \int_z z^i \cdot W(z, t) dz \quad (2.5)$$

I momenti più importanti sono il momento zero, che corrisponde rispettivamente a 1 ed N (ovvero alle equazioni (2.2) e (2.3)) e quello primo in quanto ha un preciso significato biologico: indica infatti la massa media della distribuzione nel caso in cui la funzione considerata sia $f(z,t)$ e la concentrazione ponderale di biomassa C_B nel caso corrispondente alla funzione $W(z,t)$:

$$z_{mean} = \int_z z \cdot f(z,t) dz \quad (2.6)$$

$$C_B = \int_z z \cdot W(z,t) dz \quad (2.7)$$

I momenti sono molto importanti dal punto di vista matematico in quanto un'approssimazione della distribuzione reale può spesso essere ricostruita a partire da questi.

2.3.2 Sviluppo delle equazioni di bilancio di popolazione

Nell'introduzione del capitolo si è chiarito che i bilanci di popolazione possono essere applicati sia a popolazioni di particelle inanimate come cristalli, bolle o gocce sia a popolazioni di cellule.

Tutti i modelli hanno una struttura matematica simile, dove si introducono sempre termini come la velocità di crescita di una singola entità, la probabilità di divisione/rottura o di nascita di una nuova particella in un certo stato (Ramkrishna, 2000). In alcuni casi devono essere inclusi dei processi aggiuntivi come la nucleazione o l'aggregazione.

Rispetto ad altri sistemi particulati, le cellule nascono solo dalla divisione di cellule più vecchie (non esiste pertanto un termine di nucleazione come ad esempio nel caso di una cristallizzazione), non aggregano ma possono morire (Hjortso, 2005). L'assenza dei termini di nucleazione e aggregazione permette di semplificare la formulazione del modello matematico applicato ai sistemi biologici, come alle colture microalgali che sono state studiate nel lavoro di tesi.

In genere vengono assunte delle ulteriori semplificazioni (Hjortso, 2005):

- le cellule si sottopongono solo a divisione binaria (vengono ignorati i processi di meiosi e formazione di spore) mentre in altri sistemi il processo di rottura può causare la frammentazione in più particelle;

- il tempo impiegato dalla cellula per dividersi (dell'ordine dei minuti) è superiore al tempo necessario per il mescolamento (dell'ordine dei secondi) che può così essere considerato perfetto. Pertanto sul modello non influiscono le coordinate esterne di posizione ma solo quella interna usata per descrivere la cellula;
- la morte cellulare può essere trascurata in certe condizioni, incluse quelle di nostro interesse.

In conclusione i processi che determinano la forma finale del bilancio di popolazione, da applicare ad una popolazione di microalghe, sono la velocità di crescita di una cellula, la probabilità di divisione e una funzione che descriva come la massa si distribuisce al momento della divisione, ed eventualmente una probabilità di morte. Questi termini descrivono essenzialmente il ciclo di vita di una cellula.

Si definisce inanzitutto l'ambiente fisico dove la coltura di cellule microalgali è dispersa. Il sistema entro cui viene formulato il bilancio è un reattore, batch oppure chemostat, dove la popolazione di cellule e i nutrienti necessari alla crescita sono perfettamente mescolati.

Si è considerato sia una configurazione batch sia una configurazione continua in quanto sono state svolte prove sperimentali in entrambe le condizioni e si è deciso di modellare i dati raccolti durante ogni esperimento.

Nel caso del reattore che opera in condizioni continue vi è un'alimentazione in fase liquida che porta nuovo substrato disciolto in acqua e un'uscita dell'eventuale substrato non consumato e della biomassa prodotta. La portata volumetrica di liquido e il volume di reazione sono considerati costanti.

Per supportare la crescita delle microalghe vi è inoltre un'ulteriore corrente in ingresso di aria arricchita di CO₂, che viene fatta gorgogliare in quantità non limitante dentro il fotobioreattore ma questa può essere trascurata in quanto non contiene cellule e non influenza la costruzione del bilancio.

Il volume differenziale di controllo entro cui viene scritto il bilancio è $[z, z + dz]$ e rappresenta il cosiddetto '*internal particle state space*'. Il numero di cellule in questo volume può variare perché esse crescono fino a raggiungere una massa superiore a z o a $z+dz$, nascono, si dividono, muoiono o escono fisicamente dal sistema di reazione (nel caso di un reattore chemostat).

Il bilancio si presenta in forma generale come:

$$\text{Accumulo} = \text{entrata} - \text{uscita} \quad (2.8)$$

Il termine di ‘entrata fisica nel reattore’ per il sistema continuo è posto pari a zero in quanto la corrente liquida in ingresso non contiene cellule ma solo i nutrienti necessari per la crescita microalgale:

$$\text{Accumulo} = 0 - \text{uscita da reattore} + (\text{nascita+crescita})_{\text{ing}} - (\text{divisione+morte+crescita})_{\text{out}} \quad (2.9)$$

Il numero di cellule con massa tra z e $z + dz$ entro il volume di controllo, per unità di volume del reattore, è dato dal prodotto tra la distribuzione di concentrazione di cellule $W(z,t)$ e la ‘taglia’ del volume di controllo infinitesimo dz ; la velocità di accumulo non è altro che la derivata di questo termine:

$$\text{accumulo} = \frac{\partial W(z,t) dz}{\partial t} \quad (2.10)$$

Il processo di crescita delle cellule viene descritto da una funzione, qui denominata $r(z)$.

Questo termine indica la velocità di crescita di una singola cellula, ovvero la velocità netta di incremento nella massa per una cellula allo stato z . Dato che z è considerata una variabile continua, dal punto di vista matematico $r(z)$ corrisponde alla derivata di z rispetto al tempo t .

Il prodotto tra $r(z)$ e $W(z,t)$ rappresenta il flusso in numero di particelle che attraversa il dominio entro cui varia la coordinata interna (Ramkrishna, 2000).

I flussi di crescita, in corrispondenza degli estremi del volume di controllo sono allora definiti come:

$$\text{flussi di crescita ing-out} = r(z) \cdot W(z,t) - r(z + dz) \cdot W(z + dz,t) \quad (2.11)$$

Il flusso di particelle in uscita da $[z, z + dz]$ a causa del ‘washout’ viene descritto in modo simile come:

$$\text{uscita} = D \cdot W(z,t) dz \quad (2.12)$$

dove D è la velocità di diluizione, ovvero l'inverso del tempo di permanenza ($\tau = V_R/Q$ dove V_R è il volume di reazione e Q la portata volumetrica).

Definita $T(z)$ la probabilità specifica di divisione, o velocità specifica di divisione, $T(z)dt$ rappresenta la frazione di cellule di massa z al tempo t che si dividono tra t e $t+dt$.

Il flusso di cellule in uscita per divisione dal volume di controllo è quindi:

$$\text{divisione} = T(z) \cdot W(z, t) dz \quad (2.13)$$

È evidente che dalla divisione di una cellula ne nascono altre.

Se $p(z, m)$ è la funzione di distribuzione di massa delle cellule nate, $p(z, m)dz$ indica la frazione di cellule con massa tra z e $z+dz$ nate dalla fissione di una cellula di massa m (dal punto di vista statistico p rappresenta la probabilità che una particella nasca allo stato z da una allo stato m).

La velocità con cui le cellule nascono è proporzionale a quella di divisione; il flusso associato alla nascita è quindi:

$$\text{nascita} = 2 \cdot \int_z^{z_{\max}} p(z, m) \cdot T(m) \cdot W(m, t) dm dz \quad (2.14)$$

dove l'integrale tiene conto della divisione di tutte le cellule e z_{\max} è l'estremo superiore di integrazione, ovvero il valore superiore di massa che le cellule possono possedere. Il fattore 2 davanti l'integrale deriva dall'ipotesi di divisione binaria.

Il contributo dovuto alla morte si costruisce come quello di divisione. Definita $\Theta(z)$ la probabilità specifica di morte, o velocità specifica di morte, $\Theta(z)dt$ rappresenta la frazione di cellule di massa z al tempo t che muoiono tra t e $t+dt$. Il flusso di cellule relativo diventa pertanto:

$$\text{morte} = \Theta(z) \cdot W(z, t) dz \quad (2.15)$$

Unendo i singoli termini e dividendoli per dz , si ottiene la struttura generale del bilancio impiegato per modellare la coltivazione di microalghe in fotobioreattori che lavorano in modalità batch e continua:

$$\frac{\partial W(z,t)}{\partial t} + \frac{\partial(r(z) \cdot W(z,t))}{\partial z} = 2 \cdot \int_z^{z_{\max}} p(z,m) \cdot T(m) \cdot W(m,t) dm - (D + T(z) + \Theta(z)) \cdot W(z,t) \quad (2.16)$$

dove:

$$r(z) \cdot W(z,t) - r(z+dz) \cdot W(z+dz,t) = -d(r(z) \cdot W(z,t)) \quad (2.17)$$

La distinzione tra un sistema reattivo batch e uno continuo si basa semplicemente sull'annullamento o meno del termine di *washout*. L'equazione di bilancio applicata al reattore chiuso differisce da quella usata per la rappresentazione di un chemostat solo per l'assenza di $D \cdot W(z,t)$ in quanto la velocità di diluizione D viene posta pari a 0.

Si può osservare che i processi da modellare fisicamente per la risoluzione del bilancio sono:

- la velocità di crescita di una singola cellula ($r(z)$);
- la velocità con cui una cellula si divide ($T(z)$);
- la distribuzione degli stati di nascita ($p(z,m)$);
- la velocità con cui una cellula muore ($\Theta(z)$).

Nei paragrafi successivi si riportano i modelli principali che sono stati trovati in letteratura per descrivere questi fenomeni.

2.4 Velocità di crescita di una cellula

Il termine $r(z)$ modella il metabolismo cellulare, ovvero descrive quanto velocemente lo stato di una cellula cambia nel tempo in funzione della sua stessa massa.

Tra le diverse funzioni che compaiono nel bilancio di popolazione, la velocità di crescita è quella su cui si sono soffermati i maggiori sforzi di ricerca riportati in letteratura.

Alcuni modelli presentano alta dimensionalità e coinvolgono molte equazioni differenziali accoppiate tra loro - questa caratteristica li rende quindi inutilizzabili nei bilanci di popolazione che devono prevedere un '*particle state space*' di dimensione inferiore (Hjortso, 2005). Altri invece sono più semplici e prendono ispirazione dai modelli distribuiti impiegati per descrivere una popolazione di cellule.

Di seguito si citano alcuni esempi di cinetica di crescita metabolica trovati in letteratura e sviluppati per la rappresentazione della dinamica di una popolazione di cellule microbiche.

Il modello di crescita applicato ad una coltura microalgale è stato rielaborato a partire da questi e viene introdotto successivamente nel capitolo 4.

2.4.1 Cinetica di Monod

La legge di crescita di una singola cellula può essere rappresentata secondo la relazione proposta da Monod, dove viene preso in considerazione l'effetto della concentrazione del substrato:

$$r(z, C_s) = \frac{k_{\max} \cdot C_s}{k_{ms} + C_s} \cdot z \quad (2.18)$$

Nell'equazione (2.18) k_{ms} è la costante di Monod o di affinità, k_{\max} è la costante di crescita massima della cellula nelle condizioni di coltura e C_s è la concentrazione di substrato (si considera nel bilancio il substrato che limita la crescita cellulare).

Il termine $\frac{k_{\max} \cdot C_s}{k_{ms} + C_s}$ rappresenta la velocità specifica di sviluppo osservata per una cellula (k).

Il termine k_{ms} equivale alla concentrazione del substrato limitante, in corrispondenza della quale il valore di k risulta essere metà del valore massimo k_{\max} . Rappresenta quindi un indice dell'efficienza con cui un microrganismo riesce ad utilizzare il substrato.

I valori di k_{\max} e k_{ms} dipendono dall'organismo studiato, dal substrato limitante, dal terreno di coltura e dalle condizioni ambientali come il pH e la temperatura.

Il modello in questione offre un buon compromesso tra fisicità e semplificazione matematica. Si può osservare inoltre che, per valori alti di concentrazione del nutriente considerato, prevale al denominatore dell'espressione il termine C_s su k_{ms} e quindi $r(z)$ può essere approssimata come $r(z) = k_{\max} \cdot z$ mentre, per valori bassi di concentrazione, $r(z) = \frac{k_{\max} \cdot C_s \cdot z}{k_{ms}}$.

Nel caso di substrato non limitante, la cinetica diventa dunque del primo ordine; dal punto di vista fisico l'espressione impone quindi che cellule più grandi crescono più velocemente di cellule con minor massa.

2.4.2 Cinetica di Blanckman

Il modello di Blanckman rappresenta un'approssimazione di quello di Monod:

$$r(z, C_s) = \begin{cases} k_{\max}, & C_s \geq 2 \cdot k_{ms} \\ \frac{k_{\max} \cdot C_s}{2 \cdot k_{ms}}, & C_s \leq 2 \cdot k_{ms} \end{cases} \quad (2.19)$$

La sua introduzione nell'equazione di bilancio di popolazione permette di semplificare la risoluzione analitica ma la discontinuità nella pendenza di $r(z)$ non ha un significato biologico.

2.4.3 Cinetica di Moser

Il modello di Moser è una generalizzazione di quello di Monod:

$$r(z, C_s) = \frac{k_{\max} \cdot C_s^n}{k_{ms} + C_s^n} \cdot z \quad (2.20)$$

Nell'espressione (2.20) compare un nuovo parametro (n) che si riduce a 1 se si adotta la legge di crescita di Monod.

2.4.4 Cinetica di Bertalanffy

Bertalanffy ha formulato un modello di crescita direttamente per una singola cellula senza prendere ispirazione da quelli impiegati per rappresentare una popolazione di cellule (Eakmann *et al.*, 1966). Egli sostiene che la velocità netta di crescita per una cellula equivale alla differenza tra una velocità di *uptake* dei nutrienti e una di rilascio di materiale cellulare nel sistema di reazione.

Il primo termine viene posto proporzionale all'area superficiale della cellula (S), in quanto i nutrienti devono passare attraverso questa per apportare nuova massa, mentre il secondo termine viene considerato proporzionale alla massa stessa della cellula.

L'equazione si presenta dunque come:

$$r(z, Cs) = k_{uptake} \cdot S - k_{rel} \cdot z \quad (2.21)$$

dove k_{uptake} e k_{rel} sono le costanti di proporzionalità di *uptake* e rilascio di materiale nello spazio extracellulare.

Sotto l'ipotesi di cellule di forma sferica la cinetica diventa:

$$r(z, Cs) = k_{uptake} \cdot \left(\frac{36 \cdot \pi}{\rho^2}\right)^{\frac{1}{3}} \cdot z^{\frac{2}{3}} - k_{rel} \cdot z \quad (2.22)$$

dove ρ è la densità di una cellula che viene considerata costante nel tempo e nelle dimensioni. La costante k_{uptake} (o k_{rel}) può ora essere modellata secondo una relazione matematica come ad esempio quella di Monod ($k_{uptake} = \frac{k_{max} \cdot C_s}{k_{ms} + C_s}$) o secondo altre espressioni in base al sistema preso in esame.

2.5 Probabilità specifica di divisione

Si considera che le cellule al momento della divisione possiedono dei valori di massa distribuiti attorno ad un dato medio (Eakmann *et al.*, 1966). L'osservazione vale dal punto di vista statistico e non entra in conflitto con il fatto che l'esame al microscopio della coltura potrebbe rilevare cellule con massa più grande di quella media di divisione.

A volte per semplificare ulteriormente la trattazione si può assumere che tutte le cellule si dividano ad una massa critica (z_x) in 2 cellule perfettamente identiche tra loro: in questo caso non potranno dunque esistere cellule con massa inferiore a $z_x/2$ o superiore a z_x .

In questa tesi si è assunto che esista una distribuzione di massa di divisione $h_d(z)$.

Eakmann suggerisce che la massa della cellula al momento della divisione segua approssimativamente una distribuzione gaussiana scalata in modo che z non assuma mai valori negativi:

$$h_d(z) = \frac{2e^{-\frac{(z-mc)^2}{\varepsilon}}}{\varepsilon\sqrt{\pi}\left(\operatorname{erf}\left(\frac{mc}{\varepsilon}\right)+1\right)} \quad (2.23)$$

dove $h_d(z)dz$ rappresenta la frazione di cellule che si dividono con massa tra z e $z+dz$, mc indica la massa media della distribuzione di divisione mentre $\frac{\varepsilon}{\sqrt{2}}$ la deviazione standard.

Segue quindi che:

➤ $\int_0^z h(z)dz$ descrive la frazione di cellule che si dividono con massa tra 0 e z (se l'estremo

superiore di integrazione è z_{max} $\int_0^{z_{max}} h(z)dz = 1$);

➤ $1 - \int_0^z h(z)dz$ rappresenta la frazione di cellule che raggiungono massa z senza prima dividersi.

Il rapporto tra i 2 termini, $\frac{h(z)dz}{1 - \int_0^z h(z)dz}$, equivale al numero di cellule che si dividono con

massa tra z e $z+dz$ rispetto al numero di cellule che raggiungono massa z senza scindersi, ovvero al termine $T(z)dt$ che compare durante la costruzione del bilancio di popolazione.

L'intensità di divisione T può quindi essere modellata come:

$$T(z) = \frac{2r(z)e^{-x^2}}{\varepsilon\sqrt{\pi}(1 - \text{erf}(x))} \quad (2.24)$$

dove $x = \frac{(z - mc)}{\varepsilon}$.

L'espressione impone che più alta è la velocità di crescita di una cellula, più frequenti sono i processi di divisione, ovvero la cellula si scinde in corrispondenza di un'età/massa inferiore.

In Figura 2.2 viene riportato un esempio di profilo dell'intensità di divisione normalizzata rispetto al tasso di crescita; la forma della curva è indipendente dai valori ipotizzati per mc ed ε .

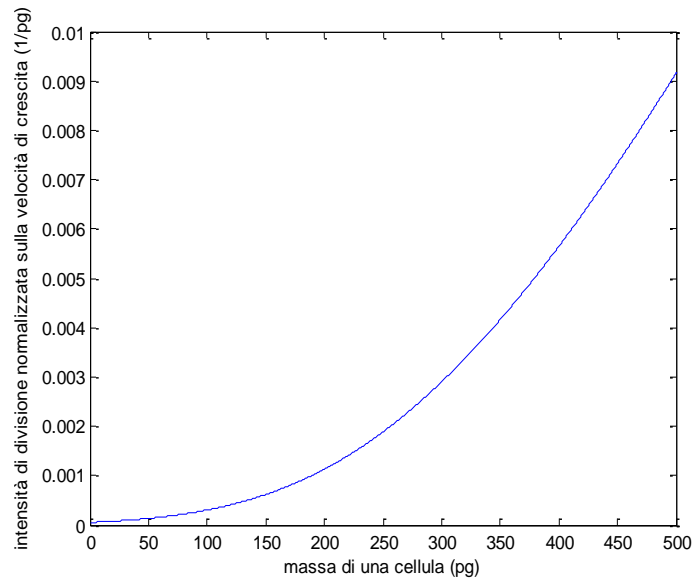


Figura 2.2. Profilo tipico della velocità specifica di divisione rispetto a quella di crescita di una cellula in funzione della massa della cellula stessa (parametri ipotizzati: massa media di divisione $m_c = 400$ pg; deviazione standard $\varepsilon = 141$ pg).

2.6. Distribuzione degli stati di nascita

La funzione di distribuzione degli stati di nascita $p(z, m)$ descrive come la materia si partiziona tra le cellule nate dalla divisione di un'altra cellula con massa m ; il modello utilizzato per la sua rappresentazione deve soddisfare le seguenti proprietà matematiche, le quali possiedono un preciso significato fisico (Hjortso, 2005):

$$p(z, m) = 0 \iff z > m \quad (2.25)$$

$$\int_0^m p(z, m) dz = 1 \quad (2.26)$$

$$\int_0^m z \cdot p(z, m) dz = \frac{m}{2} \quad (2.27)$$

$$p(z, m) = p(m - z, m) \quad (2.28)$$

Le espressioni (2.25) e (2.26) equivalgono ad affermare che non è possibile la nascita di una cellula più grande di quella che divide.

L'equazione (2.27) corrisponde alla definizione di momento primo per la funzione p e impone che le cellule nate assumano un valore medio di massa pari a metà di quello della cellula dividente in quanto vi è l'ipotesi di divisione binaria.

L'ultima condizione (2.28) è chiamata 'proprietà di simmetria' e rispecchia il fatto che la massa è una variabile interna che si conserva durante il processo di divisione.

Come per il termine di divisione, si può ipotizzare che la distribuzione di massa delle cellule nate sia approssimativamente una gaussiana, riscalata in modo tale z non assuma mai valori negativi (Eakman, 1966):

$$p(z, m) = \frac{e^{-\frac{(z-m)^2}{2\cdot\zeta^2}}}{\zeta \cdot \sqrt{\pi} \cdot (1 - \operatorname{erf}(\frac{m}{2\cdot\zeta}))} \quad (2.29)$$

dove $\frac{\zeta}{\sqrt{2}}$ indica la deviazione standard della distribuzione.

Il secondo modello proposto (Hjortso, 2005) è:

$$p(z, m) = 30 \cdot \frac{z^2 \cdot (m-z)^2}{m^5} \quad (2.30)$$

Entrambe le espressioni (2.29) e (2.30) rispettano le proprietà matematiche elencate all'inizio del paragrafo.

In questa tesi si è deciso di utilizzare l'equazione (2.30), che permette una risoluzione numerica più semplice rispetto a (2.29). L'equazione (2.30) viene impiegata non solo per la sua struttura più semplice rispetto al modello (2.29) ma anche per la mancanza di parametri da stimare.

In Figura 2.3 si riporta un esempio di profilo della funzione di distribuzione p utilizzando il modello adottato nell'elaborato.

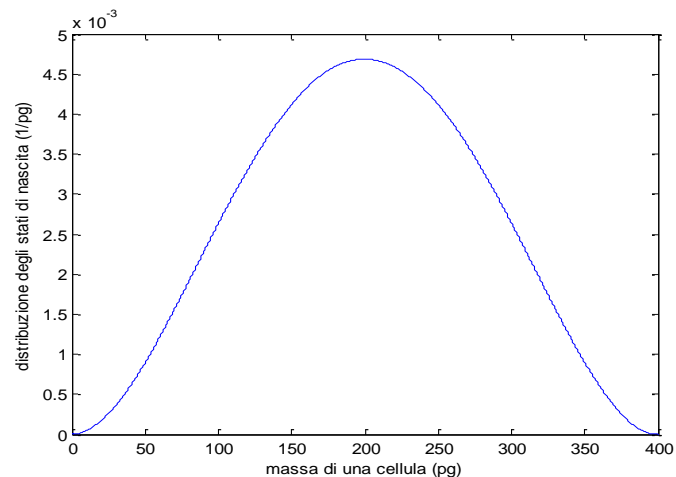


Figura 2.3. Funzione di distribuzione di nascita (parametro ipotizzato: massa a cui le cellule si dividono = 400 pg).

2.7 Intensità di morte

Il processo di morte è chiaramente una funzione dell'ambiente, ovvero $\theta(z)$ dovrebbe dipendere dalle caratteristiche e dalla concentrazione del mezzo di coltura, e dallo stato della cellula, in quanto si verifica più frequentemente in una sola parte del ciclo di vita (Hjortso, 2005).

La morte risulta comunque un termine ambiguo nel contesto degli organismi unicellulari: si può infatti ritenere morta una cellula che ha smesso di duplicarsi (in questo caso non contribuisce più alla nascita di nuove cellule ma finché non si sottopone a lisi deve comunque essere considerata nel bilancio) oppure una cellula che inizia a degradarsi e scompare infine completamente dal sistema (in questo caso non contribuisce alla nascita di nuove cellule e, scomparsa definitivamente, non deve essere considerata nel bilancio).

Alla luce di queste ambiguità e a causa dell'assenza di modelli in letteratura a riguardo, si è preferito trascurare il termine.

2.8 Alcune proprietà dei bilanci di popolazione

L'equazione di bilancio di popolazione presenta alcune proprietà su cui vale la pena soffermarsi.

Se si sottopone l'equazione a integrazione nella variabile z tra il valore minimo di massa z_{min} e il valore massimo z_{max} , si ottiene il bilancio in termini di densità di popolazione $N(t)$, che equivale al momento zero di $W(z,t)$:

$$\frac{dN(t)}{dt} + r(z_{max})W(z_{max}, t) - r(0)W(0, t) = 2 \int_0^{z_{max}} T(m)W(m, t) \int_0^m p(z, m) dz dm - DN(t) - \int_0^{z_{max}} T(z)W(z, t) dz \quad (2.31)$$

Si noti che il termine di morte non compare per i motivi spiegati nel paragrafo 2.7.

I flussi di crescita in corrispondenza degli estremi di integrazione sono nulli in quanto le cellule non nucleano né possono crescere arbitrariamente troppo grandi; le 2 condizioni al contorno sono chiamate 'condizioni di regolarità' (Ramkrishna, 2000).

Sfruttando la seconda proprietà matematica (2.26) elencata per $p(z,m)$ si ottiene:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -DN(t) + k_N N(t) \quad (2.32)$$

dove

$$k_N = \int_0^{z_{max}} T(z) f(z, t) dz \quad (2.33)$$

è la 'costante' di crescita di popolazione in termini di numero di cellule.

Applicando invece ad ogni termine la definizione di momento primo e sfruttando la proprietà matematica (2.27) elencata per $p(z,m)$, si ricava il bilancio in termini di concentrazione ponderale di biomassa C_B :

$$\frac{dC_B(t)}{dt} = \int_0^{z_{max}} r(z)W(z, t) dz - DC_B(t) \quad (2.34)$$

La velocità di crescita in termini di peso r_B equivale a:

$$r_B = \int_0^{z_{max}} r(z)W(z, t) dz \quad (2.35)$$

Si può quindi concludere che lo sviluppo dei modelli di crescita e di divisione per una singola cellula permette a sua volta la conoscenza della velocità di crescita di biomassa in termini di numero (r_N) e di massa (r_B).

Capitolo 3

Attività sperimentale

In questo capitolo viene presentata l'attività sperimentale svolta durante la tesi.

Il capitolo si suddivide in due sezioni: nella prima parte vengono descritte la specie algale studiata, le apparecchiature, le misure sperimentali condotte e la relativa strumentazione adottata; nella seconda parte vengono mostrati e discussi i dati di crescita algale raccolti durante le prove sperimentali.

3.1 Materiali e metodi

3.1.1 Specie utilizzata

L'attività sperimentale è stata condotta utilizzando come microalga *Scenedesmus obliquus*, una delle specie indicate come potenzialmente utilizzabili per la produzione di biocarburanti (Mata *et al.*, 2013). Essa appartiene alla famiglia Scenedesmaceae, all'ordine Chlorococcales, alla classe Chlorophyceae e alla divisione Chlorophyta.

Si tratta di un'alga verde di acqua dolce molto diffusa nei continenti europei e asiatici.

Le cellule possiedono una forma affusolata e tendono a crescere in gruppi a multipli di 2: in genere si raggruppano in 4 o in 8 (Figura 3.1) prendendo complessivamente il nome di cenobio, e quelle all'estremità della colonia esibiscono una forma allungata simile ad una mezzaluna; in particolari condizioni si presenta anche unicellulare.

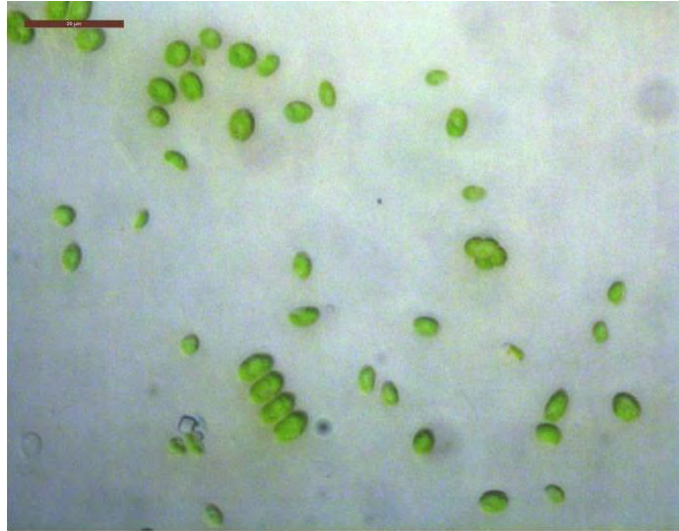


Figura 3.1. Immagine acquisita al microscopio ottico con ingrandimento 100x di *Scenedesmus obliquus* (Gris et al., 2013).

Scenedesmus obliquus possiede numerose caratteristiche interessanti (Mata *et al.*, 2013) come:

- una velocità di crescita alta e un range di temperatura ottimale di coltura ampio. Tra i 14°C e i 30°C il tasso di crescita non presenta variazioni notevoli e ciò permette una coltivazione di *Scenedesmus* outdoor più conveniente;
- un'efficiente fissazione della CO₂;
- l'abilità di crescere in acque di scarico;
- la capacità di accumulare lipidi, il cui contenuto non viene influenzato sensibilmente da variazioni della luce (la percentuale di lipidi rispetto al peso secco è intorno al 18.8% - 29.3%, il contenuto può crescere fino a 42% nel caso di crescita in mezzo di coltura con deficit da nutrienti);
- una maggiore resistenza alla contaminazione da batteri che possono portare alla morte cellulare.

3.1.2 Terreni di coltura

Il mezzo di coltura è il substrato dove viene fatta crescere la specie microalgale; nel caso di *Scenedesmus obliquus* si è usato BG11 sterile. L'acronimo sta per 'Blue Green Medium' e identifica il terreno che deve essere utilizzato per la coltivazione di alghe d'acqua dolce.

Nella Tabella 3.1 si riportano le concentrazioni dei diversi componenti presenti nel *medium* da impiegare in sistemi di coltivazione che operano in condizioni batch e continue.

Nel caso di un fotobioreattore continuo, al fine di evitare un'eventuale limitazione della crescita dovuta alla mancanza dei nutrienti (specialmente per tempi di residenza alti), questi vengono forniti in concentrazione doppia, ad eccezione dell'HEPES (soluzione tampone largamente impiegata nelle colture cellulari per mantenere stabile il pH), e del fosfato, che è presente in quantità ancora più elevate.

Tabella 3.1. Concentrazioni iniziali dei nutrienti in colture batch (prima colonna) e da fornire in ingresso ad un fotobioreattore continuo (seconda colonna).

Ingrediente	Concentrazione (g/l)	
Na₂MgEDTA	10^{-3}	$2 \cdot 10^{-3}$
Ferric ammonium citrate	$6 \cdot 10^{-3}$	$12 \cdot 10^{-3}$
Citric acid. 1H₂O	$6 \cdot 10^{-3}$	$12 \cdot 10^{-3}$
CaCl₂. 2H₂O	$36 \cdot 10^{-3}$	$72 \cdot 10^{-3}$
MgSO₄. 7H₂O	$75 \cdot 10^{-3}$	$150 \cdot 10^{-3}$
K₂HPO₄	$30.5 \cdot 10^{-3}$	0.5612
Na₂CO₃	$20 \cdot 10^{-3}$	$40 \cdot 10^{-3}$
H₃BO₃	$2.86 \cdot 10^{-3}$	$5.72 \cdot 10^{-3}$
MnCl₂. 4H₂O	$1.81 \cdot 10^{-3}$	$3.62 \cdot 10^{-3}$
ZnSO₄. 7H₂O	$0.222 \cdot 10^{-3}$	$0.444 \cdot 10^{-3}$
CuSO₄. 5H₂O	$0.079 \cdot 10^{-3}$	$0.158 \cdot 10^{-3}$
COCl₂. 6H₂O	$0.050 \cdot 10^{-3}$	$0.1 \cdot 10^{-3}$
NaMoO₄. 2H₂O	$0.391 \cdot 10^{-3}$	$0.782 \cdot 10^{-3}$
NaNO₃	1.5	3.0
HEPES pH 8	2.38	1.19

3.1.3 Apparecchiature

Gli esperimenti sono stati condotti in fotobioreattori di tipo *flat-panel* con dei volumi di reazione rispettivamente di 150 ml in condizioni batch e di 400 ml in condizioni continue.

Questa geometria è stata adottata per limitare lo spessore e assicurare un'elevata superficie di esposizione alla luce; la minimizzazione della profondità permette di ridurre la zona buia del reattore e di conseguenza il fenomeno del *self-shading*.

Il sistema è costituito da una struttura a 'U' in policarbonato che definisce essenzialmente lo spessore; da entrambi i lati di questa sono fissate due lastre dello stesso materiale. Tra ogni lastra e struttura a U viene, inoltre, applicata una guarnizione (Figura 3.2).

In Figura 3.2 si riportano alcune caratteristiche progettuali specifiche.

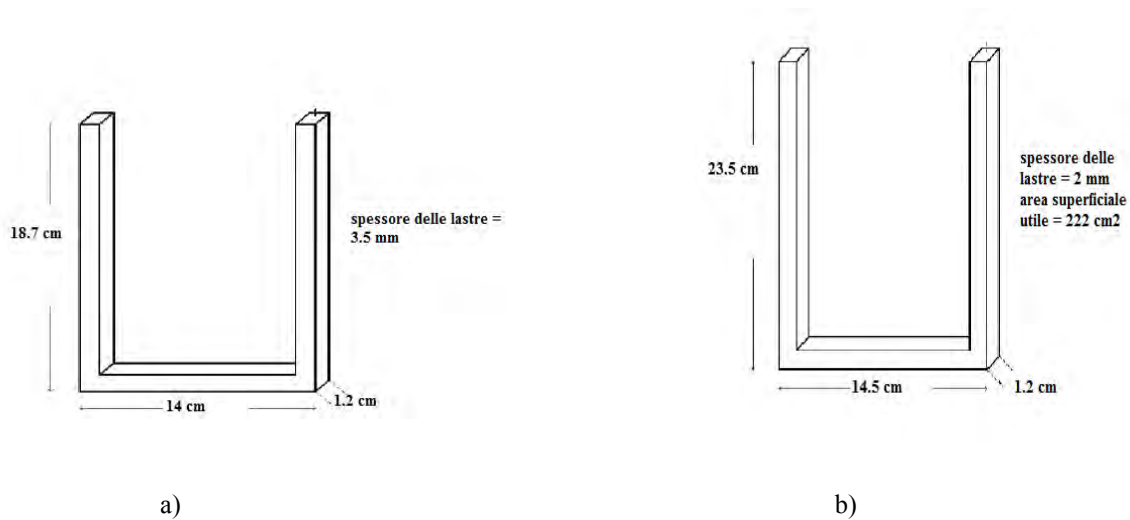


Figura 3.2. Caratteristiche progettuali dei *flat-panels* usati negli esperimenti batch (a) e continuo (b).

Tutti i materiali con cui sono costruiti i fotobioreattori presentano le caratteristiche di resistenza alle temperature tipiche dell'autoclave, di atossicità nei confronti delle microalghe e di alta trasparenza per uno sfruttamento della luce il più efficiente.

La CO₂ viene fornita grazie ad un tubo forato in marprene fatto passare attraverso 2 fori ricavati alle estremità inferiori laterali della struttura a U. Sia per il pannello batch sia per quello continuo si prevede un'alimentazione costante di aria arricchita di CO₂ al 5 % v/v e alla pressione di 1.5 bar (la pressione è superiore a quella atmosferica per vincere le perdite di carico distribuite lungo la tubazione e quelle dovute allo sparger e al gorgogliamento del gas nella fase acquosa). La fornitura della corrente gassosa è assicurata da 2 bombole contenenti rispettivamente aria e CO₂; in uscita da ognuna di queste vi è un riduttore di pressione per abbassare le pressioni dei gas e un flussimetro volumetrico che permette di regolare le portate e quindi la composizione di CO₂ in ingresso al fotobioreattore.

Dopo i flussimetri le 2 linee di gas si congiungono attraverso un raccordo a T; la miscela ottenuta viene sottoposta ad un sistema di filtrazione per ridurre i rischi di contaminazione e viene alimentata in parallelo a più pannelli. Prima di ognuno di questi si trova quindi un'ulteriore valvola che consente la regolazione delle portate. L'aria arricchita di CO₂ viene fatta gorgogliare all'interno del pannello; la CO₂ si solubilizza e viene poi utilizzata dalle microalghe come substrato carbonioso.

Per il reattore batch l'areazione è sufficiente alla miscelazione della biomassa in quanto il volume in gioco è piccolo. Per il reattore continuo invece si utilizza anche un agitatore messo in movimento all'interno del pannello tramite un magnete.

La temperatura ottimale di crescita di *Scenedesmus obliquus* è intorno ai 23°C e viene mantenuta posizionando i pannelli all'interno di incubatori refrigerati.

Nel caso del reattore continuo (Figura 3.3) vi è una seconda alimentazione che porta i nutrienti necessari alla crescita della specie algale; la fornitura di nuovo mezzo di coltura è garantita da una pompa peristaltica (Watson-Marlow sci400) che pesca il liquido contenuto all'interno di una beuta o di una bottiglia, tenuta in agitazione per evitare una eventuale sedimentazione dei sali, riempita regolarmente per mantenere costante l'apporto dei nutrienti e mantenuta alla stessa temperatura del reattore.

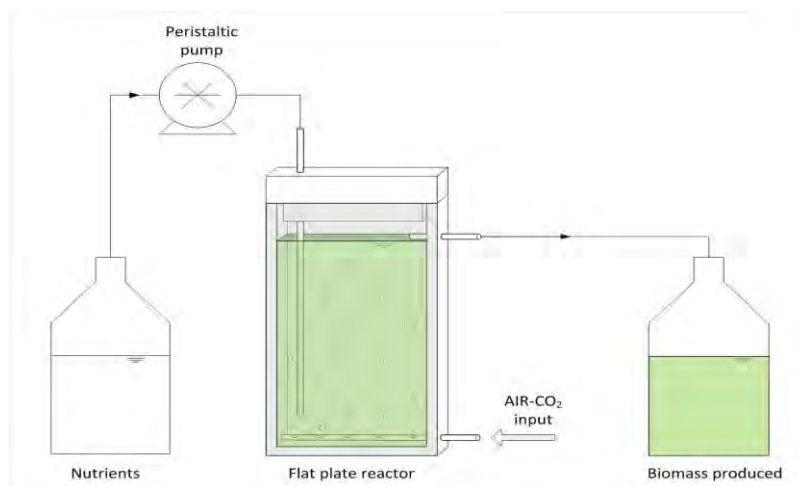


Figura 3.3. Schematizzazione dell'impianto di produzione di alghe in condizioni continue (Ramos Tercero *et al.*, 2013).

Il fluido scorre all'interno di opportuni tubi in neoprene; il volume di reazione è tenuto costante grazie ad un troppopieno realizzato ad una estremità laterale della struttura a U. La

tubazione di uscita convoglia la biomassa prodotta ad un altro recipiente regolarmente svuotato per evitare il sovrariempimento.

3.1.3.1 Lampade

I pannelli vengono esposti solo da un lato a luce artificiale fissa nel tempo. Le intensità di luce indagate sono 150 e 350 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$. Per garantire irradianze basse (150 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) si utilizzano comuni lampade al neon: vengono sistemate a gruppi di 3 e poste in configurazione orizzontale rispetto al pannello; irradianze superiori (350 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$) vengono invece fornite da un'opportuna lampada a LED realizzata dalla ditta Photosynthetic Instruments (PSI). Questa lampada, costituita da 112 LED disposti 14x8, è in grado di assicurare un irraggiamento massimo di 1700 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$. Il reattore viene posizionato ad una certa distanza dal sistema di lampade in modo tale che in corrispondenza di esso l'intensità luminosa misurata sia 150 o 350 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$.

La luce incidente viene in genere misurata in 4 o 5 punti, che corrispondono agli angoli superiori e inferiori ed al centro del fotobioreattore, grazie ad un radiometro DeltaOhm HD2102.1.

3.1.4 Metodi di misurazione e strumentazione

La crescita di *Scenedesmus obliquus* nei sistemi di coltura batch e continuo viene monitorata attraverso le seguenti analisi condotte giornalmente:

- misura di densità ottica e di concentrazione cellulare;
- misura di peso secco;
- misura di distribuzione di taglia delle cellule.

3.1.4.1 Misura di densità ottica

La misura di densità ottica (abbreviata con OD) è una misura indiretta della concentrazione cellulare; la sua determinazione quantitativa si basa sul fatto che quando il campione microalgale è colpito da radiazione luminosa, una parte di questa viene assorbita dal campione stesso in base alla sua concentrazione cellulare. La densità ottica, più conosciuta con il nome di assorbanza, viene calcolata nel seguente modo:

$$As = \text{Log}\left(\frac{1}{Tr}\right) . \quad (3.1)$$

dove Tr indica la trasmittanza ed è definita come il rapporto tra l'intensità della radiazione trasmessa I_t e quella della radiazione incidente I_0 .

La trasmittanza è un parametro adimensionale compreso tra 0 e 1: quando $Tr = 1$ significa che la radiazione è stata completamente trasmessa mentre quando $Tr = 0$ che la radiazione incidente è stata assorbita interamente (il fenomeno di riflessione non si verifica).

La trasmittanza è relazionata alla concentrazione della soluzione attraverso la legge di Lambert-Beer:

$$Tr = 10^{-\varepsilon_\lambda \cdot l \cdot C} \quad (3.2)$$

dove ε_λ è il coefficiente di estinzione molare caratteristico della sostanza ($l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l è il cammino ottico (cm) , ovvero lo spessore del campione attraversato dalla radiazione e C è la concentrazione del componente di interesse (mol/l).

L'assorbanza risulta quindi:

$$As = \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot C \quad (3.3)$$

Si noti che questo parametro è adimensionale e può assumere valori superiori a 1.

Il coefficiente di estinzione ε_λ rappresenta il valore di assorbanza che si ottiene con un cammino ottico unitario di 1 cm e una concentrazione 1 M. Può essere considerato costante per una sostanza sottoposta a radiazione con lunghezza d'onda fissa e per un certo intervallo di concentrazione. Questo range corrisponde a valori di As tra 0.1 e 1 (in questo intervallo As e C presentano una relazione di linearità); sotto il valore minimo e sopra quello massimo il campione deve essere rispettivamente concentrato o diluito e le misure di As ottenute vanno rispettivamente divise per il fattore di concentrazione o moltiplicate per quello di diluizione.

In realtà le misure di densità ottica che vengono condotte sui campioni microalgali non sono vere e proprie misure di assorbimento ma di scattering.

Con scattering si indica il fenomeno di deflessione casuale e disordinata della luce dovuto alla presenza di poche o tante particelle con dimensioni più o meno piccole.

La strumentazione utilizzata per l'acquisizione di misure di densità ottica è lo spettrofotometro a doppio raggio UV-Visibile UV 300 realizzato dalla ditta Spectronic Unicam. Esso possiede 2 sorgenti di luce policromatica, una lampada al tungsteno che emette radiazione visibile con lunghezza d'onda tra 300 e 930 nm e una al deuterio per l'emissione di radiazione UV sotto i 400 nm. Il raggio luminoso generato passa attraverso un filtro/monocromatore che serve a selezionare la banda di lunghezza d'onda desiderata e viene poi sdoppiato in modo tale da colpire le cuvette che sono inserite in appositi porta-campioni e contengono rispettivamente il campione algale e il 'bianco', realizzato con il relativo terreno di coltura.

Per la misura di densità ottica la lunghezza d'onda analizzata (λ) è 750 nm; le cuvette utilizzate hanno un volume di 2 ml e sono di materiale plastico trasparente che non assorbe la λ di riferimento. A valle vi sono 2 detectors che trasformano il segnale luminoso in un impulso elettrico. L'intensità rilevata nel caso del bianco corrisponde a quella incidente I_0 , nel caso del campione a quella trasmessa I_t . La conoscenza dei 2 dati permette il calcolo di Tr e As .

Per considerare l'errore di fondo (come un eventuale assorbimento da parte del medium) si esegue sempre prima della misura di OD del campione quella del solo bianco - in questo modo si azzerra la differenza tra I_0 e I_t attraverso il terreno.

3.1.4.2 Conta cellulare

La concentrazione cellulare può essere misurata direttamente al microscopio ottico grazie ad una camera di Burker. Questa è costituita da un vetrino rettangolare e presenta 2 celle che hanno una profondità di 1/10 mm. Il piano di ogni cella risulta diviso in 9 quadrati di lato 1 mm e separati da una linea tripla. Ciascuno dei 9 quadrati comprende a sua volta 16 quadrati più piccoli con una superficie di 1/25 mm², delimitati da una linea doppia. Sopra all'emocitometro viene poi collocato un vetrino copri-oggetto.

Si procede quindi nel seguente modo:

- si diluisce in modo opportuno il campione di coltura, si aspira la sospensione acquosa con una pipetta e si riempie una delle 2 celle della camera di Burker;
- appoggiato il vetrino sotto il microscopio, si contano le cellule presenti nei 3 quadrati in diagonale considerando per ognuno la linea più esterna come bordo, come si vede in Figura 3.4;
- si calcola infine la concentrazione cellulare (N) in cell/ml con:

$$N = n_{mean} \cdot f_d \cdot 10^4 \quad (3.4)$$

dove n_{mean} è il numero medio di cellule contate nei quadrati in diagonale e f_d è il fattore di diluizione.

In genere si cerca di diluire il campione da analizzare in modo tale che per ogni quadrato la conta sia non più di 100-130 cellule.

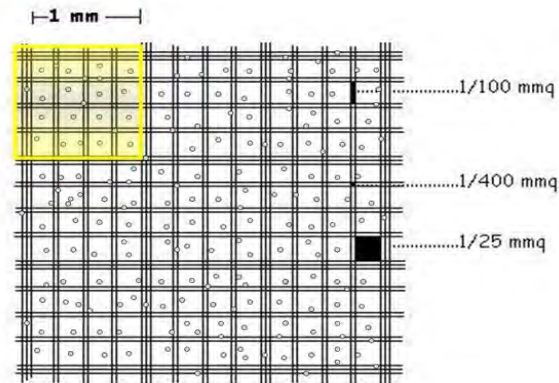


Figura 3.4. Camera di burker.

3.1.4.3 Peso secco

Con peso secco si indica la misura della concentrazione ponderale di biomassa secca C_{BS} in g/l.

L'analisi consiste innanzitutto nel prelevare un volume noto di coltura: la quantità da utilizzare dipende dalla concentrazione cellulare. Per separare l'acqua di bulk dalla biomassa si impiegano dei filtri in nitrocellulosa con pori delle dimensioni di $0.2 \mu\text{m}$. Questi filtri vengono prima essiccati in forno per 10 minuti a 80°C per togliere l'eventuale umidità assorbita e poi pesati per conoscere il valore di tara. La separazione vera e propria delle cellule dal terreno avviene per aspirazione della massa liquida che passa attraverso il filtro. Lo strumento utilizzato è una beuta da vuoto; il recipiente è collegato ad un tubo Venturi che, una volta aperto, crea il vuoto all'interno. Sopra la beuta viene appoggiato il filtro e viene fissata una struttura di metallo a forma di imbuto che serve a contenere il volume di coltura versato. La depressione creata all'interno della beuta aspira il campione: in questo modo il terreno si raccoglie sul fondo della beuta mentre la biomassa rimane depositata sopra il filtro.

A questo punto il filtro viene posto in forno per 2 ore a 80°C per eliminare l'acqua intracellulare e, in seguito, pesato; si può ora calcolare il valore di peso secco nel seguente modo:

$$C_{BS} = \frac{m_{BS}}{V} \quad (3.5)$$

dove m_{BS} è la differenza tra il peso di filtro+biomassa secca e la tara mentre V è il volume di coltura prelevato.

Noti i valori di concentrazione cellulare N e di peso secco C_{BS} , si può infine ricavare il valore di massa media secca delle cellule $z_{S,mean}$, in pg, come:

$$z_{S,mean} = \frac{C_{BS}}{N} \quad (3.6)$$

3.1.4.4 Distribuzione di massa

Per la determinazione della distribuzione di massa delle cellule viene utilizzata la strumentazione ‘Cellometer Auto X4’ prodotta dall’azienda Nexcelon Bioscience e in dotazione al Dipartimento di Biologia (Laboratorio del prof. T. Morosinotto).

Questa apparecchiatura restituisce in modo automatico e simultaneo il numero e la concentrazione in cell/ml, il diametro medio e la percentuale delle cellule vitali presenti nel campione sottoposto all’analisi. Il cellometro è in grado di contare cellule di forma irregolare, raggruppate in clusters e di escludere allo stesso tempo i detriti cellulari. Lo strumento scatta immagini in campo chiaro e in fluorescenza basandosi sul principio che le cellule vive tendono a fluorescere di più di quelle morte.

Si procede pertanto nel seguente modo:

- si diluisce in modo opportuno il campione da sottoporre all’analisi – il range di applicabilità del cellometro è circa $1-80 \cdot 10^6$ cell/ml (in genere si diluisce la coltura microalgale in modo tale che la concentrazione finale sia sempre intorno a $20-30 \cdot 10^6$ cell/ml);
- si prelevano 20 μ l della sospensione acquosa con una pipetta e si riempie una delle 2 camerette di cui è disposta la piastrina di misurazione fornita dall’azienda produttrice assieme al cellometro – la piastrina utilizzata è in materiale plastico con 2 camerette del volume di 20 μ l, ognuna di queste è composta da un foro attraverso cui viene introdotto il campione e da uno di uscita dell’aria e al centro da una griglia in corrispondenza della quale vengono contate le cellule (Figura 3.5);

- si inserisce l'emocitometro attraverso un'apposita fessura presente nello strumento collegato poi ad un personal computer;
- si mette a fuoco con un'apposita rotellina l'immagine che compare sullo schermo del computer e si introduce, infine, il fattore di diluizione utilizzato.

Il programma restituisce così un data sheet completo dove sono raccolti:

- i valori di conta assoluta nel reticolo, di concentrazione delle cellule totali (N) e di solo quelle vitali e il diametro medio di una cellula;
- le dimensioni di ogni cellula contata in corrispondenza del reticolo (il diametro è corretto con un fattore di rotondità di 0.1) e una relativa distribuzione di taglia sotto forma di dati e di un istogramma (in ascissa è riportata la taglia in μm e in ordinata il numero di cellule contate con quel diametro nella griglia).

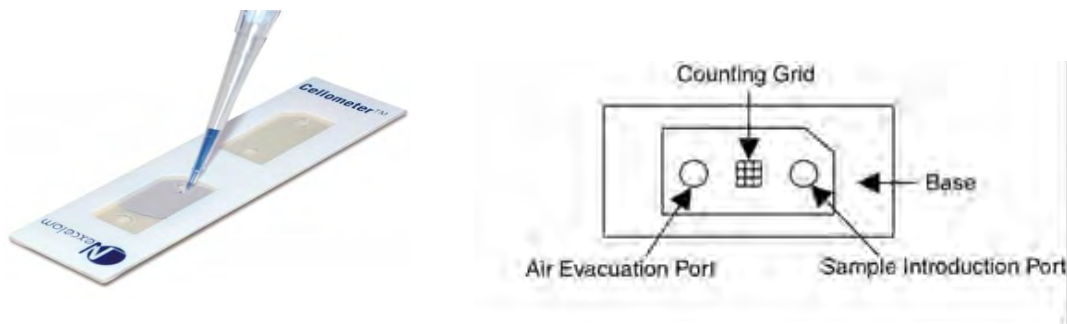


Figura 3.5. Piastrina usata per la misurazione al cellometro e sua relativa schematizzazione.

Per ogni campione prelevato dal fotobioreattore vengono sempre condotte almeno 2 misurazioni al cellometro per garantire una maggiore affidabilità dei dati sperimentali. A partire dalle 2 serie di dati di taglia vengono calcolati i valori di massa in pg per ogni cellula sotto ipotesi di particelle di forma sferica e con densità ρ pari a $1.2 \text{ pg}/\mu\text{m}^3$ (la conoscenza di questo dato viene chiarita nel paragrafo successivo).

Si costruisce quindi un unico intervallo di variabilità per la massa partizionato in un fissato numero di classi (n_{classi}) con la stessa ampiezza (A), ad eccezione della prima (costruita in modo tale che in corrispondenza di essa la conta delle cellule sia nulla). Ogni intervallo viene descritto assumendo come massa caratteristica il valore medio tra i suoi estremi ($z_{i,\text{mean}}$).

Per ogni analisi eseguita sullo stesso campione di coltura algale, si passa quindi al calcolo del numero assoluto di cellule (n_i) contate in ogni intervallo, della frequenza (f_i in pg^{-1}) e della

concentrazione di cellule (W_i in cell ml⁻¹ pg⁻¹), ricavate rispettivamente con le seguenti equazioni:

$$f_i = \frac{n_i}{\sum_{n\text{classi}} n_i \cdot A} \quad (3.7)$$

$$W_i = N \cdot f_i \quad (3.8)$$

A questo punto i valori di W_i , riferiti alle analisi realizzate sul campione sotto esame, vengono mediati tra loro ($W_{i,mean}$). Di seguito si riportano le espressioni che permettono di ricavare la concentrazione media di cellule (N_{mean}), i dati medi di frequenza ($f_{i,mean}$), la massa media di una cellula (z_{mean}) e la concentrazione ponderale di biomassa (C_B):

$$N_{mean} = \sum_{n\text{classi}} W_{i,mean} \cdot A \quad (3.9)$$

$$f_{i,mean} = \frac{W_{i,mean}}{N_{mean}} \quad (3.10)$$

$$z_{mean} = \sum_{n\text{classi}} f_{i,mean} \cdot z_{i,mean} \cdot A \quad (3.11)$$

$$C_B = \sum_{n\text{classi}} W_{i,mean} \cdot z_{i,mean} \cdot A \quad (3.12)$$

Le distribuzioni di massa in termini di f_{mean} o di W_{mean} così ricavate possono essere rappresentate graficamente e confrontate successivamente con quelle ottenute allo stesso giorno di coltura dalla risoluzione dell'equazione di bilancio di popolazione.

Si tenga presente che i valori di z_{mean} e C_B calcolati secondo le equazioni (3.11) e (3.12) non coincideranno con i dati sperimentali di massa media secca $z_{S,mean}$ e peso secco C_{BS} in quanto nel primo caso il riferimento è biomassa fresca, ovvero caratterizzata da cellule con il contenuto di acqua ancora integro, mentre nel secondo caso la misura è realizzata su biomassa

essiccata, ovvero caratterizzata dalla perdita di una sostanziale parte dell'acqua intracellulare: per evitare una possibile confusione, C_B e z_{mean} verranno indicati rispettivamente con i termini di peso fresco e massa media fresca.

3.1.4.5 Misura di densità di una singola cellula

La determinazione del valore di densità assunto da una singola cellula, e quindi della biomassa, è stata condotta secondo la seguente procedura:

- si preleva un volume noto di coltura microalgale V , che viene successivamente pesato. Al peso totale misurato si sottrae la tara della provetta in modo tale da ottenere il peso del terreno e della biomassa presente;
- grazie alla strumentazione descritta nel paragrafo precedente è possibile ricavare la concentrazione di cellule (N_{mean}) e il volume medio di una cellula V_{mean} (come media aritmetica tra i dati di volume ricavati a partire da quelli di taglia sotto l'ipotesi di una forma sferica per le cellule). Questi dati permettono il calcolo del volume occupato dalle cellule grazie a $V_{cellule} = V \cdot N_{mean} \cdot V_{mean}$;
- al volume totale del campione si sottrae quello occupato dalle cellule per conoscere il volume di terreno e di conseguenza il suo peso (la densità del terreno corrisponde a quella dell'acqua);
- la differenza tra il peso totale del campione e quello del terreno coincide con il peso delle sole cellule;
- Il rapporto tra la massa totale delle cellule e il loro volume restituisce infine il valore di densità di una singola cellula ρ .

La misura è stata condotta 4 volte su differenti campioni prelevati rispettivamente da una coltura batch sottoposta a intensità luminosa di $350 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, da una coltura di inoculo sottoposto a bassa illuminazione intorno ai $100 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ e in doppio da una coltura di un fotobioreattore continuo in condizioni transitorie e sottoposto a luce pulsata con un'intensità media di $150 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$. I valori trovati sono riportati in Tabella 3.2.

Tabella 3.2. Valori sperimentali di densità della biomassa algale.

Campione	Densità della biomassa (g/ml)
inoculo	1.29
Batch 350 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$	1.25
1.Continuo 150 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$	1.06
2.Continuo 150 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$	0.94

Nella determinazione di ogni distribuzione di massa si è deciso di considerare un valore di densità costante ottenuto come media tra i primi 3 dati elencati nella Tabella 3.3 e pari 1.2 g/ml (in Gunnar e Dundas, 1984 si riporta come range di densità per *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas putida* 1.03-1.24 g/ml).

Si è inoltre osservato che, applicando questo valore di densità ai dati delle dimensioni raccolti da ogni prova sperimentale (sia in condizioni batch sia in condizioni continue), il rapporto tra la misura di peso secco, aggiustata considerando un 8% di acqua residua all'interno della cellula ($C_{\text{BS-8\%acqua}}$; Solana *et al.*, 2014), e la concentrazione in peso di biomassa fresca (C_{B}), rimane sempre nel range 12-34%: il valore medio tra tutti i punti sperimentali si aggira intorno al 20%; ciò significa che il contenuto di acqua in una cellula è dell'80%, che corrisponde a un dato tipico di letteratura (Cooke *et al.* 1974).

Si considera dunque un rapporto costante pari a 0.20 tra $C_{\text{BS-8\%acqua}}$ e C_{B} . La sua conoscenza permetterà di convertire successivamente dati di peso secco, raccolti durante gli esperimenti, in peso fresco in modo tale da avere ora 2 misure confrontabili tra loro ed eventualmente mediabili.

Si ricorda comunque che i dati di peso fresco, ottenuti dalle distribuzioni di massa o dalla conversione dei valori di peso secco, sono comunque soggetti ad un errore non trascurabile in quanto la densità di colture unicellulari è molto difficile da determinare e la frazione di acqua nella cellula è strettamente legata alle condizioni osmotiche extracellulari.

3.1.5 Procedure

Scenedesmus obliquus viene mantenuta in piastre Petri contenenti BG11 sterile e plant agar.

Con queste colture si preparano dei preinoculi ottenuti aggiungendo terreno di coltura e acqua deionizzata, entrambi sottoposti a sterilizzazione a 120°C per 20 minuti in modo tale da ridurre i rischi di una possibile contaminazione. I preinoculi sono conservati in beute tenute in continua agitazione per evitare la sedimentazione della biomassa prodotta e posizionate all'interno di incubatori dove si mantiene una temperatura di 23°C con illuminazione ridotta. Periodicamente si aggiunge del BG11 fresco alle beute per mantenere le colture in fase di attiva crescita (la regolare diluizione della biomassa con nuovo terreno permette di mantenere le cellule in fase di crescita esponenziale).

La partenza di ogni pannello batch prevede le seguenti operazioni:

- sterilizzazione in autoclave a 120°C per 20 min del fotobioreattore, della tubazione usata per l'aerazione, del terreno di coltura e di acqua deionizzata;
- misura della concentrazione cellulare nell'inoculo in beuta per via diretta o indiretta (nel lavoro si è eseguita una misura indiretta di densità ottica);
- diluizione dell'inoculo con il terreno e l'acqua distillata in modo tale che il volume di reazione iniziale sia 150 ml, il valore di densità ottica di partenza sia intorno a 0.1 e le concentrazioni dei nutrienti siano quelle riportate nella prima colonna di Tabella 3.1;
- verifica del valore di densità ottica con cui inizia effettivamente l'esperimento e di eventuali perdite di biomassa dal reattore.

Successivamente il pannello viene collegato alla tubazione che fornisce la CO₂ ed è posizionato di fronte alla lampada ad una distanza tale per cui si misura mediamente l'intensità desiderata in corrispondenza del lato esposto alla sorgente di luce.

Per il reattore continuo si procede con la preparazione di una bottiglia di preinoculo, una Quickfit® Drechsel Bottle da 250 ml della Sigma-Aldrich®. Il preinoculo è realizzato prelevando una certa quantità di inoculo mantenuto in beuta e aggiungendo acqua e terreno BG11 nelle corrette proporzioni fino ad arrivare a 200 ml.

La bottiglia viene tenuta in incubatore alla temperatura di 23°C e a basse intensità di luce; in essa è fatta gorgogliare una miscela di aria e CO₂ al 5% v/v. Lo scopo è di far crescere in pochi giorni biomassa sufficiente da utilizzare poi durante la fase di startup del pannello. Il preinoculo viene prelevato e miscelato ad altro terreno in modo tale che il volume di reazione per il continuo sia alla fine di 400 ml e le concentrazioni dei nutrienti siano quelle riportate nella seconda colonna di Tabella 3.1 (in questo caso l'OD di partenza dell'esperimento è 1.0). Il pannello viene infine collegato alla tubazione che porta la CO₂ e posizionato di fronte alla lampada come negli esperimenti condotti in batch.

Il reattore viene prima mantenuto in condizioni discontinue fino a quando non si raggiunge una concentrazione sufficiente (intorno a $90 \cdot 10^6$ cell/ml) e a questo punto viene messo in continuo collegandolo alle tubazioni di alimentazione e uscita della fase liquida.

In base alla velocità di rotazione della pompa peristaltica e al diametro del tubo utilizzato per l'alimentazione del terreno si possono garantire diverse portate volumetriche di *medium*. Dato che il volume di reazione è tenuto costante grazie ad un troppopieno si può studiare la coltivazione di *Scenedesmus* a diversi tempi di permanenza.

3.2 Risultati sperimentali e discussione

Durante l'attività sperimentale si sono svolti 3 esperimenti in modalità batch e uno in modalità continua.

Per le prove in condizioni batch sono state indagate 2 diverse intensità di luce fissa, $150 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ e $350 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, in modo tale da studiare la crescita microalgale in termini di concentrazione numerale e ponderale e di distribuzione di massa sia in condizioni di luce limitante che in quelle di luce saturante/inibente per la crescita stessa.

Nel caso di illuminazione saturante sono stati condotti 2 esperimenti al fine di verificare l'affidabilità dei dati sperimentali particolari raccolti durante la prima prova.

Per l'esperimento svolto in condizioni continue, il fotobioreattore è stato sottoposto a illuminazione costante pari a $150 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$; i relativi dati sono stati raccolti a tre diversi tempi di permanenza di 1.04, 3.1 e 0.9 d.

3.2.1 Dati raccolti per l'esperimento batch a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

In Figura 3.6 viene riportata la curva di crescita di *S. obliquus* a $150 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ in termini di cell/ml.

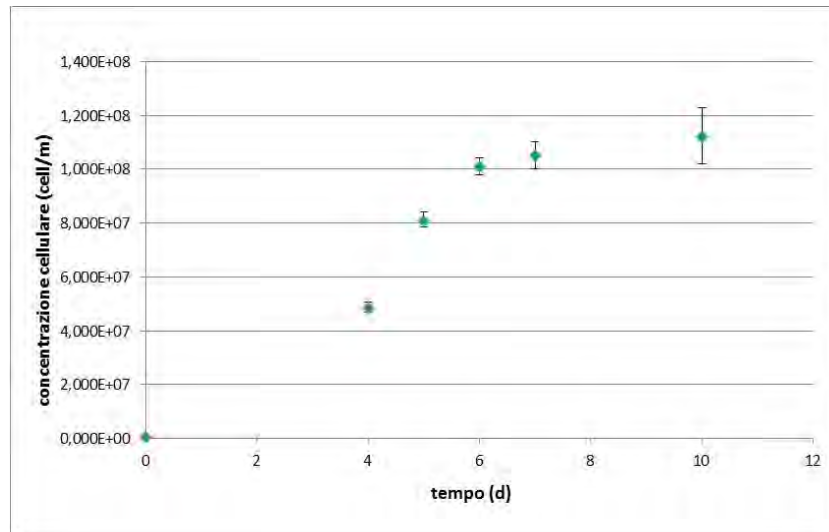


Figura 3.6. Profilo di concentrazione di cellule ottenuto in condizioni batch a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Sotto l'ipotesi di nutrienti non limitanti è possibile ricavare una costante di crescita sul numero di cellule k_N dipendente solo dall'intensità di luce (tenendo in considerazione solo i punti corrispondenti alla fase esponenziale).

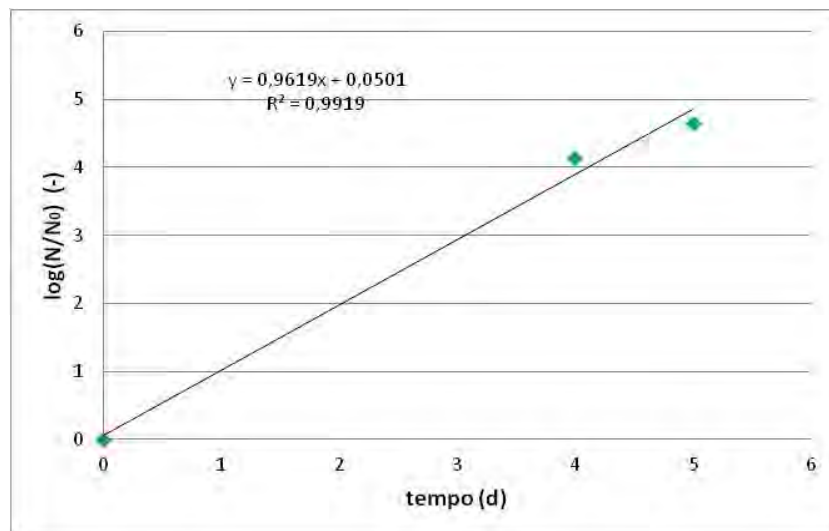


Figura 3.7. Profilo logaritmico della concentrazione di cellule (N) normalizzata rispetto a quella iniziale (N_0) a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per il calcolo della velocità specifica di crescita sul numero di cellule k_N .

In Figura 3.7 la velocità specifica di crescita k_N rappresenta il coefficiente angolare della retta di interpolazione dei dati sperimentali appartenenti alla fase logaritmica della crescita microalgale, che termina in corrispondenza del 4°-5° giorno di coltura.

La Figura 3.8 a) e b) mostra invece i profili sperimentali di crescita di biomassa secca (C_{BS}) e fresca (C_B) in g/l (si ricorda che i dati di peso fresco si riferiscono ai valori di concentrazione calcolati a partire dalle distribuzioni sperimentali di massa relative ad ogni giorno di esperimento).

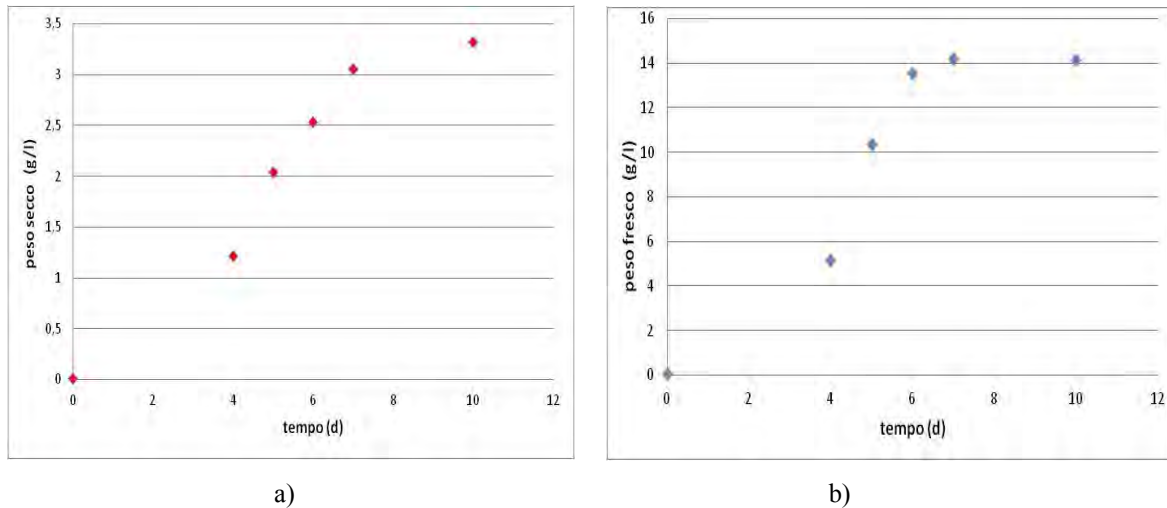


Figura 3.8. Profili di concentrazione di biomassa secca (a) e fresca (b) in g/l ottenuti in condizioni batch a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

In Figura 3.9 a) e b) si riportano i profili linearizzati di C_{BS} e C_B relativi alla fase esponenziale per il calcolo della costante di crescita in termini di peso k_B .

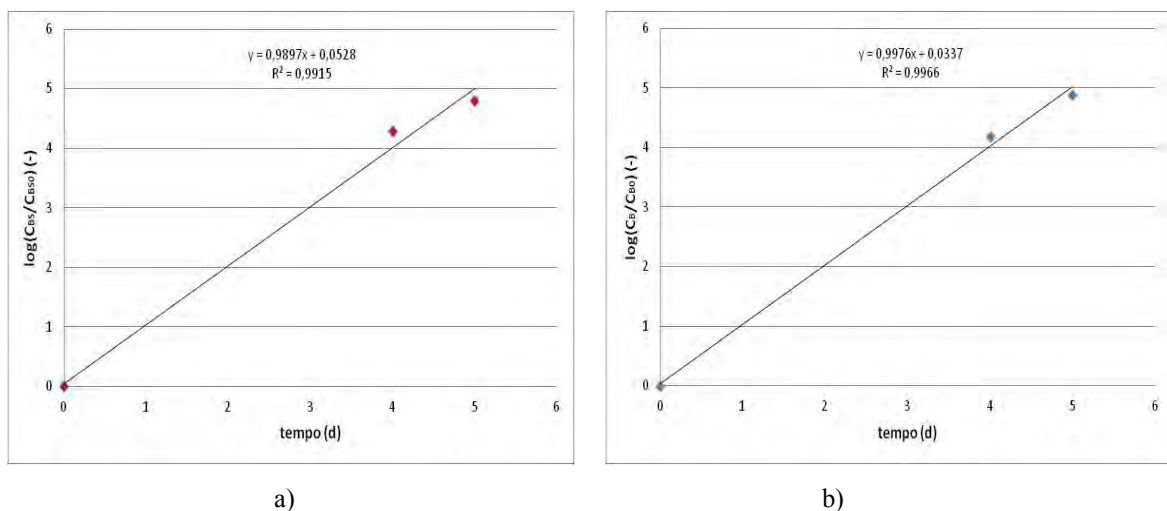


Figura 3.9. Profili logaritmici della concentrazione di biomassa secca (C_{BS}) normalizzata rispetto a quella iniziale (C_{BS0}) (a) e della concentrazione di biomassa fresca (C_B) normalizzata rispetto a quella iniziale (C_{B0}) (b), a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, per il calcolo della velocità specifica di crescita in termini di peso k_B .

Si può osservare come l'interpolazione dei punti con una retta restituisca, in entrambi i casi, 2 valori di velocità molto simili tra loro: si considera quindi un k_B medio di 0.994 d^{-1} .

I dati di peso secco vengono quindi convertiti in valori di peso fresco, fissato il rapporto $C_{BS(8\% \text{ DI ACQUA})}/C_B = 20\%$, ovvero $C_{BS}/C_B = 22\%$ (come discusso nel paragrafo 3.1.4.5), in modo tale da considerare un grafico unico per la rappresentazione dell'andamento della concentrazione ponderale: in Figura 3.10 vengono graficati i valori di concentrazione ottenuti come media tra i dati di peso fresco calcolati in base a questa conversione e i dati di peso fresco ottenuti direttamente dalle distribuzioni sperimentali di massa.

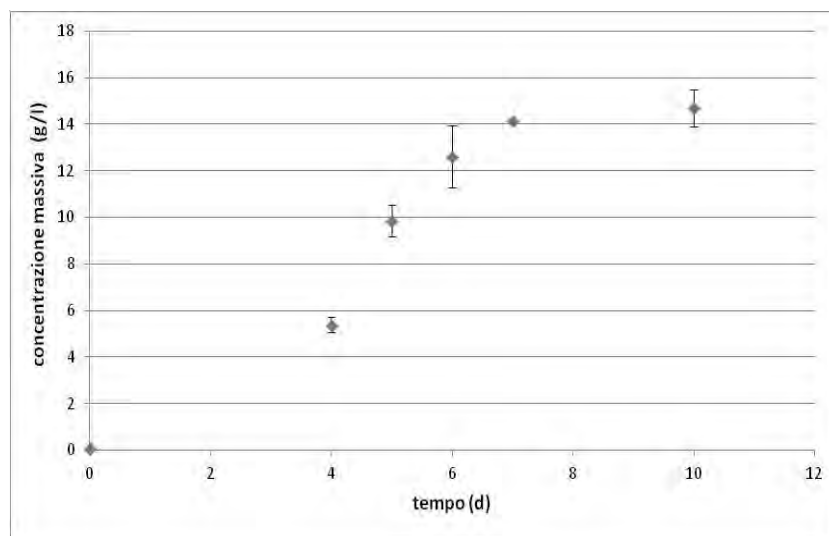


Figura 3.10. Profilo di concentrazione di biomassa fresca in g/l ottenuto in condizioni batch a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

In Figura 3.11 si riassumono le distribuzioni di massa relative ai giorni seguiti dell'esperienza batch in termini di concentrazione $W(z,t)$, la quale viene riportata in forma adimensionale tramite normalizzazione con un opportuno fattore di scala (in questo caso si considera il valore di picco della distribuzione iniziale).

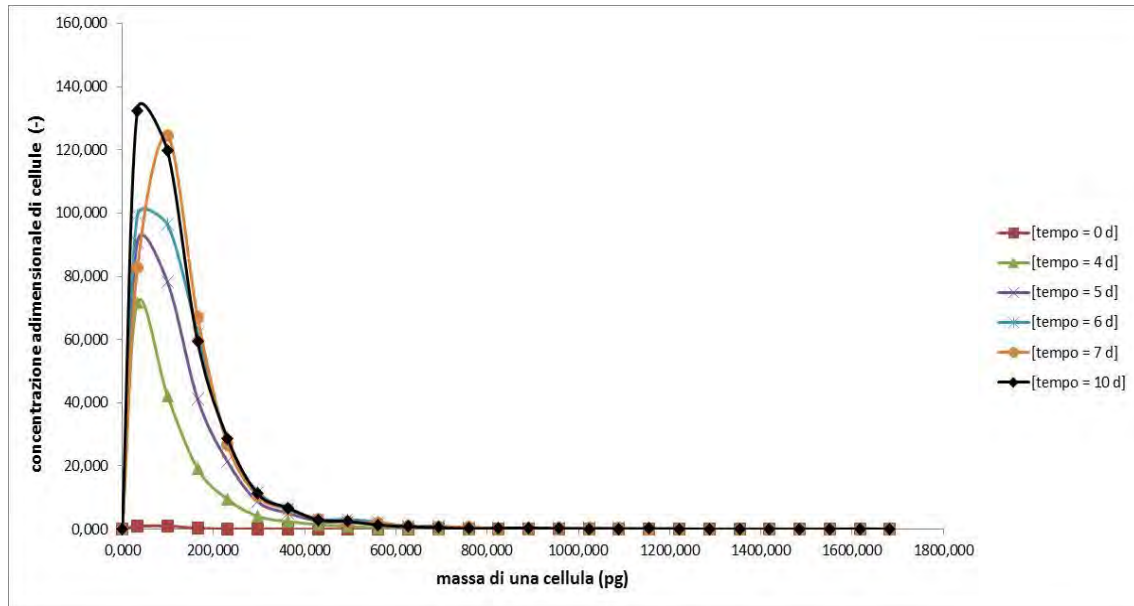


Figura 3.11. Distribuzioni adimensionali di massa per ogni giorno seguito dell'esperimento batch a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; la concentrazione è normalizzata rispetto al valore di picco della distribuzione dell'inoculo.

Si può osservare che i profili presentano un valore medio di peso per cellula simile; nel tempo le curve tendono quindi a salire perché la concentrazione di cellule aumenta senza esibire tuttavia una dispersione significativa dei dati. Questa scarsa variabilità delle dimensioni nel tempo risulta più chiara in Figura 3.12 dove vengono rappresentate le funzioni di distribuzione in termini di frequenza $f(z, t)$.

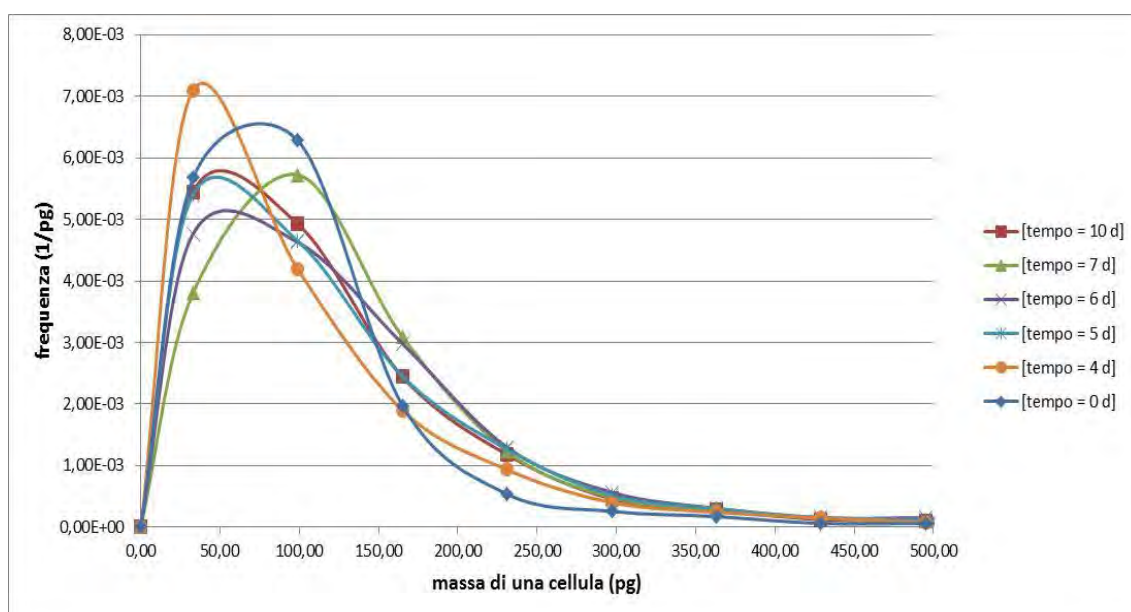


Figura 3.12. Distribuzioni di massa in termini di frequenza per ogni giorno seguito dell'esperimento batch a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intervallo di massa ridotto a 500 pg).

A conferma di quanto detto, si mostrano, infine, in Figura 3.13 a) e b) i profili di massa media secca e fresca di una cellula.

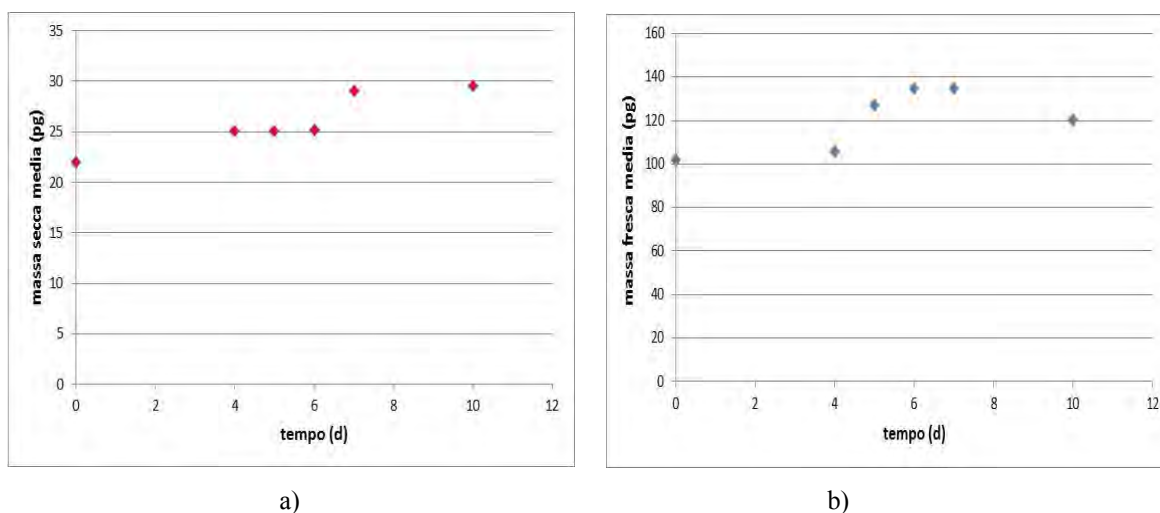


Figura 3.13. Profili di massa media secca (a) e fresca (b) ottenuti in condizioni batch a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2.2 Dati raccolti per gli esperimenti batch a $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Nelle Figure 3.14 e 3.15 vengono presentate, per entrambi gli esperimenti realizzati in condizioni di luce non limitante, le curve caratteristiche di crescita della conta cellulare e della concentrazione ponderale di biomassa (i valori di peso secco sono già convertiti nei corrispondenti valori di peso fresco seguendo la stessa procedura descritta per il caso a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

I profili ottenuti sono simili tra loro; rispetto a intensità luminosa di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ si osserva una prima fase lag di adattamento della durata di 2 giorni all'incirca. Si ricorda che il valore di densità ottica con cui parte ogni prova è molto basso.

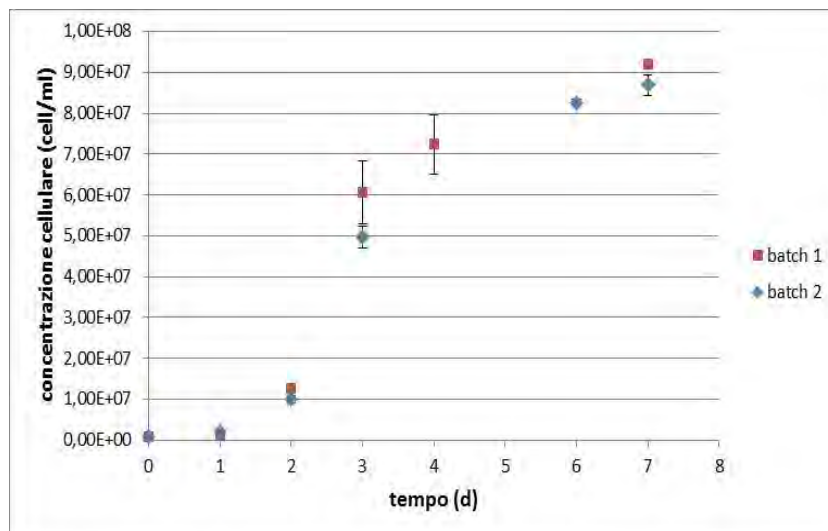


Figura 3.14. Profili di concentrazione di cellule ottenuti in 2 prove sperimentali batch a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

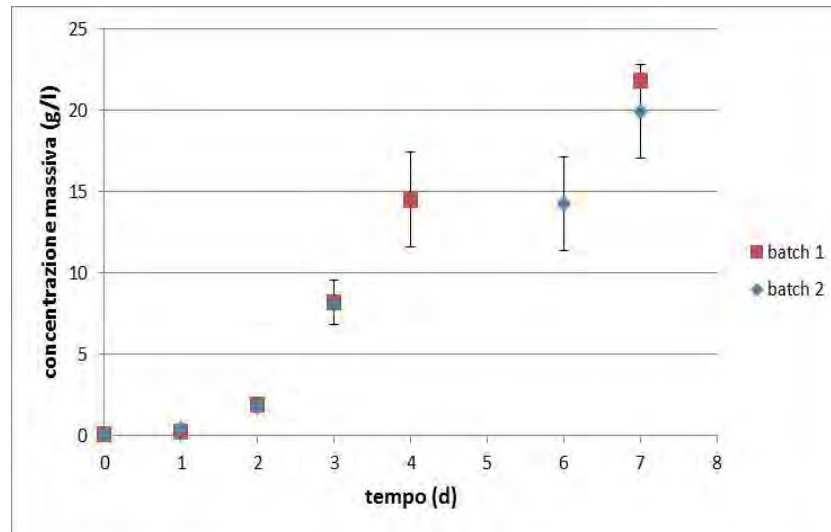


Figura 3.15. Profili di concentrazione di biomassa fresca in g/l ottenuti in 2 prove sperimentali batch a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

I valori delle costanti di crescita k_N e k_B , misurate in fase esponenziale, risultano entrambe di 1.29 d^{-1} per il primo esperimento (Figura 3.16 a e b) e 1.357 e 1.518 d^{-1} per il secondo (Figura 3.17 a e b).

Alla luce di prove sperimentali condotte in precedenza, erano attese delle velocità di crescita inferiori rispetto a quelle ricavate per il caso a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Inizialmente si è pensato alla preparazione di un terreno BG11 più ricco di substrati; l'analisi dei nutrienti sul mezzo di coltura avanzato ha tuttavia smentito tale ipotesi.

L'alternativa che si avanza è che lo spessore maggiore del fotobioreattore realizzato durante l'attività di tirocinio rispetto a quello dei flat-panels usati negli studi precedenti abbia attenuato i fenomeni di fotoinibizione. Ulteriori studi sono tutt'ora in corso per confermare questa ipotesi.

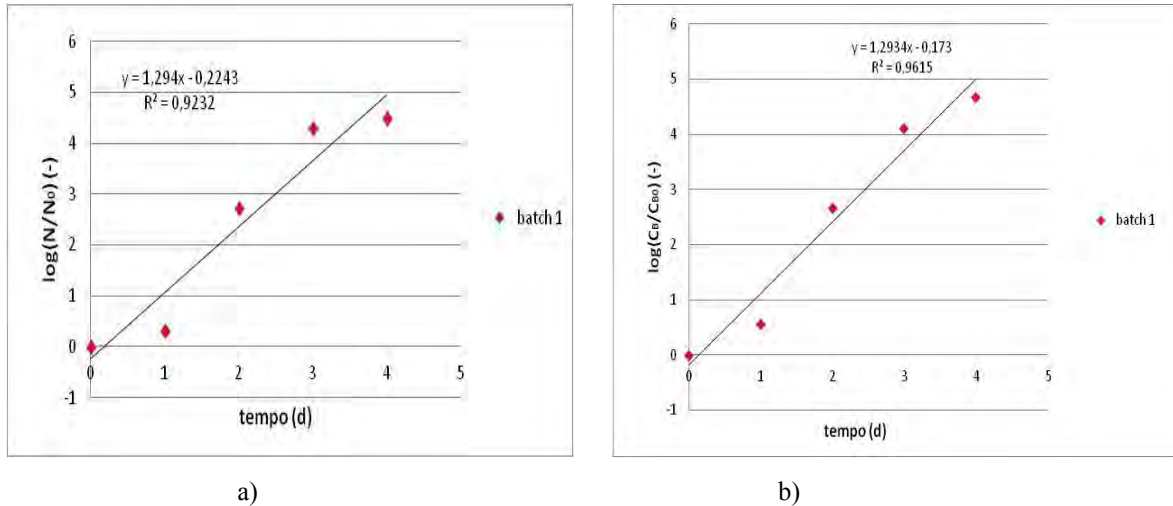


Figura 3.16. Profili logaritmici della concentrazione di cellule (N) normalizzata rispetto a quella iniziale (N_0) (a) e del peso fresco (C_B) normalizzato rispetto a quello iniziale (C_{B0}) (b), per il primo esperimento batch a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per il calcolo delle velocità specifiche di crescita sul numero di cellule e sul peso k_N e k_B .

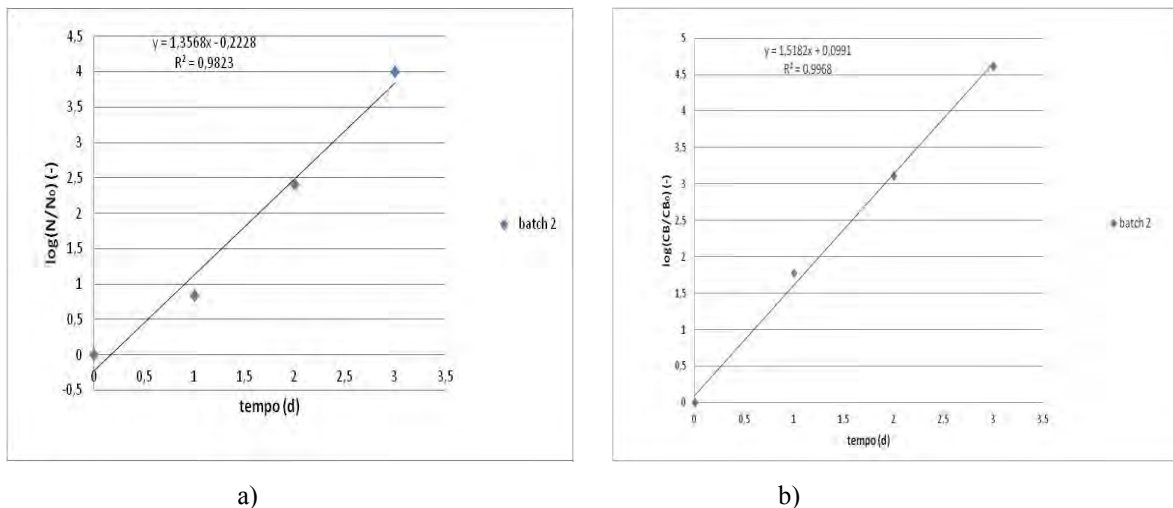


Figura 3.17. Profili logaritmici della concentrazione di cellule (N) normalizzata rispetto a quella iniziale (N_0) (a) e del peso fresco (C_B) normalizzato rispetto a quello iniziale (C_{B0}) (b), per il secondo esperimento batch a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per il calcolo delle velocità specifiche di crescita sul numero di cellule e sul peso k_N e k_B .

Le Figure 3.18, 3.19, 3.20 e 3.21 riassumono le distribuzioni di massa in termini di concentrazione $W(z,t)$ e frequenza $f(z,t)$, rispettivamente per i 2 casi condotti a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Come prima, $W(z,t)$ viene riscalata rispetto al punto di massimo della distribuzione iniziale di ogni esperimento.

Rispetto alle funzioni di distribuzione a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, l'intervallo di massa considerato è più ampio: da analisi effettuate con il cellometro si è misurato infatti che le cellule assumono delle dimensioni massime significativamente più alte.

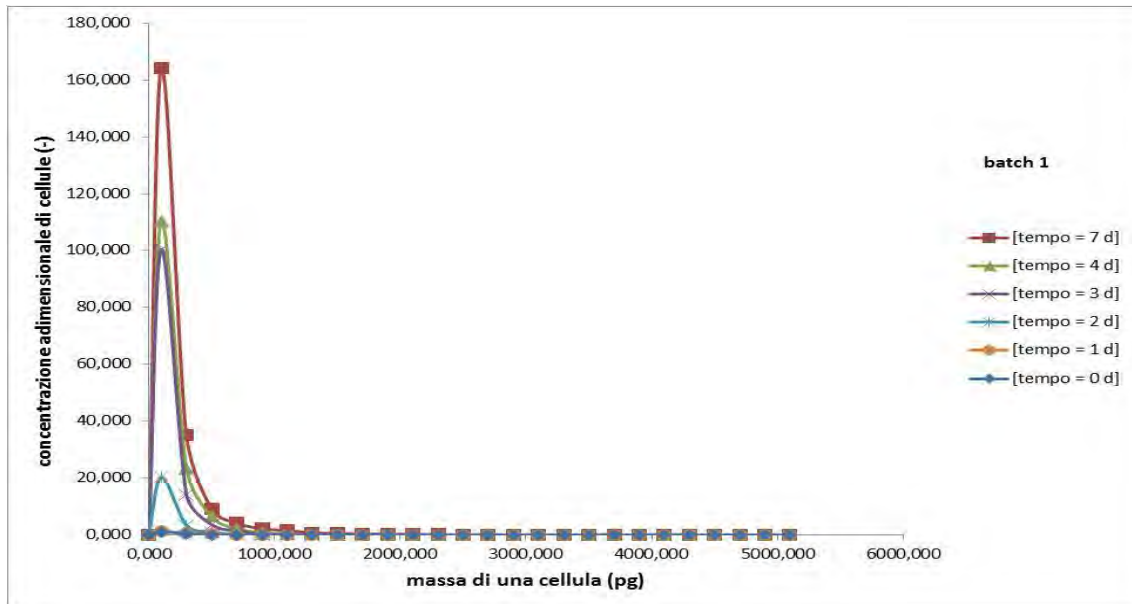


Figura 3.18. Distribuzioni adimensionali di massa per ogni giorno seguito del primo esperimento batch a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; la concentrazione è normalizzata rispetto al valore di picco della distribuzione dell'inoculo.

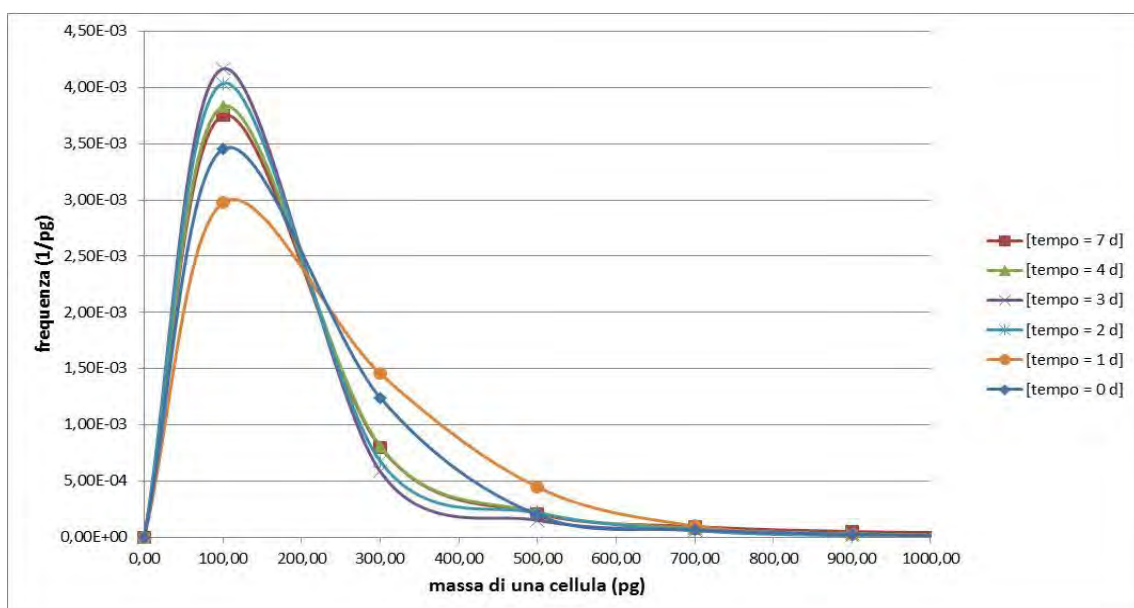


Figura 3.19. Distribuzioni di massa in termini di frequenza per ogni giorno seguito del primo esperimento batch a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intervallo di massa ridotto a 1000 pg).

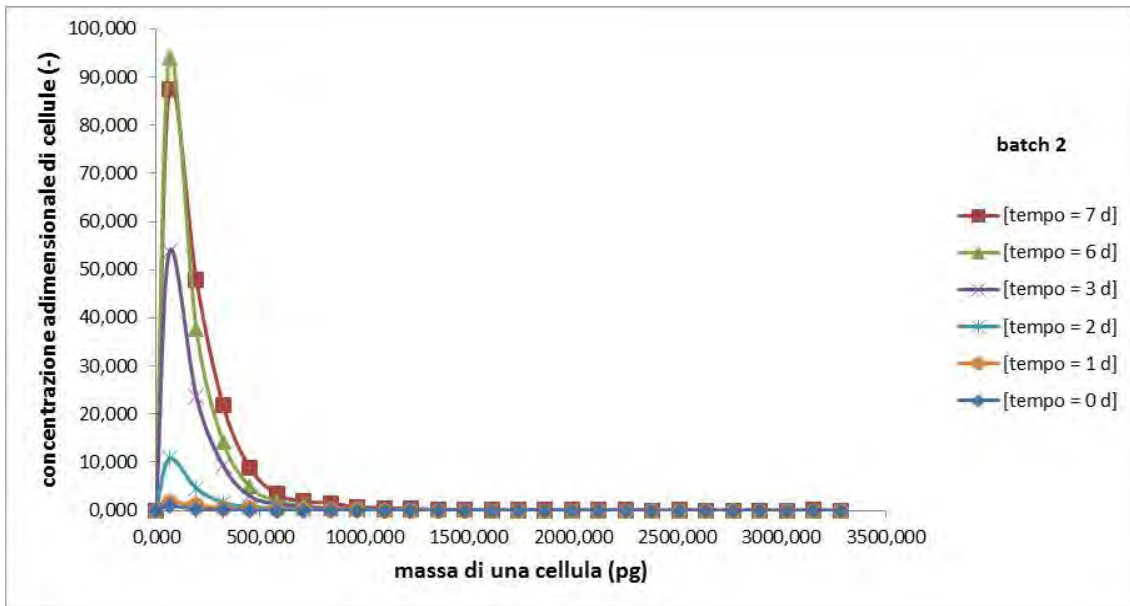


Figura 3.20. Distribuzioni adimensionali di massa per ogni giorno seguito del secondo esperimento batch a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; la concentrazione è normalizzata rispetto al valore di picco della distribuzione dell'inoculo.

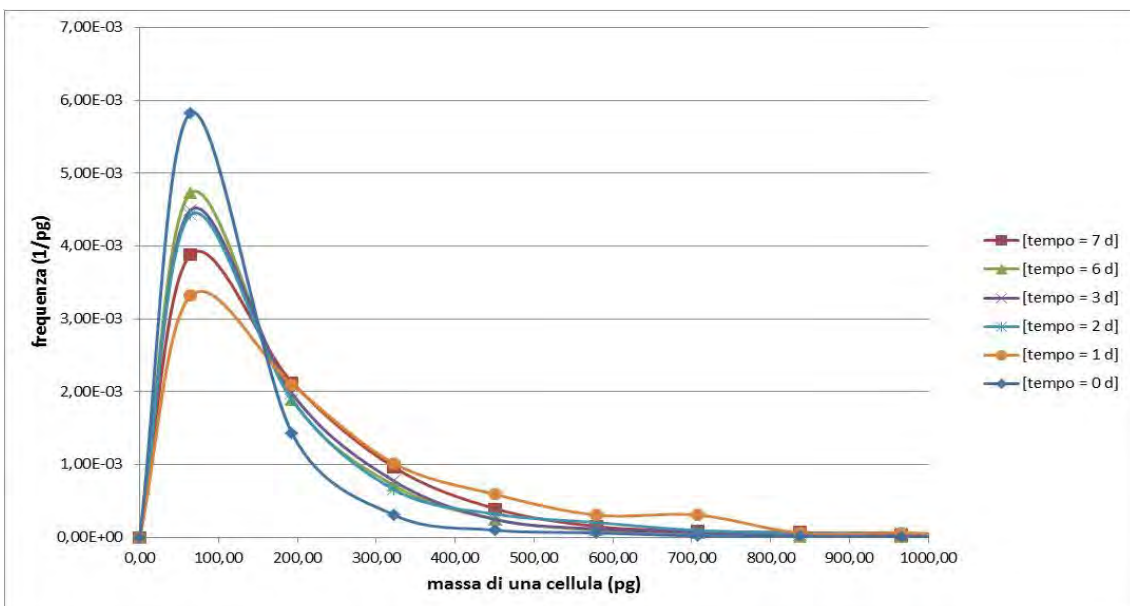


Figura 3.21. Distribuzioni di massa in termini di frequenza per ogni giorno seguito del secondo esperimento batch a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intervallo di massa ridotto a 1000 pg).

La Figura 3.22 a) e b) mostra infine l'evoluzione temporale dei valori di massa media secca e fresca delle cellule. Si nota, tra il primo e il secondo giorno, un cambiamento piuttosto significativo delle dimensioni. Ciò risulta in particolar modo evidente nel secondo esperimento e potrebbe essere spiegato con il fatto che le cellule presentano all'inizio della

curva di crescita una fase di adattamento durante la quale consumano i nutrienti senza innescare processi di divisione.

La variazione di taglia tra l'inizio e la fine del primo esperimento può comunque essere trascurata (almeno in termini di peso fresco per cellula); i valori delle costanti di crescita di conta e concentrazione ponderale, che si sono registrati, risultano infatti uguali.

Nel secondo esperimento, dopo la prima variazione positiva delle dimensioni, discussa precedentemente, si osserva un profilo decrescente fino al giorno 4°/5° e poi crescente fino all'ultimo giorno della fase stazionaria della curva di crescita; se si prendono in considerazione solo i valori iniziali e finali di massa secca/fresca si riscontra che le dimensioni medie sono comunque incrementate.

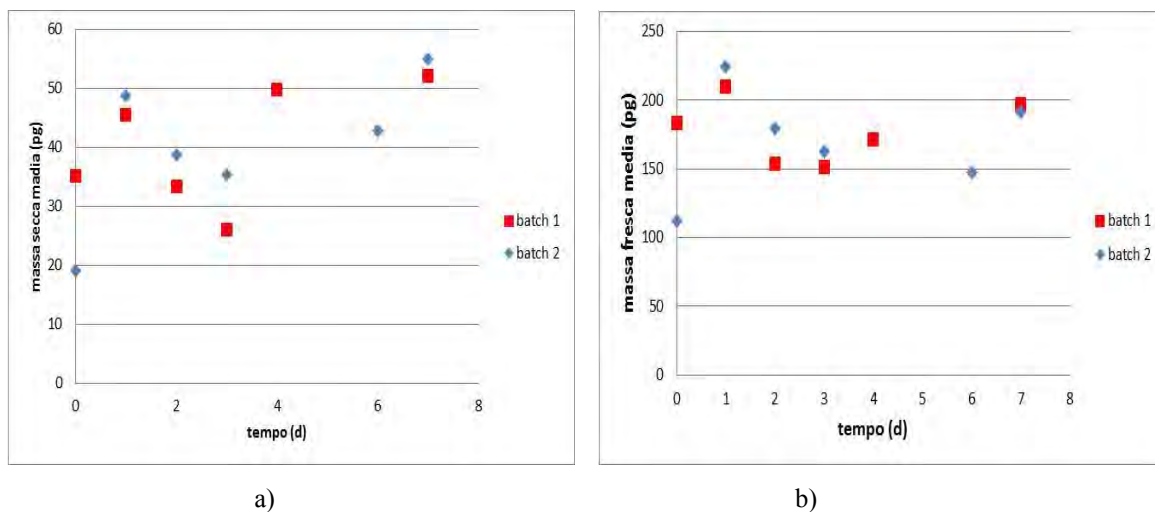


Figura 3.22. Profili di massa media secca (a) e fresca (b) ottenuti in condizioni batch a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Da un confronto tra i profili di massa media ottenuti in condizioni batch a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e quelli a $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, si può infine riscontrare che la luce influenza non solo la crescita algale in termini di concentrazione ma anche in termini di dimensioni medie delle cellule.

Questo risultato è coerente con l'osservazione delle cellule al microscopio ottico.

3.2.3 Dati raccolti per l'esperimento continuo a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Le Figure 3.23, 3.24 e 3.25 mostrano i dati di crescita microalgale in termini di numero e di peso (secco e fresco), raccolti durante l'esperimento in continuo, a partire dal primo giorno in cui si registra il raggiungimento di una condizione stazionaria.

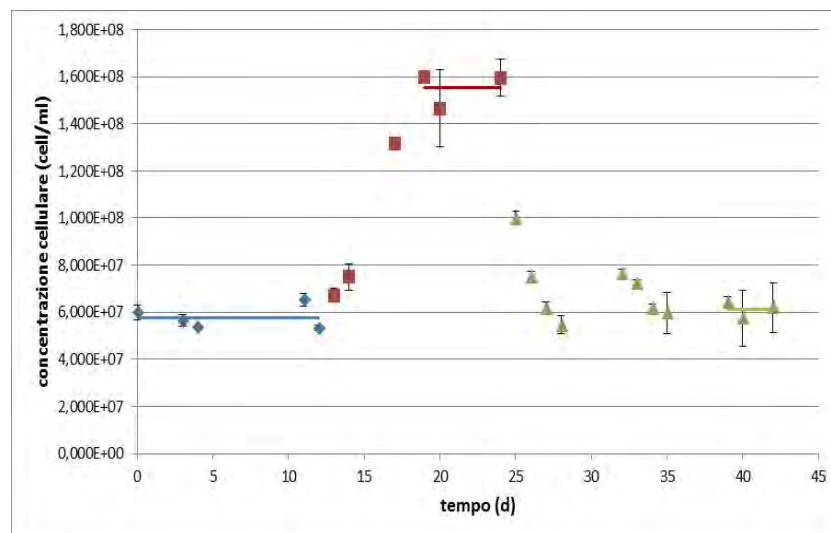


Figura 3.23. Profilo di concentrazione di cellule in cell/ml ottenuto in condizioni continue a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. I punti sperimentali raccolti ai tempi di residenza 1.04, 3.1 e 0.9 d sono indicati rispettivamente con il colore blu, rosso e verde rispettivamente .

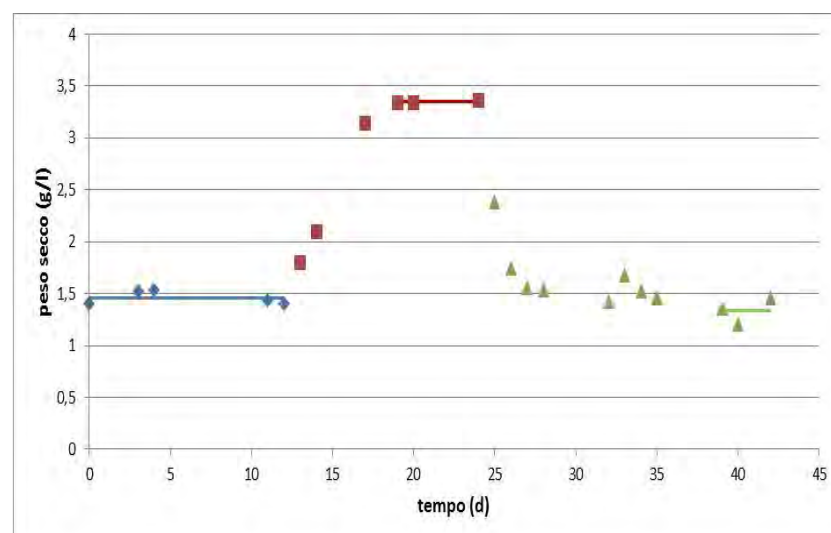


Figura 3.24. Profilo di concentrazione di biomassa secca in g/l ottenuto in condizioni continue a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. I punti sperimentali raccolti ai tempi di residenza 1.04, 3.1 e 0.9 d sono indicati rispettivamente con il colore blu, rosso e verde rispettivamente .

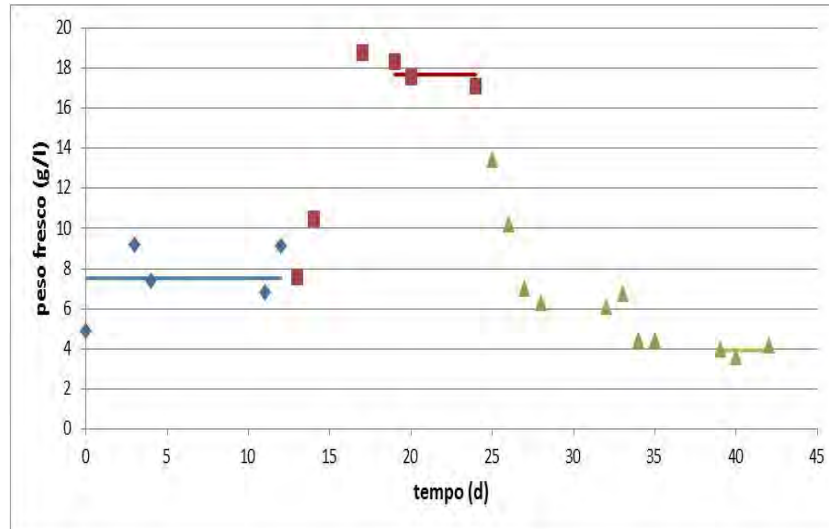


Figura 3.25. Profilo di concentrazione di biomassa fresca in g/l ottenuto in condizioni continue a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. I punti sperimentali raccolti ai tempi di residenza 1.04, 3.1 e 0.9 d sono indicati rispettivamente con il colore blu, rosso e verde rispettivamente .

Il primo tempo di residenza studiato (τ) è 1.04 d; il pannello è stato mantenuto in tali condizioni per 12 giorni. Al termine di questo periodo, il tempo di permanenza è stato impostato a 3.1 d per riuscire ad osservare più chiaramente se si presenta una variazione nelle dimensioni medie delle cellule di *Scenedesmus obliquus*.

L'incremento del tempo di residenza ha determinato un profilo crescente della concentrazione cellulare e del peso secco/fresco durante le condizioni transitorie del processo. Il grafico riportato in Figura 3.26 permette inoltre di notare che il cambiamento di τ da 1.04 a 3.1 d non ha inciso in modo significativo sulla taglia media delle cellule; non si registra infatti una variazione monotona ed evidente del peso medio per cellula. Questa considerazione si riferisce solo ai dati di massa media fresca; i valori di massa media secca non vengono presentati nel lavoro di tesi in quanto sono risultati molto dispersi durante tutto il periodo della prova sperimentale e non permettono, di conseguenza, di fare alcuna osservazione.

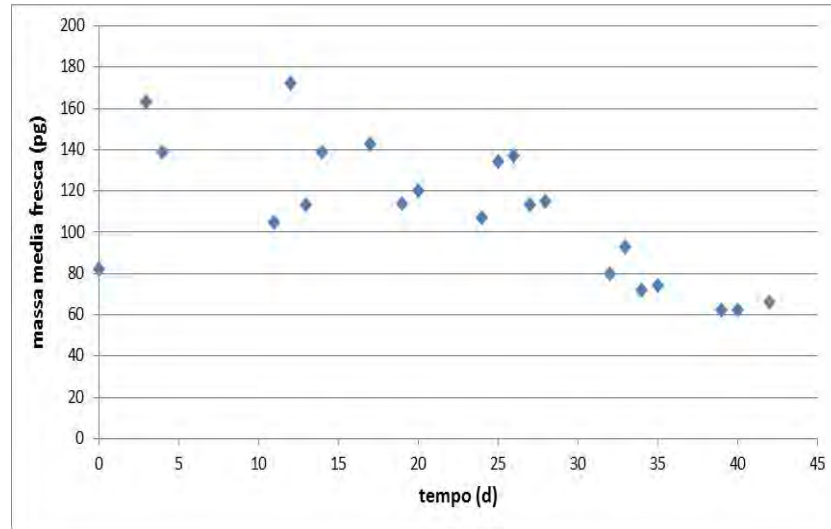


Figura 3.26. Profilo di massa media fresca ottenuto in condizioni continue a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Dopo 5 giorni di stato stazionario, è stato impostato nuovamente un tempo di permanenza molto basso, di 0.9 d, per la raccolta di dati sperimentali in corrispondenza di una zona di produttività non ancora studiata a intensità di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

I profili di concentrazione cellulare e di peso secco/fresco decrescono; in Figura 3.26 si osserva inoltre una riduzione significativa delle dimensioni medie di una cellula: le cellule sono infatti costrette a crescere in tempi molto inferiori, dividendo di conseguenza con una frequenza maggiore.

Nelle figure da 3.27 a 3.32 vengono rappresentate le distribuzioni di massa in termini di concentrazione e frequenza relative ai giorni di stazionarietà, rispettivamente per i tre tempi di residenza considerati.

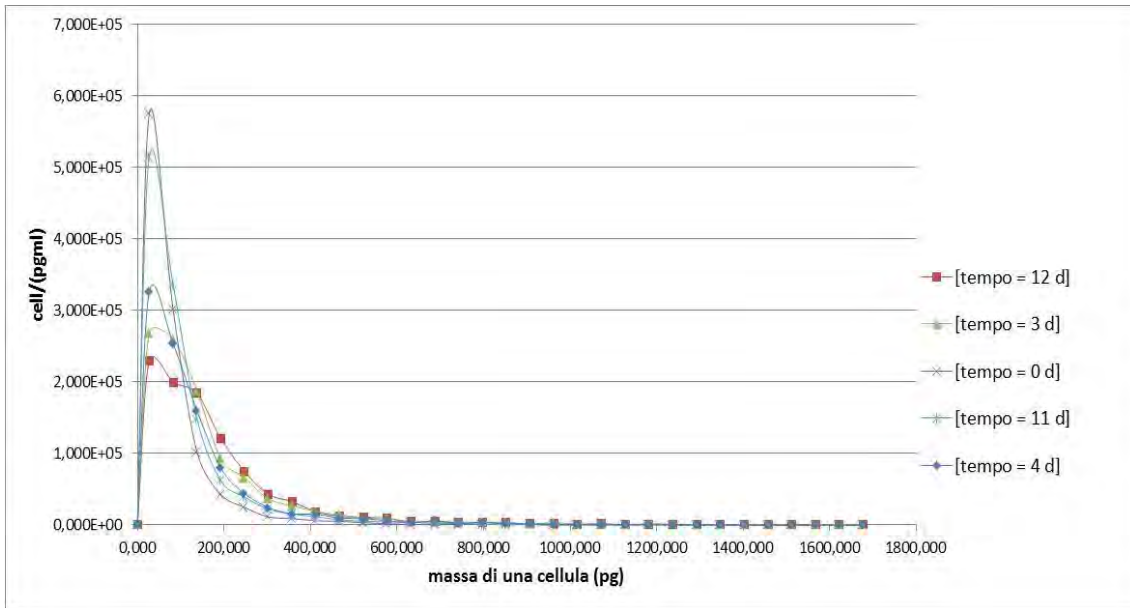


Figura 3.27. Distribuzioni di massa a stato stazionario a tempo di residenza di 1.04 d e a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

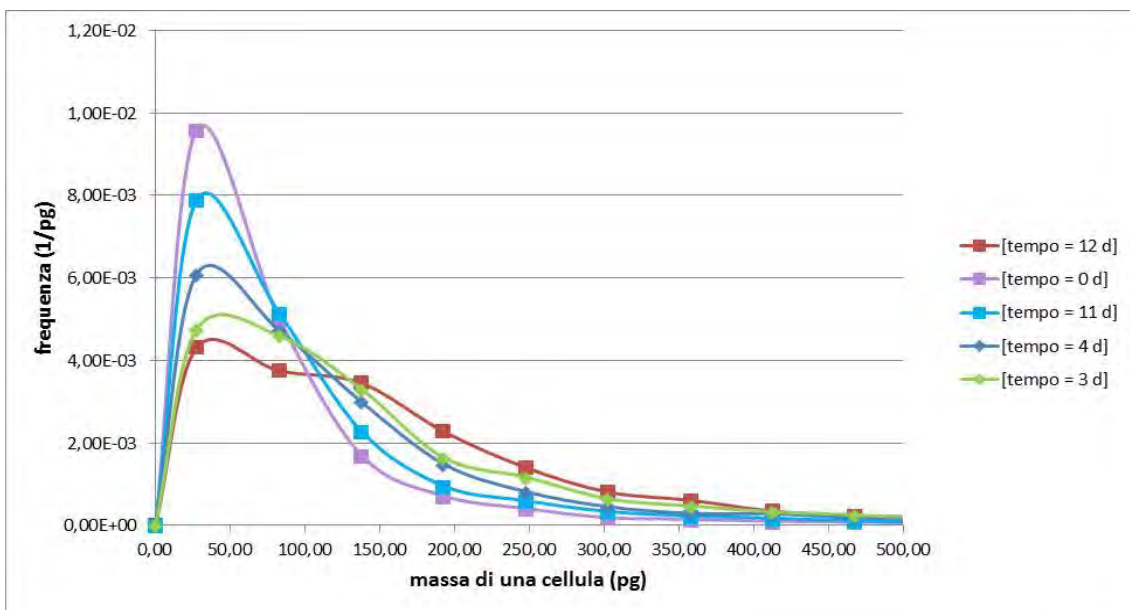


Figura 3.28. Distribuzioni di massa in termini di frequenza a stato stazionario a tempo di residenza di 1.04 d e a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intervallo di massa ridotto a 500 pg).

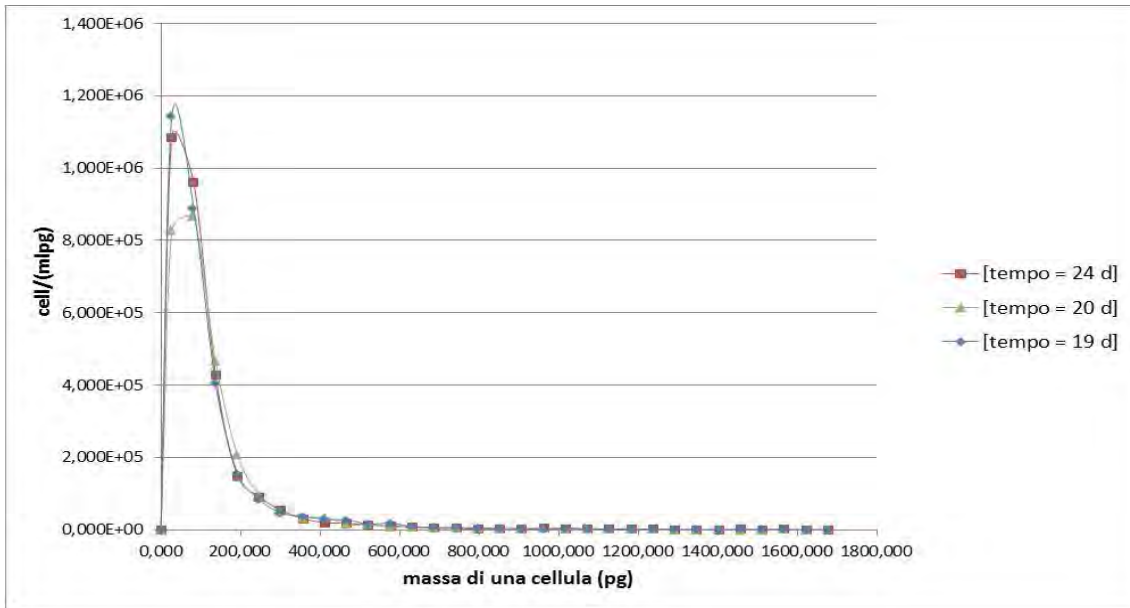


Figura 3.29. Distribuzioni di massa a stato stazionario a tempo di residenza di 3.1 d e a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

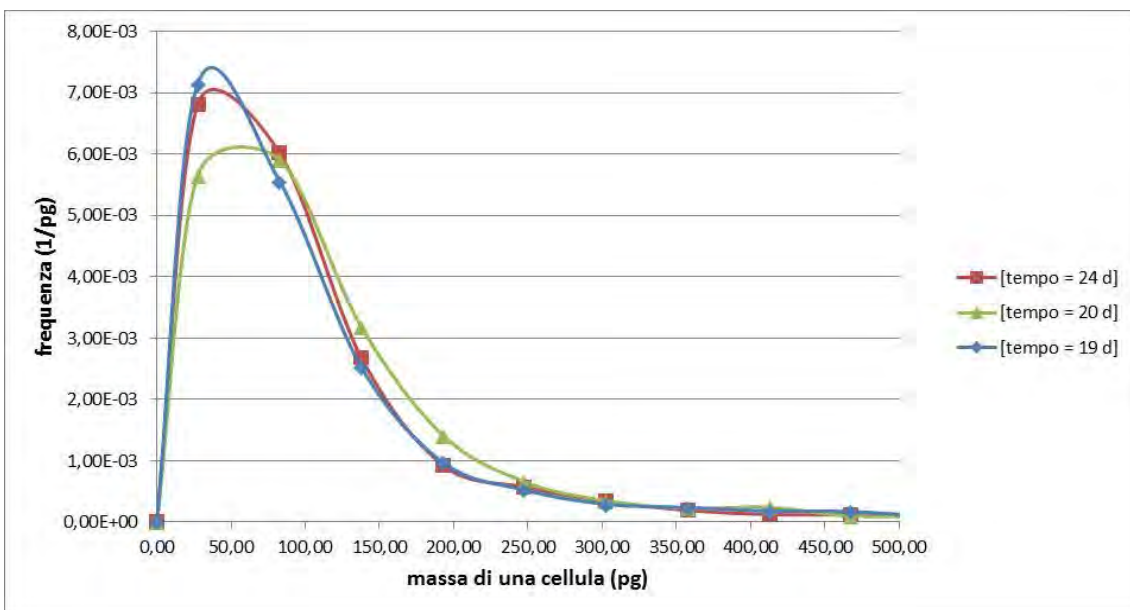


Figura 3.30. Distribuzioni di massa in termini di frequenza a stato stazionario a tempo di residenza di 3.1 d e a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intervallo di massa ridotto a 500 pg).

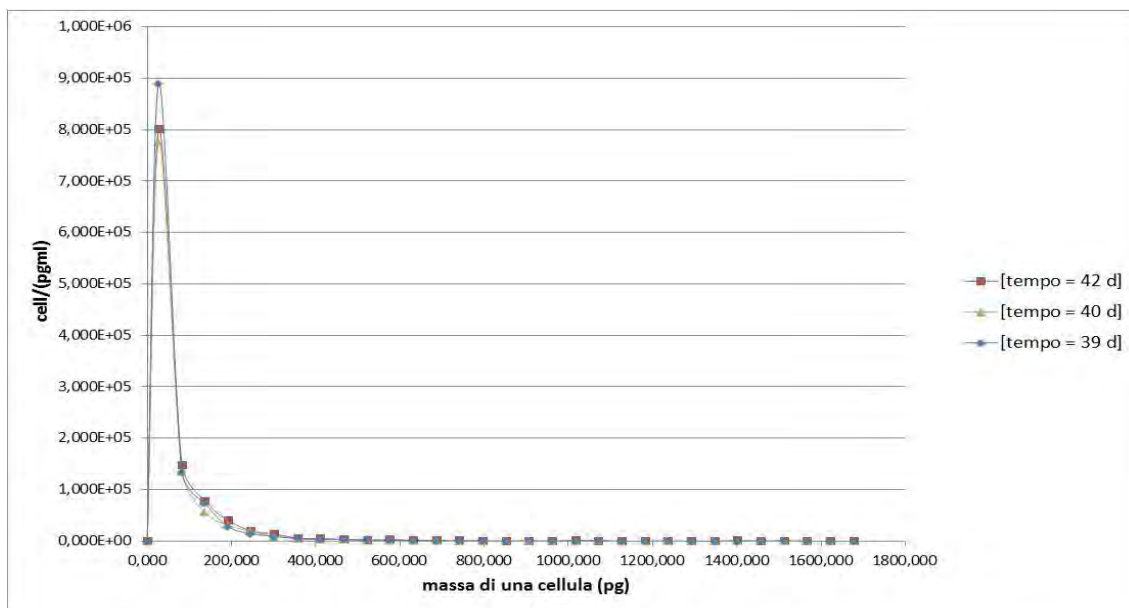


Figura 3.31. Distribuzioni di massa a stato stazionario a tempo di residenza di 0.9 d e a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

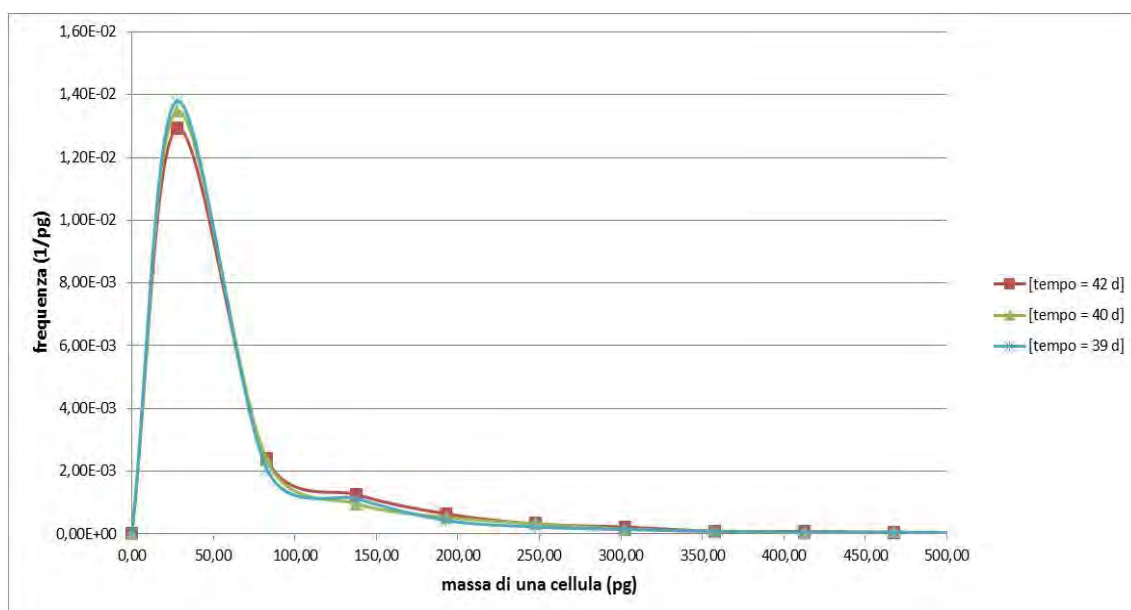


Figura 3.32. Distribuzioni di massa in termini di frequenza a stato stazionario a tempo di residenza di 0.9 d e a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intervallo di massa ridotto a 500 pg).

A $\tau = 3.1$ e $\tau = 0.9$ d sono state ottenute delle funzioni di distribuzione molto simili tra loro sia in termini di concentrazione che di frequenza, mentre a $\tau = 1.04$ d si può notare una chiara variazione tra le curve: i dati di massa media fresca differiscono sensibilmente nei giorni che sono stati considerati stazionari e questo si riflette poi anche nel calcolo del peso fresco come risulta visibile dal profilo di C_B in Figura 3.25. Questa dispersione maggiore dei valori

sperimentali è dovuta probabilmente all'errore nella misura di concentrazione e taglia delle cellule con il cellometro e/o al fatto che si parte da una condizione in cui il pannello opera in modalità batch.

3.2.3.1 Profili di produttività

Le Figure 3.33, 3.34 e 3.35 mostrano i profili di concentrazione di biomassa a stato stazionario in termini di numero e peso secco/fresco al variare del tempo di residenza.

Per contestualizzare i risultati ottenuti e formulare delle considerazioni di carattere più generale, in questo lavoro sono stati integrati i dati sperimentali a tempi di permanenza di 1.43, 4.02 e 5.34 d raccolti in un lavoro precedente (Urbani, 2014).

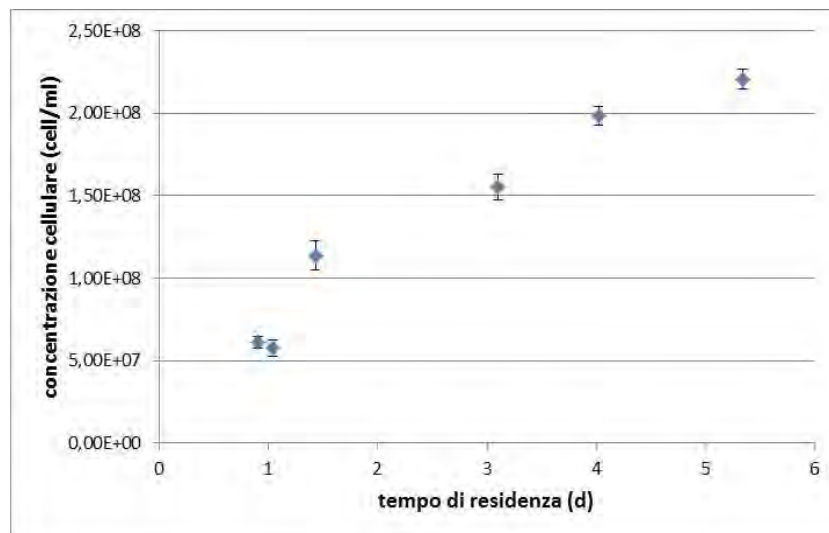


Figura 3.33. Profilo stazionario di concentrazione di cellule in cell/ml in funzione del tempo di residenza, a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

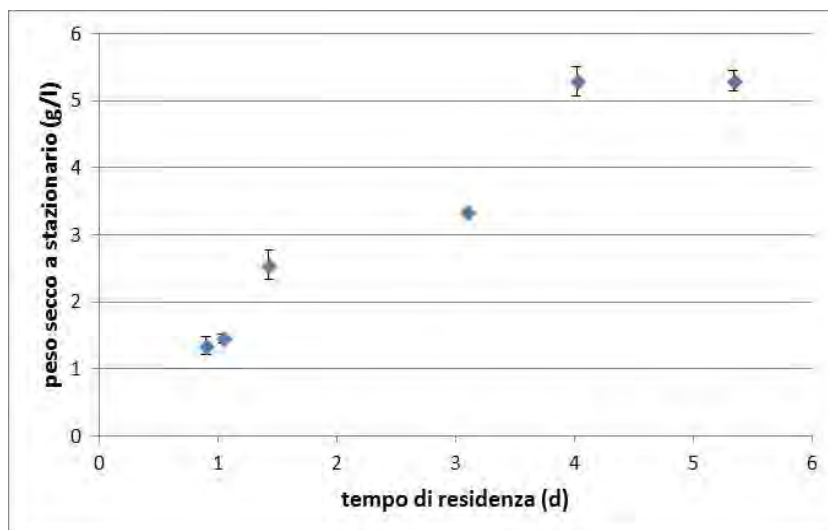


Figura 3.34. Profilo stazionario di peso secco in g/l in funzione del tempo di residenza, a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

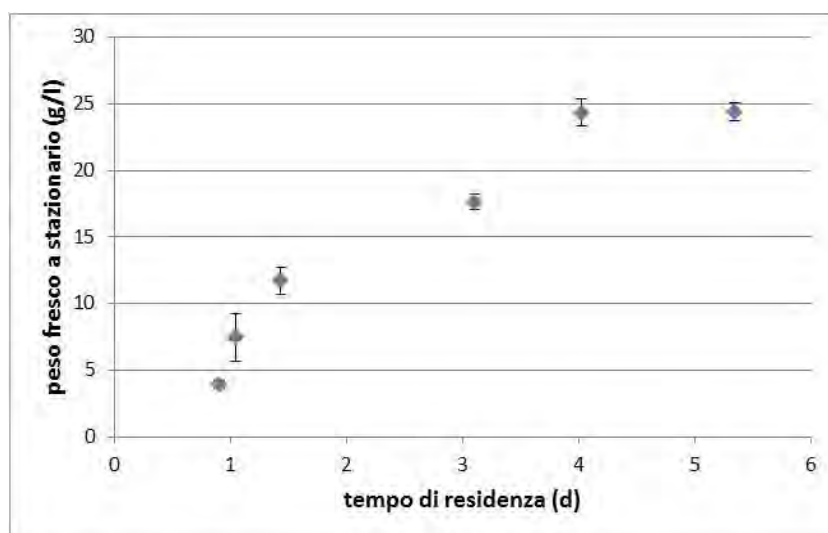


Figura 3.35. Profilo stazionario di peso fresco in g/l in funzione del tempo di residenza, a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

All'aumentare del tempo di permanenza si può osservare un incremento della concentrazione di biomassa microalgale sia in termini di numero che di peso fino al raggiungimento di un valore asintotico, come risultato dell'effetto del *self-shading* (fenomeno descritto nel capitolo 1).

Se si considerano i profili di produttività r_N , r_{BS} e r_B rappresentati nelle Figure 3.36, 3.37 e 3.38 (a stato stazionario le velocità di crescita equivalgono rispettivamente ai rapporti N/τ , C_{BS}/τ e C_B/τ e nei grafici 3.33, 3.34 e 3.35 corrispondono alle pendenze delle curve), si può osservare la presenza di un valore massimo, molto probabilmente in corrispondenza tra $\tau =$

1.04 d e $\tau = 1.43$ d. Nella zona a destra del dato di massima produttività, l'andamento è decrescente a causa del *self-shading* che diventa sempre più dominante. Nella zona a sinistra dei grafici si registrano invece delle velocità di crescita inferiori in quanto l'irradianza incidente non viene più utilizzata completamente dalle microalghe per il processo di fotosintesi ma viene dissipata per trasmissione attraverso la lastra del pannello non esposta alla sorgente di luce; in questa zona i tempi di permanenza sono vicini a quello di 'washout', ovvero al tempo di residenza in corrispondenza del quale si ottiene una concentrazione di biomassa nulla.

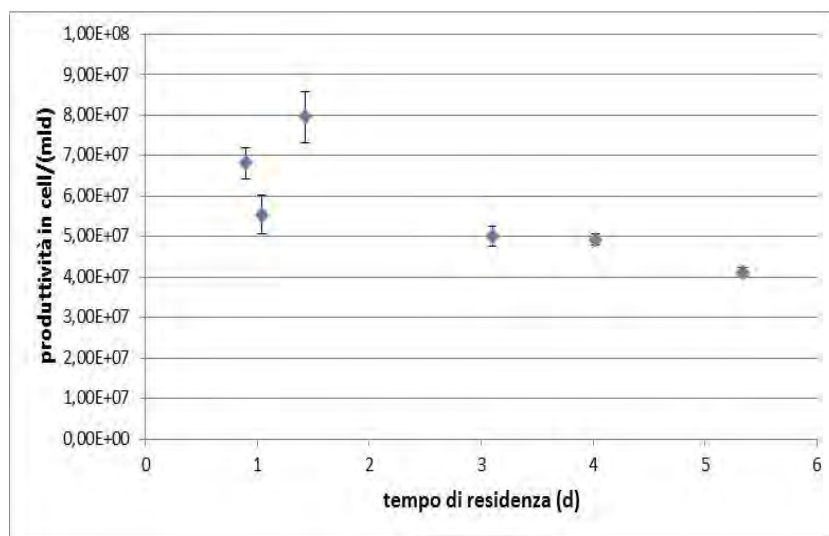


Figura 3.36. Profilo di produttività in termini di numero di cellule al variare del tempo di residenza, a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

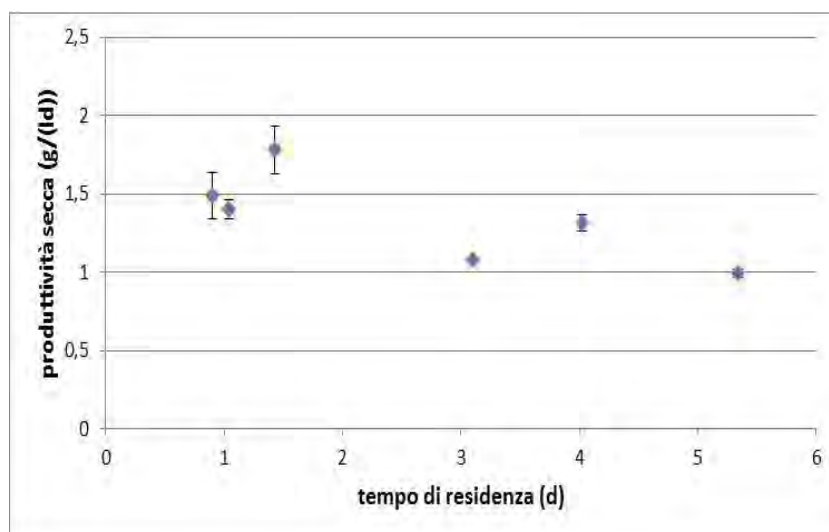


Figura 3.37. Profilo di produttività in termini di peso secco al variare del tempo di residenza, a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

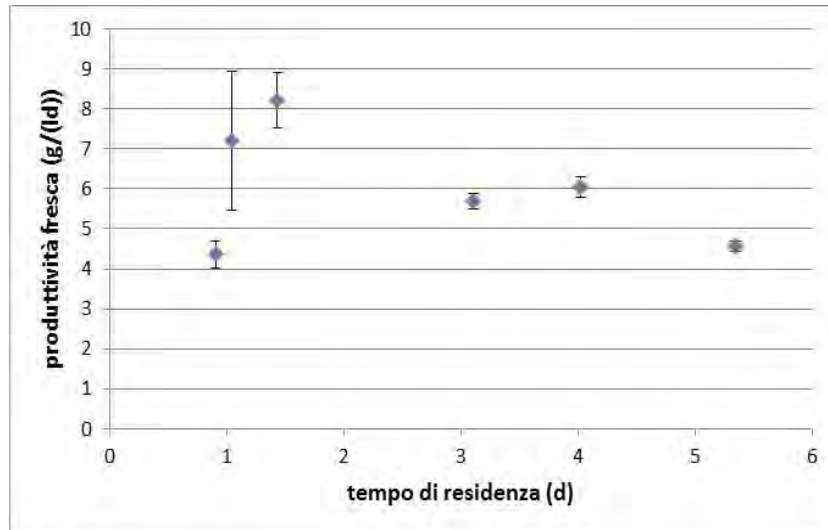


Figura 3.38. Profilo di produttività in termini di peso fresco al variare del tempo di residenza, a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

In Figura 3.38 si nota, come già chiarito in precedenza, la significativa variabilità del dato sperimentale a $\tau = 1.04$ d.

Capitolo 4

Modellazione matematica della cinetica di crescita di una cellula

In questo capitolo viene presentato il modello matematico per rappresentare la cinetica di crescita di una singola cellula, da inserirsi nell'equazione di bilancio di popolazione.

4.1 Cinetica di crescita di una singola cellula

Il modello sviluppato per descrivere la cinetica di crescita di una singola cellula è stato ottenuto rielaborando le leggi di crescita che sono state trovate in letteratura e che vengono presentate brevemente nel capitolo 2.

Come riportato in letteratura (Hjortso, 2005), la cinetica di crescita di una singola cellula può essere rappresentata con una dipendenza lineare rispetto alla massa z :

$$r(z) = k \cdot z - k_p \cdot z \quad (4.1)$$

Nell'espressione (4.1) compaiono 2 termini: il primo contributo descrive l'incremento della massa di una cellula grazie all'apporto dei nutrienti e della luce mentre il secondo contributo è una costante di mantenimento che, nel caso di un sistema algale, tiene conto del fatto che una parte dell'energia luminosa fornita al reattore viene utilizzata dalle cellule per le funzioni fisiologiche.

La velocità specifica k viene descritta secondo una relazione matematica come quella di Monod; tra i fattori principali che influenzano la crescita microalgale vi sono l'azoto e il fosforo utilizzati come substrati, e la luce sfruttata come fonte di energia per l'attivazione del processo di fotosintesi.

Nell'espressione di Monod si tiene conto pertanto dei suddetti tre elementi nel seguente modo:

$$k = k_{\max} \cdot \frac{I}{k_{mi} + I} \cdot \frac{C_f}{k_{mf} + C_f} \cdot \frac{C_a}{k_{ma} + C_a} \quad (4.2)$$

dove:

- k_{\max} è la costante di crescita massima della cellula nelle condizioni di coltura;
- k_{mi} , k_{mf} e k_{ma} indicano le costanti di saturazione rispettivamente per la luce, il fosforo e l'azoto;
- I , C_f e C_a rappresentano l'irradianza e le concentrazioni ponderali dei nutrienti.

Nella prova sperimentale svolta in condizioni continue il terreno viene volutamente preparato con i nutrienti in eccesso in modo tale che la crescita delle microalghe sia legata unicamente alla disponibilità e penetrabilità della luce all'interno del fotobioreattore.

In questo caso l'espressione (4.2) si riduce a:

$$k = \frac{k_{\max} \cdot I}{k_{mi} + I} \quad (4.3)$$

Per gli esperimenti condotti in modalità batch la limitazione dovuta a C_f e a C_a viene invece tenuta in conto e il bilancio di popolazione viene accoppiato con i due bilanci ponderali dei nutrienti, formulati con un termine di accumulo e uno di consumo (Hjortso, 2005):

$$\frac{dC_s(t)}{dt} = - \int_0^{z_{\max}} \frac{r(z) \cdot W(z,t)}{y_s} dz \quad (4.4)$$

dove il pedice s si riferisce rispettivamente al fosforo e all'azoto e y_s indica la resa del relativo nutriente.

Secondo l'equazione (4.4), la velocità di esaurimento dei nutrienti è quindi legata alla velocità di crescita di una singola cellula (nell'equazione (4.4) viene in realtà inserita un'espressione mediata di velocità $r_{mean}(z)$ definita nel seguito), alla funzione di distribuzione in termini di concentrazione $W(z,t)$ e al termine y_s calcolato come il rapporto tra la concentrazione di biomassa fresca prodotta e la concentrazione del substrato i -esimo consumato. Non essendo stata condotta alcuna analisi sui nutrienti, nel calcolo delle rese si considerano solo le concentrazioni iniziali dei substrati mentre quelle finali sono poste pari a zero; i valori di resa così ottenuti vengono poi leggermente corretti in modo tale che le simulazioni restituiscano

dei valori finali di conta e peso fresco simili ai dati sperimentali raccolti durante la fase stazionaria di crescita in condizioni batch. I termini di resa tendono infatti ad influenzare principalmente questo stadio.

Rispetto alle concentrazioni C_a e C_f , l'intensità I non viene assunta come funzione della sola coordinata temporale: le cellule infatti assorbono e deviano la luce determinando un suo profilo di distribuzione non omogeneo all'interno del sistema di coltura. Per il calcolo dell'irradianza si adotta quindi il modello a 2 flussi di Cornet, generalizzato da Pruvost (Pruvost *et al.*, 2010) dove viene assunta un'attenuazione della luce monodimensionale, lungo lo spessore del reattore (h)

La velocità di reazione è pertanto una funzione puntuale che dipende da z , t e h :

$$r(z, t, h) = k_{\max} \cdot \frac{I(t, h)}{k_{mi} + I(t, h)} \cdot \frac{C_f(t)}{k_{mf} + C_f(t)} \cdot \frac{C_a(t)}{k_{ma} + C_a(t)} \cdot z - k_p \cdot z \quad (4.5)$$

Nell'equazione di bilancio di popolazione si utilizza ed inserisce l'espressione mediata lungo lo spessore del fotobioreattore:

$$r_{mean}(z, t) = (k_{\max} \cdot \frac{C_f(t)}{k_{mf} + C_f(t)} \cdot \frac{C_a(t)}{k_{ma} + C_a(t)} \cdot \frac{1}{H} \int_0^H \frac{I(t, h)}{k_{mi} + I(t, h)} dh) \cdot z - k_p \cdot z \quad (4.6)$$

dove H è lo spessore del fotobioreattore. La funzione può essere riscritta in forma abbreviata nel seguente modo:

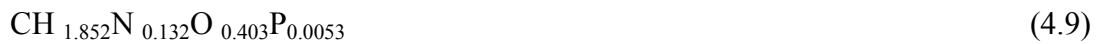
$$r_{mean}(z, t) = (k_{mean}(t) - k_p) \cdot z \quad (4.7)$$

La costante di crescita k_{max} , che compare in (4.2), viene descritta (Pruvost *et al.*, 2010) come:

$$k_{\max} = \rho_m \cdot k_{mi} \cdot \phi \cdot E_a \quad (4.8)$$

dove:

- ρ_m è la massima resa energetica sulla dissipazione di fotoni nell'antenna. Il termine viene considerato come un valore indipendente dalla specie algale (Pruvost *et al.*, 2010);
- Φ è la media spaziale della resa quantica per lo schema Z della fotosintesi e descrive la quantità di biomassa secca prodotta per mole di fotoni catturati dalle cellule (Beraldi, 2013). Il termine viene calcolato a partire dalla composizione elementare di *Scenedesmus obliquus*, che tende a rimanere pressochè invariata con le condizioni operative. In base alle frazioni molari riportate in Tabella 4.1, la stechiometria generale della microalga in esame può essere scritta come:



La massa della biomassa secca (x_{alga}) per una mole di C (n_C) è dunque 22.15 g/mol C. Si considera poi come reazione rappresentativa del processo di fotosintesi quella di formazione della formaldeide (che corrisponde al carboidrato più semplice) e O_2 a partire da H_2O e CO_2 , in cui il *quantum requirement*, ovvero il numero di moli di fotoni (n_{fot}) richiesto per sintetizzare una mole di carboidrato, equivale a 8 (Beraldi, 2013). La resa energetica Φ viene quindi ottenuta come:

$$\phi = \frac{x_{alga} \cdot n_C}{n_{fot}} \quad (4.10)$$

Il risultato dell'equazione è $2.77 \cdot 10^9$ kg/ μmol ;

- E_a è il coefficiente di assorbimento (Pruvost *et al.*, 2010). Il suo significato viene chiarito nel seguito dopo l'introduzione di alcune proprietà ottiche della coltura.

Tabella 4.1. Composizione elementare di *Scenedesmus obliquus*.

Elemento chimico	Frazione ponderale (%)	Frazione molare (%)	Frazione molare normalizzata su quella di C
C	52.1	4.34	1
H	8.04	8.04	1.852
N	8.05	0.575	0.132
O	28	1.75	0.403
P	0.35	0.023	$5.3 \cdot 10^{-3}$

Il profilo di estinzione della luce diretta I lungo lo spessore h del fotobioreattore viene poi calcolato attraverso le seguenti equazioni (Pruvost *et al.*, 2010):

$$\frac{I(t, h)}{I(t, 0)} = \frac{2 \cdot (1 + \alpha) \cdot \exp[-\delta \cdot (h - H)] - (1 - \alpha) \cdot \exp[\delta \cdot (h - H)]}{\cos \vartheta \cdot (1 + \alpha)^2 \cdot \exp(\delta \cdot h) - (1 - \alpha)^2 \cdot \exp(-\delta \cdot h)} \quad (4.11)$$

$$\alpha = \sqrt{\frac{E_a}{E_a + 2 \cdot b \cdot E_s}} \quad (4.12)$$

$$\delta(t) = \frac{\alpha \cdot C_{BS}(t) \cdot (E_a + 2 \cdot b \cdot E_s)}{\cos \vartheta} \quad (4.13)$$

dove:

➤ $I(t, 0)$ è la radiazione fotosinteticamente attiva che incide in corrispondenza della lastra del pannello esposta alla sorgente di luce. In questo lavoro di tesi, l'irradianza in ingresso non è funzione della coordinata temporale in quanto sono state svolte solo prove sperimentali a intensità fisse. $I(t, 0)$ viene misurata secondo la procedura descritta nel capitolo 3 assumendo una riduzione dell'11% dovuta all'assorbimento da parte della lastra di policarbonato;

➤ $I(t, h)$ è la radiazione fotosinteticamente attiva alla distanza h dalla lastra del pannello esposta alla sorgente di luce;

➤ θ è l'angolo tra la direzione della radiazione incidente e quella normale alla superficie del reattore ed è, nel caso in esame, pari a zero;

➤ E_s e b sono rispettivamente il coefficiente di scattering e la frazione di *back scattering*.

E_a , E_s e b esprimono le proprietà ottiche del sistema microalgale.

Come in parte già anticipato all'inizio di questo paragrafo, una coltura di cellule può essere descritta come una sospensione di particelle in una fase acquosa dove la luce viene parzialmente assorbita e parzialmente deviata. Il primo fenomeno è dovuto al contenuto di pigmenti nelle microalghe (clorofilla e carotenoidi) mentre il secondo è causato dal fatto che le cellule non sono particelle puntuali ma hanno un volume proprio non trascurabile. Diventa di fondamentale importanza, quindi, la conoscenza delle proprietà ottiche (E_a , E_s e b) che caratterizzano la dispersione algale.

Un metodo predittivo, basato sulla teoria di Lorenz-Mie, può essere impiegato per la determinazione di tali coefficienti, purché siano noti (Pottier *et al.*, 2005):

- la tipologia e la quantità dei singoli pigmenti contenuti nella soluzione;
- la distribuzione delle dimensioni della microalga;
- la forma della microalga.

Secondo Pottier *et al.* (2005), E_a ed E_s possono essere calcolati in base alle seguenti equazioni:

$$E_a = \frac{C_{ABS}(\lambda)}{V_{mean} \cdot \rho_{dm} \cdot (1 - x_W)} \quad (4.14)$$

$$E_s = \frac{C_{SCA}(\lambda)}{V_{mean} \cdot \rho_{dm} \cdot (1 - x_W)} \quad (4.15)$$

dove:

- λ è la lunghezza d'onda della radiazione incidente;
- C_{ABS} e C_{SCA} rappresentano le sezioni di attraversamento di assorbimento e scattering;
- ρ_{dm} è la densità della biomassa secca;
- V_{mean} è il volume medio di una cellula;
- x_W è la frazione volumetrica di acqua all'interno di una cellula.

I parametri C_{ABS} e C_{SCA} possono essere quantificati dalla teoria di Lorenz-Mie, conoscendo l'indice di rifrazione delle cellule pseudo-sferiche (i_{rif}), il diametro equivalente e la

distribuzione di taglia. Per il calcolo di i_{rif} è necessario avere a disposizione dati sulla tipologia e contenuto di pigmenti e sul loro coefficiente di assorbimento. Purtroppo, in letteratura non è ancora disponibile una banca dati contenente le liste di pigmenti e le relative caratteristiche legate alle specie microalgali; per questo motivo, in questo lavoro di tesi, i parametri di assorbimento E_a e di scattering bE_s (si prende in considerazione il prodotto tra i 2 termini che si riferisce alla luce deviata solo nella direzione di quella incidente) vengono ipotizzati inizialmente pari a quelli riportati in lavori precedenti sulla stessa specie algale (ricavati non a partire dal modello predittivo di Pottier ma tramite un fitting dei dati sperimentali di *back irradiance* vs C_{BS}) e poi corretti in base ai dati sperimentali raccolti durante l'attività di tesi.

Se si inserisce l'equazione di crescita (4.7) in (2.34), che corrisponde al bilancio macroscopico sulla coltura in termini ponderali, si ottiene:

$$\frac{dC_B(t)}{dt} = (k_{mean}(t) - k_p) \cdot C_B(t) - D \cdot C_B(t) \quad (4.16)$$

che coincide con il bilancio per un fotobioreattore perfettamente mescolato riportato in Pruvost *et al.* (2010). Tuttavia, in questo lavoro di tesi, diversamente rispetto a Pruvost *et al.* (2010), si prende in considerazione come concentrazione massiva quella di biomassa fresca, e la dipendenza dalle concentrazioni dei substrati in $k_{mean}(t)$. Si può, inoltre, osservare che la costante di crescita di una cellula ($k_{mean}(t) - k_p$) equivale alla costante di crescita di biomassa in termini di peso k_B .

In questo lavoro di tesi, si è assunto, infine, che la velocità di crescita cellulare dipenda non solo linearmente dalla massa cellulare. Specificamente la legge di crescita adottata è composta da un termine lineare e da un ulteriore termine quadratico in z :

$$r_{mean}(z, t) = (k_{mean}(t) - k_p) \cdot \left(z - \frac{z^2}{z_{max}} \right). \quad (4.17)$$

In questo modo, quando la massa della cellula ha raggiunto il suo valore massimo (z_{max} corrisponde alla massa dell'ultima classe delle distribuzioni sperimentali di dimensione delle alghe riportate nel capitolo 3) la velocità di crescita si annulla: si assume infatti che una cellula non possa crescere all'infinito.

Per valori di z bassi ($z < \sim 200$ pg), la cinetica (4.17) può comunque essere approssimata con l'equazione (4.7), come si può osservare in Figura 4.1.

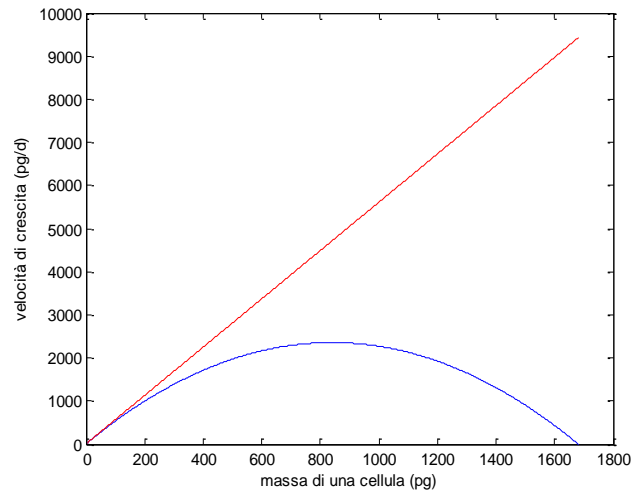


Figura 4.1. Confronto tra la legge di crescita $r_{mean}(z, t) = (k_{mean}(t) - k_p) \cdot z$ e

$$r_{mean}(z, t) = (k_{mean}(t) - k_p) \cdot \left(z - \frac{z^2}{z_{max}} \right) \quad (\text{parametri ipotizzati: } z_{max} = 1683 \text{ pg; } k_{mean} = 5.7 \text{ d}^{-1}, k_p = 0.1 \text{ d}^{-1}).$$

In base ai dati sperimentali riportati nel capitolo 3, la frazione di cellule con massa inferiore ai 200 pg è maggiore del 70%; l'introduzione del termine quadratico non influenza dunque significativamente la dinamica di crescita della maggior parte delle cellule nella coltura microalgale.

Capitolo 5

Metodi numerici

Il capitolo si suddivide in due sezioni: nella prima parte vengono presentati brevemente dei metodi numerici che possono essere utilizzati per la risoluzione di un'equazione di bilancio di popolazione e si descrive più dettagliatamente dell'approccio adottato nell'elaborato, cioè il metodo dei momenti FCMOM. Nella seconda parte vengono raccolte le equazioni matematiche implementate in un codice per risolvere il bilancio di popolazione di microalghe utilizzando il software Matlab[®] (la versione impiegata è la R2009b della MathWorks).

5.1 Metodi numerici per la risoluzione di bilanci di popolazione

Un bilancio di popolazione (PBE) richiede la risoluzione di un'equazione integro-differenziale alle derivate parziali, ovvero di un'equazione in cui la variabile dipendente compare all'interno di derivate parziali e di un integrale.

L'equazione di bilancio viene accoppiata tipicamente ad altre equazioni come a quelle di conservazione della massa, dell'energia e della quantità di moto usate per la rappresentazione della fase continua in cui il materiale particolato (di cui è formulato il bilancio di popolazione) si trova disperso.

Esistono diverse tecniche che permettono di risolvere numericamente bilanci di popolazione. Queste possono essere classificate in: metodo delle approssimazioni successive, metodo della trasformata di Laplace, metodo dei momenti MOM (Method Of Moments) e dei residui pesati MWR (Method Of Weighted Residuals), formulazioni discrete e infine metodi di Monte Carlo (Ramkrishna, 2000).

Alcuni di questi metodi si basano sulla discretizzazione delle equazioni di bilancio e forniscono soluzioni accurate ma ad un alto costo computazionale. Altri invece, quali il MOM, sono incentrati sulla formulazione in termini dei momenti di equazioni, derivate direttamente dall'equazione di bilancio di popolazione, e sulla successiva ricostruzione della funzione di distribuzione a partire dai momenti stessi (Ramkrishna, 2000).

Rispetto ai metodi discreti, i MOM e MWR garantiscono un tempo computazionale inferiore (Strumendo e Arastoopour, 2008).

Esistono tre principali categorie di MOM. Alla prima appartengono i metodi in cui si può assumere di conoscere a priori la forma della funzione di distribuzione. Questa ipotesi è in grado di assicurare, in alcuni casi, un basso costo computazionale e allo stesso tempo buoni risultati ma rende la risoluzione del bilancio di popolazione non generale in quanto si suppone una forma funzionale di distribuzione degli stati invariante durante la simulazione e quindi durante il processo fisico da rappresentare (Strumendo e Arastoopour, 2008).

Un'altra categoria del MOM è rappresentata dai metodi basati sulle quadrature, come il QMOM, dove invece non viene espressa nessuna assunzione riguardante la forma funzionale di distribuzione degli stati (Strumendo e Arastoopour, 2008). Rispetto alla prima categoria, il QMOM si presenta come un metodo generale ma prevede una soluzione in termini dei momenti e non di funzione di distribuzione $W(z,t)$, la cui ricostruzione, se possibile, può risultare molto complessa.

Al fine di ovviare ad alcuni svantaggi del metodo QMOM, un'ulteriore tipologia proposta è il metodo di quadratura diretta DQMOM (Strumendo e Arastoopour, 2008). In questo caso viene adottata a priori la forma funzionale di $W(z,t)$, ma tale forma non dipende dalla specifica applicazione considerata ed è espressa come sommatoria di delta di Dirac. Tuttavia tale metodologia non garantisce una soluzione accurata in termini della funzione di distribuzione degli stati.

In questa tesi, per la risoluzione del bilancio di popolazione della coltura microalgale, viene impiegata un'ulteriore variazione del metodo MOM (Strumendo e Arastoopour, 2008). Si tratta di una modifica chiamata '*Finite size domain Complete set of trial functions Method of Moments*' (FCMOM). Il metodo fornisce la soluzione sia in termini dei momenti sia in termini di funzione di distribuzione ricostruita a partire dai momenti stessi attraverso una relazione valida sia nelle condizioni stazionarie che in quelle transitorie del processo considerato; la funzione di distribuzione calcolata converge inoltre alla soluzione del bilancio di popolazione. Alle caratteristiche citate si aggiungono altre proprietà quali un'alta efficienza computazionale e l'adattabilità a codici CFD.

5.2 Descrizione del metodo FCMOM

Il metodo prevede di risolvere il bilancio di popolazione sotto forma di un sistema di equazioni differenziali dove le variabili incognite sono i momenti.

La funzione di distribuzione degli stati viene considerata come una funzione continua e viene ricostruita a partire dai momenti attraverso una sommatoria di termini basati sui polinomi di Legendre:

$$\bar{W}(\bar{z}, t) = \sum_{n=0}^{\infty} C_n(t) \cdot \phi_n(\bar{z}) \quad (5.1)$$

dove viene distinta la dipendenza di \bar{W} adimensionalizzata dal tempo t e dalla variabile interna adimensionalizzata \bar{z} (in questo lavoro di tesi z corrisponde alla massa di una cellula ed i dettagli dell'adimensionalizzazione vengono forniti nel paragrafo 5.2.1).

Nell'espressione compaiono i termini $C_n(t)$, che rappresentano i coefficienti dell'espansione in serie e vengono espressi in funzione dei momenti (la loro derivazione viene riportata nel paragrafo successivo), e $\phi(\bar{z})$, che identificano un set di funzioni ortonormali chiamate '*trial functions*'.

Le *trial functions* utilizzate sono le funzioni ortonormali associate ai polinomi di Legendre (Strumendo e Arastoopour, 2008), descritte successivamente assieme alle equazioni implementate in Matlab[®].

L'equazione (5.1) permette dunque di descrivere la funzione di distribuzione attraverso un'espressione esplicita senza la necessità di ipotizzare a priori la sua forma funzionale; la sommatoria inoltre converge alla soluzione esatta $W(z, t)$ al tendere all'infinito del numero di momenti.

La soluzione del bilancio viene ricercata in un dominio finito della coordinata interna delimitato da condizioni al contorno che possono variare nel tempo.

5.2.1 Sviluppo delle equazioni implementate in Matlab

Il bilancio di popolazione della coltura microalgale viene risolto seguendo l'FCMOM tramite adimensionalizzazione della variabile interna z e della funzione di distribuzione $W(z, t)$.

Si riporta nuovamente il bilancio di popolazione sviluppato nel capitolo 2 (si ricorda che il termine di morte $\Theta(z)$ è posto pari a zero):

$$\frac{\partial W(z,t)}{\partial t} + \frac{\partial(r_{mean}(z,t) \cdot W(z,t))}{\partial z} = 2 \cdot \int_z^{z_{max}} p(z,m) \cdot T(m,t) \cdot W(m,t) dm - (D + T(z,t)) \cdot W(z,t) \quad (5.2)$$

L'equazione (5.2) può essere riscritta nel seguente modo:

$$\frac{\partial W(z,t)}{\partial t} + \frac{\partial(r_{mean}(z,t) \cdot W(z,t))}{\partial z} = Bh(z,t) - Dh(z,t) \quad (5.3)$$

dove $Bh(z,t)$ e $Dh(z,t)$ indicano rispettivamente i termini di nascita e di 'morte' cellulare dovuta ai processi di divisione. Per semplificare ulteriormente l'espressione, in $Dh(z,t)$ viene inserito anche il termine di *washout* presente nel caso di un reattore che opera in condizioni continue.

Il bilancio viene ora riformulato esprimendo in forma adimensionale prima la variabile interna di massa (z) e poi la funzione di distribuzione ($W(z,t)$).

Si utilizza la seguente trasformazione per il parametro di stato z :

$$\bar{z} = \frac{\left\{ z - \frac{z_{min}(t) + z_{max}(t)}{2} \right\}}{\frac{z_{max}(t) - z_{min}(t)}{2}} \quad (5.4)$$

In questo modo il dominio di interesse non è più l'intervallo $[z_{min}(t), z_{max}(t)]$ ma $[-1, 1]$.

L'equazione di bilancio di popolazione, riscritta in termini di \bar{z} , si modifica così:

$$\begin{aligned} & \frac{\partial W(\bar{z},t)}{\partial t} - \frac{\partial W(\bar{z},t)}{\partial \bar{z}} \cdot \frac{1}{z_{max}(t) - z_{min}(t)} \cdot \left\{ \left[\frac{dz_{min}(t)}{dt} + \frac{dz_{max}(t)}{dt} \right] + \bar{z} \cdot \left[-\frac{dz_{min}(t)}{dt} + \frac{dz_{max}(t)}{dt} \right] \right\} \\ & + \frac{2}{z_{max}(t) - z_{min}(t)} \cdot \left[\frac{\partial(r_{mean}(\bar{z},t) \cdot W(\bar{z},t))}{\partial \bar{z}} \right] = Bh(\bar{z},t) - Dh(\bar{z},t) \end{aligned} \quad (5.5)$$

Oltre alla variabile interna, si è deciso di descrivere in forma adimensionale anche la funzione di distribuzione $W(z,t)$ come segue:

$$\bar{W}(\bar{z},t) = \frac{W(\bar{z},t)}{W_{picco}} \quad (5.6)$$

dove W_{picco} indica un opportuno fattore di scala. Nelle simulazioni delle prove sperimentali svolte in condizioni batch, il fattore di scala utilizzato è rappresentato dalla concentrazione di cellule in corrispondenza del picco della distribuzione sperimentale di massa dell'inoculo. In quelle continue, W_{picco} si riferisce alla concentrazione massima nella distribuzione sperimentale di dimensioni ottenuta ad uno degli stati stazionari studiati.

La struttura del bilancio finale è dunque:

$$\begin{aligned} & \frac{\partial \bar{W}(\bar{z}, t)}{\partial t} - \frac{\partial \bar{W}(\bar{z}, t)}{\partial \bar{z}} \cdot \frac{1}{z_{\max}(t) - z_{\min}(t)} \cdot \left\{ \left[\frac{dz_{\min}(t)}{dt} + \frac{dz_{\max}(t)}{dt} \right] + \bar{z} \cdot \left[-\frac{dz_{\min}(t)}{dt} + \frac{dz_{\max}(t)}{dt} \right] \right\} \\ & + \frac{2}{z_{\max}(t) - z_{\min}(t)} \cdot \left[\frac{\partial(r_{mean}(\bar{z}, t) \cdot \bar{W}(\bar{z}, t))}{\partial \bar{z}} \right] = \frac{Bh(\bar{z}, t) - Dh(\bar{z}, t)}{W_{picco}} \end{aligned} \quad (5.7)$$

Il metodo FCMOM prevede che la soluzione al problema venga ricercata non direttamente in termini di $\bar{W}(\bar{z}, t)$ ma in termini dei momenti definiti in modo adimensionale come:

$$\mu_i = \int_{-1}^1 \bar{W}(\bar{z}, t) \cdot \bar{z}^i d\bar{z} \quad (5.8)$$

È quindi possibile derivare le equazioni di evoluzione nel tempo dei momenti (Strumendo e Arastoopour, 2008). Si noti che il numero di equazioni coincide con il numero di momenti che si decide di utilizzare per la rappresentazione della funzione di distribuzione:

$$\begin{aligned} & \frac{\partial \mu_i(t)}{\partial t} - \frac{1}{z_{\max}(t) - z_{\min}(t)} \cdot \left(\frac{dz_{\max}(t)}{dt} + \frac{dz_{\min}(t)}{dt} \right) \cdot \left[\bar{W}_1 - (-1)^i \cdot \bar{W}_{-1} - i \cdot \mu_{i-1}(t) \right] \\ & - \frac{1}{z_{\max}(t) - z_{\min}(t)} \cdot \left(\frac{dz_{\max}(t)}{dt} - \frac{dz_{\min}(t)}{dt} \right) \cdot \left[\bar{W}_1 - (-1)^{i+1} \cdot \bar{W}_{-1} - (i+1) \cdot \mu_i(t) \right] \\ & + \frac{2}{z_{\max}(t) - z_{\min}(t)} \cdot \left[r_1 \cdot \bar{W}_1 - (-1)^i \cdot r_{-1} \cdot \bar{W}_{-1} - i \cdot \int_{-1}^1 r_{mean}(\bar{z}, t) \cdot \bar{W}(\bar{z}, t) \cdot \bar{z}^{i-1} d\bar{z} \right] = \int_{-1}^1 \frac{Bh(\bar{z}, t) - Dh(\bar{z}, t)}{W_{picco}} \cdot \bar{z}^i d\bar{z} \end{aligned} \quad (5.9)$$

dove $\bar{W}_1, r_1, \bar{W}_{-1}, r_{-1}$ indicano i valori di $\bar{W}(\bar{z}, t)$ e $r(\bar{z})$ rispettivamente a $\bar{z} = 1$ e $\bar{z} = -1$.

Nell'applicazione del bilancio di popolazione ad una coltura microalgale, si può assumere che il valore minimo di massa assunto dalle cellule sia costante e nullo; in questo modo le equazioni (5.4) e (5.9) si riducono rispettivamente a:

$$\bar{z} = \frac{2 \cdot z - z_{\max}(t)}{z_{\max}(t)} \quad (5.10)$$

$$\begin{aligned} & \frac{\partial \mu_i(t)}{\partial t} - \frac{1}{z_{\max}(t)} \cdot \left(\frac{dz_{\max}(t)}{dt} \right) \cdot [\bar{W}_1 - (-1)^i \cdot \bar{W}_{-1} - i \cdot \mu_{i-1}(t)] \\ & - \frac{1}{z_{\max}(t)} \cdot \left(\frac{dz_{\max}(t)}{dt} \right) \cdot [\bar{W}_1 - (-1)^{i+1} \cdot \bar{W}_{-1} - (i+1) \cdot \mu_i(t)] \\ & + \frac{2}{z_{\max}(t)} \cdot \left[r_1 \cdot \bar{W}_1 - (-1)^i \cdot r_{-1} \cdot \bar{W}_{-1} - i \cdot \int_{-1}^1 r_{\text{mean}}(\bar{z}, t) \cdot \bar{W}(\bar{z}, t) \cdot \bar{z}^{i-1} d\bar{z} \right] = \int_{-1}^1 \frac{Bh(\bar{z}, t) - Dh(\bar{z}, t)}{W_{\text{picco}}} \cdot \bar{z}^i d\bar{z} \end{aligned} \quad (5.11)$$

Le equazioni (5.11) conservano la stessa struttura generale del bilancio di popolazione da cui sono state ottenute: sono presenti sempre i termini di accumulo e i contributi dovuti ai processi di crescita, di nascita/ morte per divisione cellulare e di *washout*. Compiono inoltre due nuovi termini in seguito alla trasformazione della coordinata interna in una variabile adimensionale.

Le equazioni, così come sono, non possono ancora essere risolte in quanto il numero di incognite (μ_i e $\bar{W}(\bar{z}, t)$) supera il numero delle equazioni stesse; se si sostituisce l'incognita $\bar{W}(\bar{z}, t)$ con una relazione come l'espressione (5.1) il sistema di equazioni diventa risolvibile.

La funzione di distribuzione adimensionale viene quindi definita in funzione dei momenti tramite un'espansione in serie troncata dopo i primi M termini:

$$\bar{W}(\bar{z}, t) = \sum_{n=0}^{M-1} C_n(t) \cdot \phi_n(\bar{z}) \quad (5.12)$$

I termini $\phi_n(\bar{z})$, come anticipato, sono le funzioni ortonormali associate ai polinomi di Legendre:

$$\phi_n(\bar{z}) = \sqrt{\frac{2 \cdot n + 1}{2}} \cdot P_n(\bar{z}) \quad (5.13)$$

dove $P_n(\bar{z})$ rappresentano i relativi polinomi:

$$P_0(\bar{z}) = 1 \quad (5.14)$$

$$P_n(\bar{z}) = (2^n \cdot n!)^{-1} \cdot \frac{d^n ((\bar{z}^2 - 1)^n)}{d\bar{z}^n} \quad \text{con } n \neq 0. \quad (5.15)$$

I coefficienti $C_n(t)$ sono invece ricavati da:

$$C_n(t) = \int_{-1}^1 \bar{W}(\bar{z}, t) \cdot \phi_n(\bar{z}) d\bar{z}. \quad (5.16)$$

Sfruttando la definizione (5.8), si ottiene che (Strumendo e Arastoopour, 2008):

$$C_n(t) = \sqrt{\frac{2 \cdot n + 1}{2}} \cdot \frac{1}{2^n} \cdot \sum_{v=0}^n (-1)^{n-v} \cdot \frac{(2 \cdot v)!}{(2 \cdot v - n)!} \cdot \left[\frac{1}{(n-v)! \cdot v!} \right] \cdot \mu_{2v-n} \quad (5.17)$$

dove i momenti con indice negativo vengono omessi.

Ad ogni istante di tempo è dunque disponibile un'espressione esplicita per $\bar{W}(\bar{z}, t)$; gli integrali nelle equazioni possono essere risolti in funzione dei momenti, una volta sviluppati i termini di crescita, di nascita e scomparsa cellulare introdotti per rappresentare la coltura microalgale.

Il sistema (5.11) deve essere inoltre accoppiato con l'equazione di variazione nel tempo di z_{max} . Tale equazione corrisponde alla legge di crescita applicata a $z = z_{max}$; secondo l'equazione (4.17) si ottiene una velocità di crescita nulla, z_{max} rimane quindi costante nel tempo).

La soluzione finale che si ottiene è data in termini dei momenti; l'espressione (5.12) permetterà però la ricostruzione di $\bar{W}(\bar{z}, t)$.

5.2.2 Termini di crescita, di nascita/morte per divisione e di washout

I modelli matematici che si è deciso di adottare per rappresentare i processi di crescita, di nascita/morte per divisione delle cellule algali nei Capitoli 2 e 4, riscritti in termini di coordinata adimensionale, diventano:

$$r_{mean}(\bar{z}, t) = \frac{(k_{mean}(t) - k_p) \cdot z_{max}}{4} \cdot (1 + \bar{z}) \cdot (1 - \bar{z}) \quad (5.18)$$

$$T(\bar{z}, t) = \frac{2r_{mean}(\bar{z}, t)e^{-x^2}}{\varepsilon\sqrt{\pi}(1 - erf(x))} \quad (5.19)$$

$$p(\bar{z}, \bar{m}) = 60 \cdot \frac{(\bar{m} - \bar{z})^2 \cdot (\bar{z} + 1)^2}{z_{max} \cdot (\bar{m} + 1)^5} \quad (5.20)$$

Secondo la legge di crescita che si è deciso di impiegare la condizione al contorno rimane costante nel tempo; le equazioni (5.11) si semplificano dunque in:

$$\frac{\partial \mu_i(t)}{\partial t} + \frac{2}{z_{max}} \cdot \left[-i \cdot \int_{-1}^1 r_{mean}(\bar{z}) \cdot \bar{W}(\bar{z}, t) \cdot \bar{z}^{i-1} d\bar{z} \right] = \int_{-1}^1 \frac{Bh(\bar{z}, t) - Dh(\bar{z}, t)}{W_{picco}} \cdot \bar{z}^i d\bar{z} \quad (5.21)$$

Inserita l'espressione (5.18), le equazioni (5.21) si modificano successivamente nel seguente modo:

$$\frac{\partial \mu_i(t)}{\partial t} - \frac{i \cdot (k_{mean}(t) - k_p) \cdot \mu_{i-1}(t)}{2} + \frac{i \cdot (k_{mean}(t) - k_p) \cdot \mu_{i+1}(t)}{2} = \int_{-1}^1 \frac{Bh(\bar{z}, t) - Dh(\bar{z}, t)}{W_{picco}} \cdot \bar{z}^i d\bar{z} \quad (5.22)$$

Si sviluppano infine separatamente i termini a destra del segno di uguaglianza, a partire dalle

definizioni di $Bh(z, t) = 2 \cdot \int_z^{z_{max}} p(z, m) \cdot T(m, t) \cdot W(m, t) dm$ e $Dh(z, t) = (T(z, t) + D) \cdot W(z, t)$.

Riscritti in termini adimensionali, Bh e Dh diventano rispettivamente:

$$Bh(\bar{z}, t) = \int_{\bar{z}}^1 p(\bar{z}, \bar{m}) \cdot T(\bar{m}, t) \cdot W(\bar{m}, t) \cdot z_{\max} d\bar{m} \quad (5.23)$$

$$Dh(\bar{z}, t) = (T(\bar{z}, t) + D) \cdot W(\bar{z}, t) \quad (5.24)$$

Le equazioni di evoluzione dei momenti hanno dunque la seguente struttura finale:

$$\begin{aligned} \frac{\partial \mu_i(t)}{\partial t} - \frac{i \cdot (k_{mean}(t) - k_p) \cdot \mu_{i-1}(t)}{2} + \frac{i \cdot (k_{mean}(t) - k_p) \cdot \mu_{i+1}(t)}{2} &= \int_{-1}^1 \bar{z}^i \int_{\bar{z}}^1 p(\bar{z}, \bar{m}) \cdot T(\bar{m}, t) \cdot \bar{W}(\bar{m}, t) \cdot z_{\max} d\bar{m} d\bar{z} \\ - \int_{-1}^1 \bar{z}^i \cdot T(\bar{z}, t) \cdot \bar{W}(\bar{z}, t) d\bar{z} - D \cdot \mu_i & \end{aligned} \quad (5.25)$$

dove si ricorda che la funzione di distribuzione adimensionale viene approssimata secondo l'equazione (5.12).

Il sistema (5.25) è composto da equazioni differenziali risolvibili numericamente in Matlab[®] mediante la *function ode15s*, risolutore implicito multistep di ordine variabile da 1 a 5.

L'integrale singolo e quello doppio vengono risolti numericamente utilizzando rispettivamente il metodo dei trapezi e il metodo *iled* (*function quad2d*).

5.2.3 Bilanci di materia dei nutrienti e modello di attenuazione della luce

Secondo le equazioni (4.6) e (4.7), risulta che:

$$k_{mean}(t) = k_{\max} \cdot \frac{C_f(t)}{k_{mf} + C_f(t)} \cdot \frac{C_a(t)}{k_{ma} + C_a(t)} \cdot \frac{1}{H} \cdot \int_0^H \frac{I(t, h)}{k_{mi} + I(t, h)} dh. \quad (5.26)$$

Nelle simulazioni di un sistema reattivo che opera in condizioni batch, per poter determinare il valore istantaneo di $k_{mean}(t)$ da inserire successivamente nella funzione $r_{mean}(\bar{z}, t)$, il bilancio di popolazione deve essere risolto assieme ai 2 bilanci di materia relativi all'azoto e al fosforo, che si modificano nel seguente modo con la coordinata interna e la funzione di distribuzione adimensionali:

$$\frac{dC_s(t)}{dt} = -\frac{W_{picco} \cdot (k_{mean}(t) - k_p) \cdot z_{max}^2}{y_s \cdot 8} \cdot \int_{-1}^1 (1 - \bar{z}^2) \cdot \bar{W}(\bar{z}, t) d\bar{z} \quad (5.27)$$

Sia nelle simulazioni di un fotobioreattore batch sia in quelle di un sistema continuo, è fondamentale poi la conoscenza di come l'intensità $I(t, h)$ varia nel tempo e lungo lo spessore della coltura. Secondo le equazioni (4.11), (4.12) e (4.13), una volta definite le proprietà ottiche (E_a , bE_s) la variabile incognita necessaria per determinare il valore locale di I lungo la profondità h è C_{BS} .

Dal capitolo 3 è stato stimato che $C_{BS}/C_B = 22\%$: nell'espressione (4.13) è possibile quindi sostituire la grandezza C_{BS} con C_B , termine che viene calcolato a partire dai momenti. Il peso fresco C_B corrisponde infatti al momento primo per la funzione di distribuzione $W(z, t)$; di seguito si riporta la sua definizione prendendo in considerazione z e W adimensionali:

$$C_B(t) = \frac{W_{picco} \cdot z_{max}^2}{4} \int_{-1}^1 (\bar{z} + 1) \cdot \bar{W}(\bar{z}, t) d\bar{z} \quad (5.28)$$

L'equazione (4.13) diventa quindi:

$$\delta(t) = \alpha \cdot C_B(t) \cdot 0.22 \cdot (E_a + 2 \cdot b \cdot E_s) \quad (5.29)$$

Le espressioni (5.28) e (5.29) sono inserite infine in (4.11) per il calcolo dell'irradianza.

Capitolo 6

Risultati e discussione

In questo capitolo vengono presentati i risultati che si sono ottenuti dalla risoluzione dell'equazione di bilancio di popolazione grazie al metodo FCMOM descritto nel capitolo 4, considerando un numero di momenti pari a 15; i dati simulati vengono poi confrontati con quelli sperimentali.

Ai programmi implementati per rappresentare la dinamica di crescita di una coltura microalgale in condizioni batch a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ si fornisce come condizione iniziale:

- la distribuzione sperimentale di massa dell'inoculo;
- le concentrazioni iniziali dei nutrienti e il valore di irradianza incidente sulla superficie del reattore esposta direttamente alla sorgente di luce;
- i parametri che compaiono nei modelli di crescita e divisione di una cellula e in quelli di distribuzione della luce all'interno del sistema di reazione (mc , ε , E_a , bE_s , k_p , Φ e ρ_m sono inizialmente ipotizzati e poi stimati grazie ad un confronto visivo tra i dati calcolati e le misure sperimentali).

Invece per descrivere un sistema di coltura in continuo si fornisce come condizione iniziale:

- la distribuzione di massa calcolata come media tra quelle ottenute ad uno degli stati stazionari realizzati;
- il valore di irradianza incidente sulla superficie del reattore esposta direttamente alla sorgente di luce;
- i parametri che compaiono nei modelli di crescita e divisione di una cellula e in quelli di distribuzione della luce all'interno del sistema di reazione.

6.1 Simulazioni dell'esperimento batch a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

I parametri principali, presenti nei modelli utilizzati e non noti a priori per mancanza di letteratura, sono la massa media a cui una cellula si divide (mc) e la deviazione standard della relativa distribuzione di massa (ε).

Questi termini vengono quindi ipotizzati, all'inizio, in base ai dati sperimentali raccolti a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e, in seguito, adattati in modo tale che le simulazioni restituiscano in corrispondenza del tempo finale un peso medio per cellula prossimo alla misura sperimentale. La stima di questi 2 coefficienti viene eseguita assegnando ai parametri del modello di Cornet-Pruvost i valori riportati in Enzo, 2012 e a k_{mf} , k_{ma} quelli in Xin *et al.* (2010) per *Scenedesmus sp. LX1* e fissando, inoltre, i valori delle rese dei nutrienti calcolati secondo la procedura descritta nel paragrafo 4.1 (Tabella 6.1).

Tabella 6.1. Valori dei parametri presenti nella cinetica di crescita, nel modello di distribuzione della luce all'interno del reattore e nei bilanci ponderali dei nutrienti (azoto e fosforo) a intensità di luce incidente di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

parametro	valore
ρ_m	0.8
Φ	$2.77 \cdot 10^{-9} \text{ kg } \mu\text{mol}^{-1}$
E_a	$114 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$
bE_s	$40 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$
k_p	0.156 d^{-1}
k_{mf}	0.27 mg/l
k_{ma}	12.1 mg/l
k_{mi}	$75 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
y_f	$3.74 \cdot 10^{-4}$
y_a	0.016

In conclusione, i valori di mc ed ε che sembrano riprodurre in modo più accurato i dati di massa media relativi agli ultimi giorni dell'esperimento batch sono 185 pg e 145 pg

rispettivamente; in Figura 6.1 viene mostrato come risulta la distribuzione di divisione $h_d(z)$ inserendo nell'equazione (2.23) $m_c = 185$ pg ed $\varepsilon = 145$ pg .

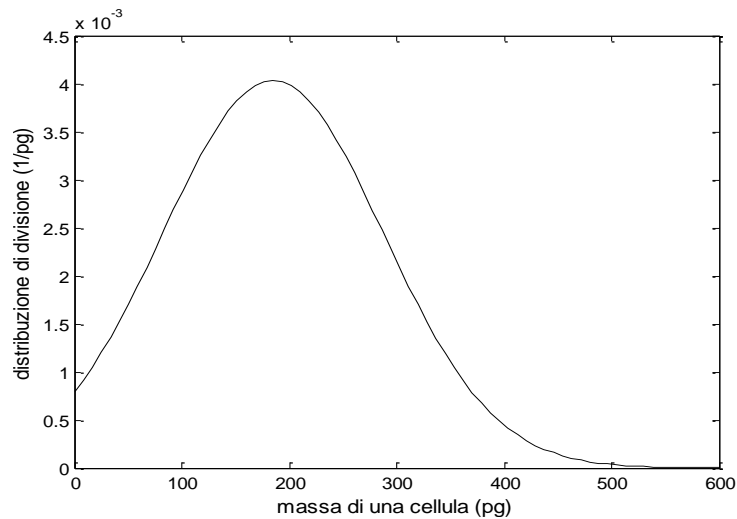


Figura 6.1. Distribuzione di massa delle cellule che si dividono (parametri ipotizzati: $m_c = 185$ pg, $\varepsilon = 145$ pg).

La Figura 6.2 a) e b) mostra tuttavia una discrepanza significativa tra i punti sperimentali e le curve di crescita calcolate: queste presentano infatti una pendenza inferiore.

I valori ipotizzati per i parametri riassunti in Tabella 6.1 sembrano pertanto non adatti alla descrizione dell'esperimento in questione.

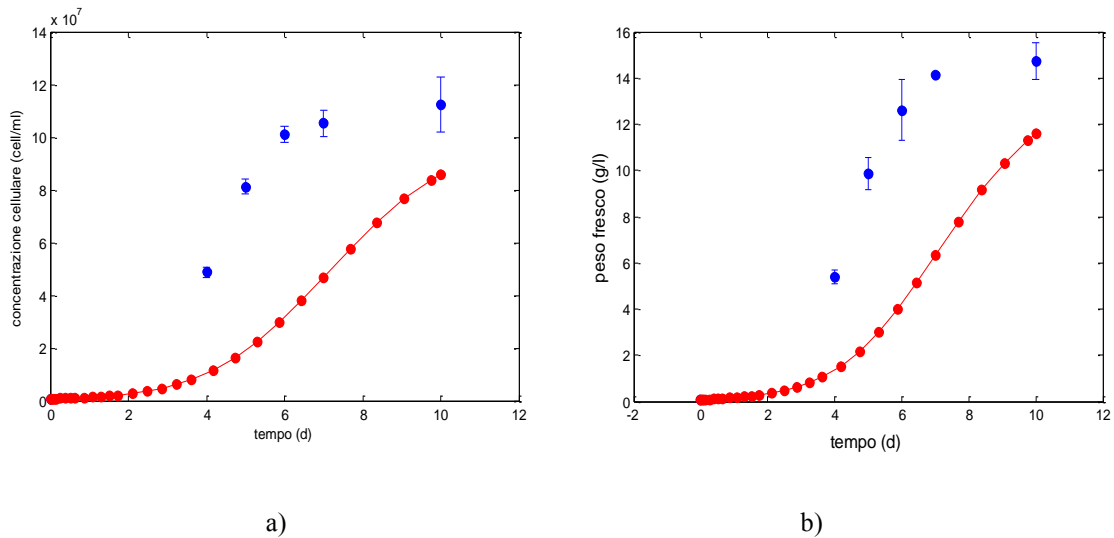


Figura 6.2. Profili sperimentali (indicati in blu) e calcolati (indicati con una linea continua rossa) di concentrazione cellulare (a) e di peso fresco (b). I dati si riferiscono all'esperimento batch svolto a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Si è ritenuto opportuno modificare i valori attribuiti alla resa energetica, al coefficiente di assorbimento e al termine di mantenimento per i seguenti motivi:

- ρ_m viene definito in letteratura in modo ambiguo;
- E_a , secondo le equazioni (4.8) e (4.12), tende a influenzare sia il valore assunto da k_{max} sia il profilo di intensità luminosa lungo lo spessore del reattore;
- a k_p sono stati assegnati diversi valori in letteratura (Enzo, 2012, Beraldi, 2013).

La stima di questi coefficienti viene realizzata confrontando, dopo ogni simulazione, i profili calcolati e quelli misurati di N e C_B : si ottengono così $\rho_m = 0.875$, $E_a = 170 \text{ kg m}^{-2}$ e $k_p = 0.10 \text{ d}^{-1}$, valori che non differiscono comunque molto da quelli originali.

Le Figure 6.3 e 6.4 riportano le curve di crescita di biomassa algale simulate e quelle sperimentali: si può constatare che il modello riesce a riprodurre in modo soddisfacente gli andamenti della concentrazione in numero e peso di cellule; i profili calcolati presentano chiaramente una prima fase esponenziale della durata di 4-5 giorni e una stazionaria durante la quale N e C_B rimangono costanti nel tempo.

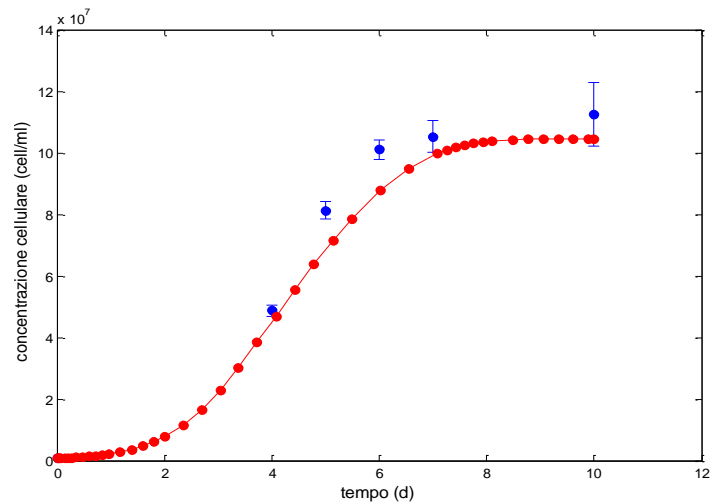


Figura 6.3. Profili sperimentali (indicati in blu) e calcolati (indicati con una linea continua rossa) di concentrazione cellulare. I dati si riferiscono all'esperimento batch svolto a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

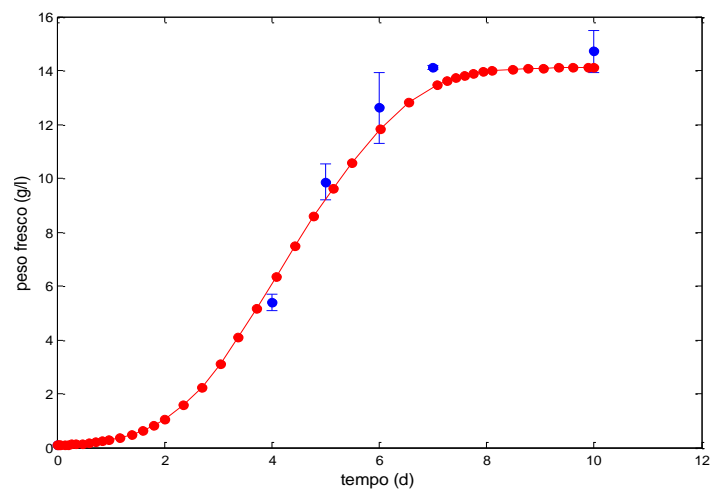


Figura 6.4. Profili sperimentali (indicati in blu) e calcolati (indicati con una linea continua rossa) di peso fresco. I dati si riferiscono all'esperimento batch svolto a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Le Figure 6.5, 6.6 e 6.7 mostrano la variazione delle concentrazioni di fosforo e azoto (C_f e C_a) nel tempo e di irradianza lungo la profondità della coltura.

Sebbene non siano state condotte analisi sui nutrienti lungo il periodo dell'esperimento batch, i profili di C_f e C_a rappresentano comunque quelli caratteristici riportati in letteratura (Mata et al., 2009).

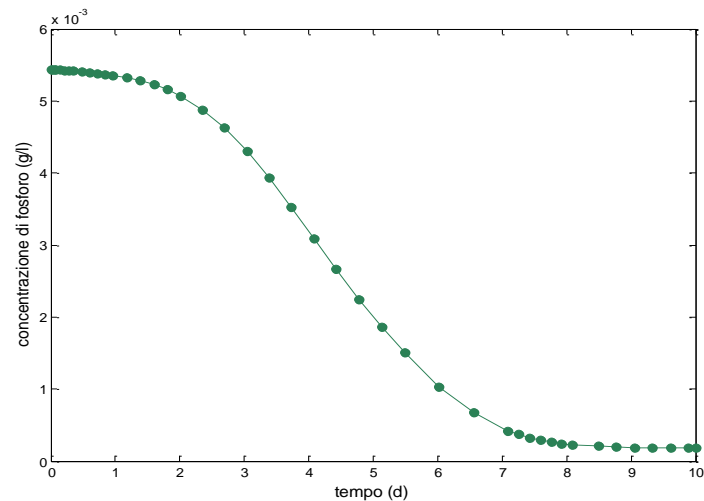


Figura 6.5. Profilo simulato di concentrazione ponderale del fosforo in reattore batch a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$.

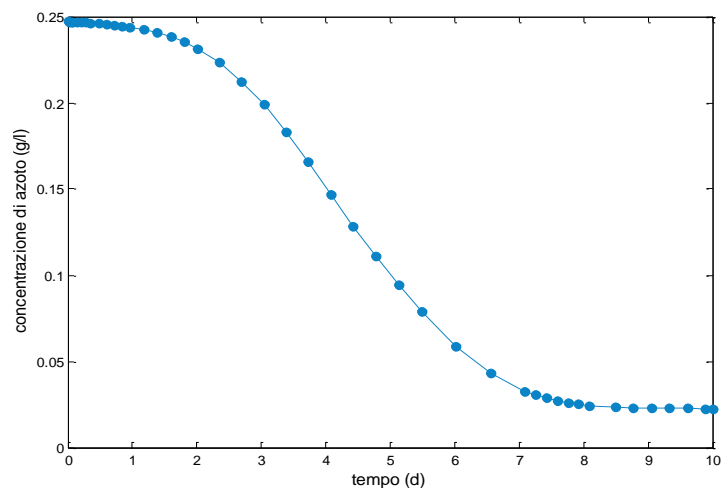


Figura 6.6. Profilo simulato di concentrazione ponderale dell'azoto in reattore batch a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$.

Nel grafico 6.7 le curve di intensità sono, inoltre, parametrizzate con la coordinata temporale. Si può osservare che:

- a $t = 0$ d il profilo di I lungo lo spessore del *flat panel* è pressochè piatto in quanto la concentrazione microalgale all'interno del sistema di reazione è molto bassa (si ricorda che l'OD di partenza nell'esperimento è 0.1) e quindi il fenomeno del *self shading* è trascurabile;
- con il proseguire del tempo di simulazione il profilo tende ad abbassarsi e a curvarsi in modo esponenziale. Non si raggiunge comunque mai una situazione in cui si crea una zona di spessore rilevante nel reattore dove le cellule siano al buio.

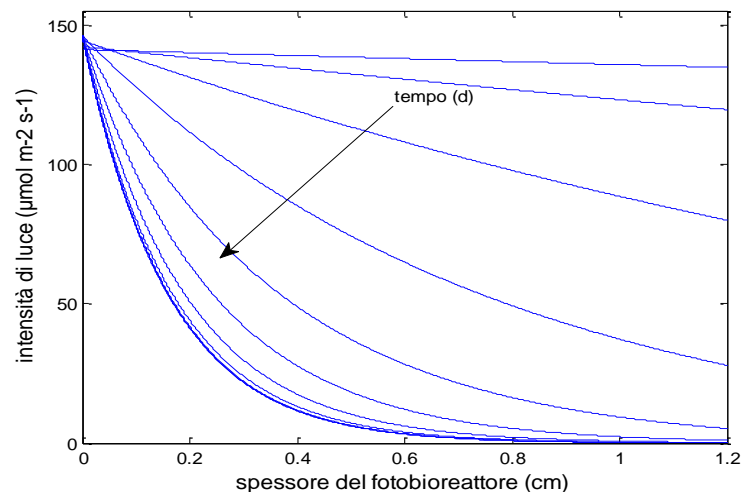


Figura 6.7. Profili simulati di intensità di luce lungo lo spessore del fotobioreattore batch, parametrizzati con la coordinata temporale. L'irradianza incidente è $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

La Figura 6.8 riassume le distribuzioni di massa in termini di concentrazione per ogni giorno simulato da $t = 0$ d fino a $t = 10$ d (in ordinata si è deciso di lasciare la concentrazione normalizzata rispetto al fattore di scala W_{picco}).

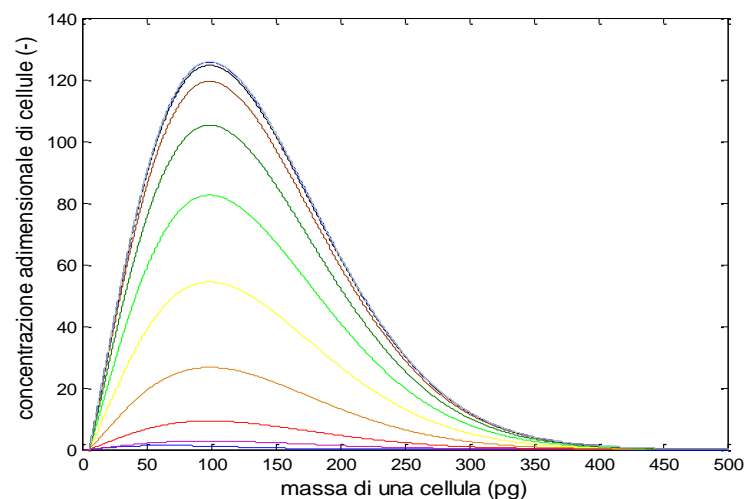


Figura 6.8. Distribuzioni adimensionali di massa, simulate in condizioni batch da $t = 0$ d (linea continua in blu) a $t = 10$ d (linea continua in azzurro) a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; la concentrazione è normalizzata rispetto al valore di picco della distribuzione sperimentale di dimensioni dell'inoculo.

Nelle figure 6.9 e 6.10 si confrontano separatamente la curva sperimentale e quella calcolata di distribuzione a $t = 10$ d e $t = 7$ d (che si riferiscono agli ultimi 2 giorni seguiti dell'esperimento batch). Tra i 2 casi, quello più accuratamente descritto è il secondo; a $t = 10$

d il profilo simulato risulta traslato verso dimensioni delle cellule maggiori rispetto a quello sperimentale: in corrispondenza dell'ultimo giorno della prova si è infatti misurato un valore di massa media fresca più basso rispetto a quello relativo a $t = 7$ d.

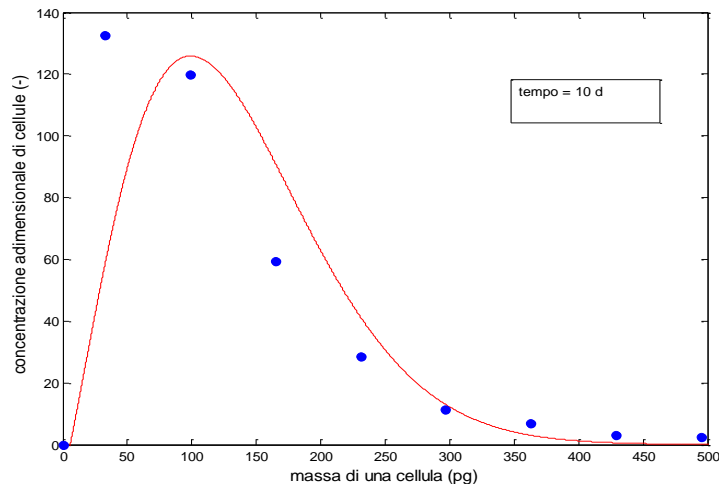


Figura 6.9. Confronto tra il profilo sperimentale (indicato in blu) e quello calcolato (indicato con una linea continua rossa) di distribuzione adimensionale di massa a $t = 10$ d. I dati si riferiscono all'esperimento batch svolto a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

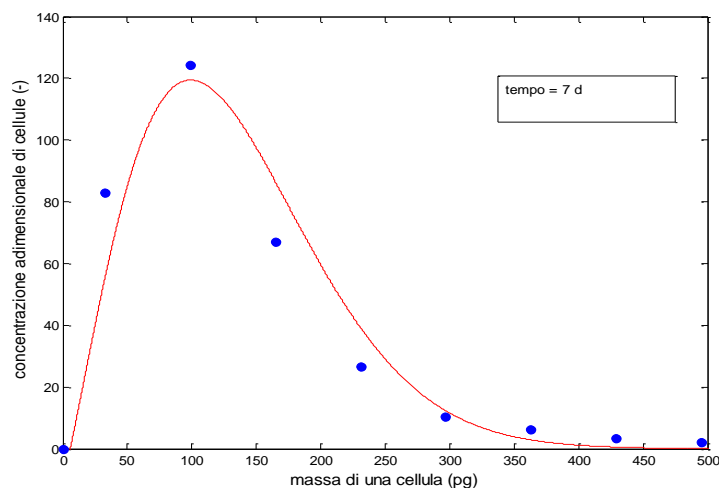


Figure 6.10. Confronto tra il profilo sperimentale (indicato in blu) e quello calcolato (indicato con una linea continua rossa) di distribuzione adimensionale di massa a $t = 7$ d. I dati si riferiscono all'esperimento batch svolto a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

È interessante presentare infine la variazione nel tempo delle velocità specifiche di crescita sul peso (si ricorda che $k_{mean}(t) - k_p$ coincide con k_B a meno del termine quadratico z^2/z_{max}) e sul numero di cellule (k_N) (Figure 6.11 e 6.12).

Mediando tra loro i valori di k_B e di k_N ricavati dalla risoluzione del bilancio di popolazione e appartenenti alla fase ‘esponenziale’ di crescita microalgale, si ottengono rispettivamente $k_B = 1.2 \text{ d}^{-1}$ e $k_N = 0.98 \text{ d}^{-1}$, risultati abbastanza simili a quelli determinati sperimentalmente nel capitolo 3 ($k_B = 1 \text{ d}^{-1}$ e $k_N = 0.96 \text{ d}^{-1}$).

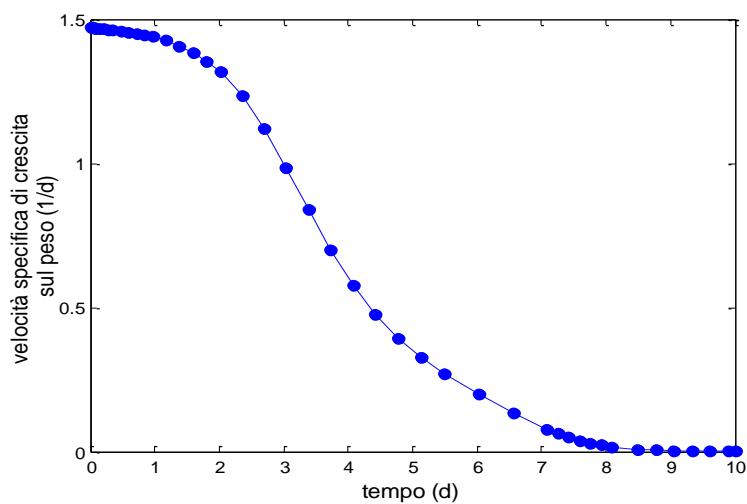


Figura 6.11. Profilo simulato di velocità specifica di crescita sul peso di cellule in reattore batch a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

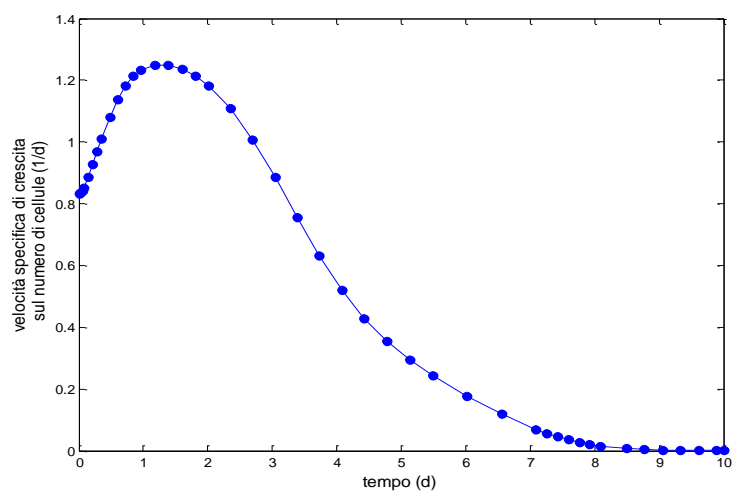


Figura 6.12. Profilo simulato di velocità specifica di crescita sul numero di cellule in reattore batch a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

6.1.1 Simulazione a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ senza dipendenza da substrati

Prima di simulare l'esperimento batch a $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, si è provato, infine, a descrivere la dinamica di crescita di una coltura microalgale con una legge cinetica modificata dove viene presa in considerazione solo la dipendenza dalla luce e non più dai substrati, come nel caso di un sistema di reazione che opera in condizioni continue.

In Figura 6.13 a) e b) si riportano le curve di crescita di biomassa ottenute con questa ipotesi semplificativa (i parametri mc , ε , E_a , ρ_m e k_p sono stati assunti pari ai valori stimati precedentemente mentre gli altri rimangono fissati pari ai dati in Tabella 6.1).

Si evince che i profili calcolati riescono a descrivere solo la fase logaritmica ma non quella stazionaria sperimentale; tendono infatti a salire e a manifestare uno stadio stazionario di crescita solo a un tempo di simulazione molto più alto (intorno a 40 d) e non fisicamente consistente con quello di un tipico esperimento batch.

Una rappresentazione soddisfacente dell'esperimento non si raggiunge nemmeno riassegnando a tutti i parametri del modello di Cornet-Pruvost i valori stimati in Enzo, 2012 e riportati in Tabella 6.1 o variandoli in modo significativo rispetto a quelli originali.

Si conclude quindi che non può essere trascurata la dipendenza dai nutrienti nelle simulazioni di un fotobioreattore batch se si vuole riprodurre anche l'andamento della fase stazionaria.

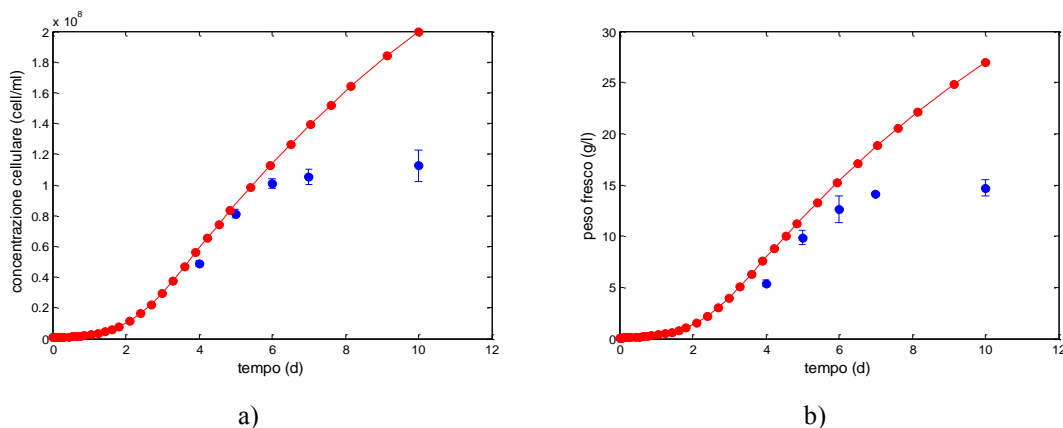


Figura 6.13. Profili sperimentali (indicati in blu) e calcolati (indicati con una linea continua rossa) di concentrazione cellulare (a) e di peso fresco (b). I dati si riferiscono all'esperimento batch svolto a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

6.2 Simulazioni del primo esperimento batch a $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Da un'analisi comparativa delle distribuzioni sperimentali di massa e dei profili di massa media secca, si può constatare che le cellule presentano delle dimensioni medie maggiori a irradianza più elevata.

Si è stabilito quindi che i termini mc ed ε debbano variare con l'intensità incidente.

I valori che sembrano riprodurre in modo più accurato i dati di massa media relativi agli ultimi giorni dell'esperimento sono 300 pg e 200 pg rispettivamente; in Figura 6.14 viene mostrato come risulta la distribuzione di divisione $h_d(z)$ inserendo nell'equazione (2.23) $mc = 300$ pg ed $\varepsilon = 200$ pg.

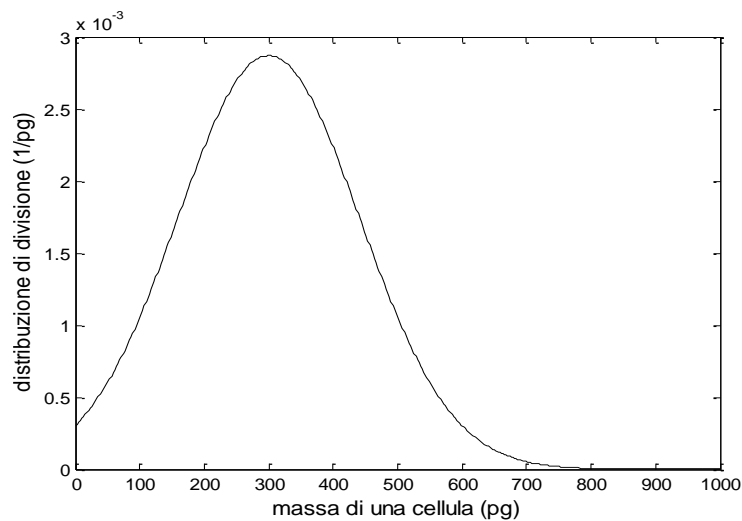


Figura 6.14. Distribuzione di massa delle cellule che si dividono (parametri ipotizzati: $mc = 300$ pg, $\varepsilon = 200$ pg).

La stima di questi 2 coefficienti viene eseguita assumendo per i parametri E_a , bE_s e k_p i valori trovati in Beraldi, 2013 a intensità di $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; ρ_m viene assunto pari al valore stimato a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mentre k_{mi} , k_{mf} e k_{ma} e Φ rimangono fissi (Tabella 6.2).

In Tabella 6.2 sono riportati inoltre i termini di resa calcolati e corretti seguendo la stessa procedura adottata precedentemente.

Tabella 6.2. Valori dei parametri presenti nella cinetica di crescita, nel modello di distribuzione della luce all'interno del reattore e nei bilanci ponderali dei nutrienti (azoto e fosforo) a intensità di luce incidente di $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

parametro	valore
ρ_m	0.875
Φ	$2.77 \cdot 10^{-9} \text{ kg } \mu\text{mol}^{-1}$
E_a	$75 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$
bE_s	$9 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$
k_p	0.288 d^{-1}
k_{mf}	0.27 mg/l
k_{ma}	12.1 mg/l
k_{mi}	$75 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
y_f	$2.67 \cdot 10^{-4}$
y_a	0.0115

Si verifica anche in questo caso una discrepanza significativa tra i punti sperimentali e le curve di crescita simulate (Figura 6.15 a) e b)): queste esibiscono una pendenza inferiore e nessun punto di flesso che permetta il passaggio da una fase esponenziale ad una stazionaria nell'arco di un periodo di 7 d corrispondenti alla durata dell'esperimento batch in questione.

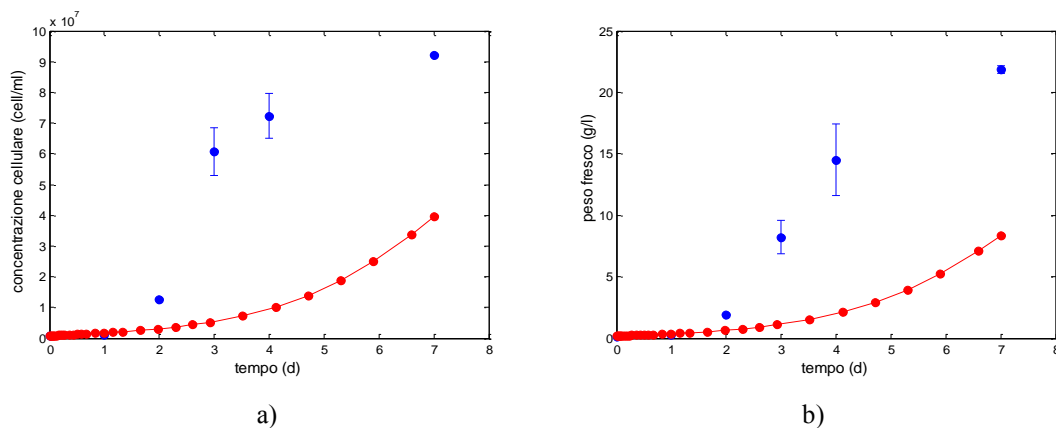


Figura 6.15. Profili sperimentali (indicati in blu) e calcolati (indicati con una linea continua rossa) di concentrazione cellulare (a) e di peso fresco (b). I dati si riferiscono al primo esperimento batch svolto a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Ad eccezione di ρ_m , si è quindi deciso di provare a correggere i valori assegnati ad E_a e a k_p . Confrontando, dopo ogni simulazione, i profili calcolati e quelli misurati di N e C_B , si stimano alla fine $E_a = 150 \text{ kg m}^{-2}$ e $k_p = 0.15 \text{ d}^{-1}$. Nelle Figure 6.16 e 6.17 si riportano i risultati ottenuti in termini di profilo di concentrazione di biomassa.

Rispetto alle simulazioni a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ si sono quindi adottati:

- un coefficiente di assorbimento più basso;
- una costante di morte/mantenimento più alta. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che le cellule si trovano in una condizione di maggiore stress causato dall'eccesso di luce.

Come si vede dalle Figure 6.16 e 6.17, la curva di crescita sul numero di cellule riproduce abbastanza accuratamente i primi punti sperimentali e si assesta sullo stesso valore finale; il profilo in termini di peso riesce a descrivere più opportunamente l'intera fase esponenziale ma si assesta su un valore finale leggermente più basso.

Nella prima parte le simulazioni sovrastimano leggermente i dati misurati, probabilmente perché questi non appartengono ad una vera e propria fase logartimica di crescita ma ad uno stadio *lag* durante il quale le microalghe tendono ad adattarsi all'intensità di luce saturante. Si noti che la legge di crescita adottata trascura infatti questo fenomeno.

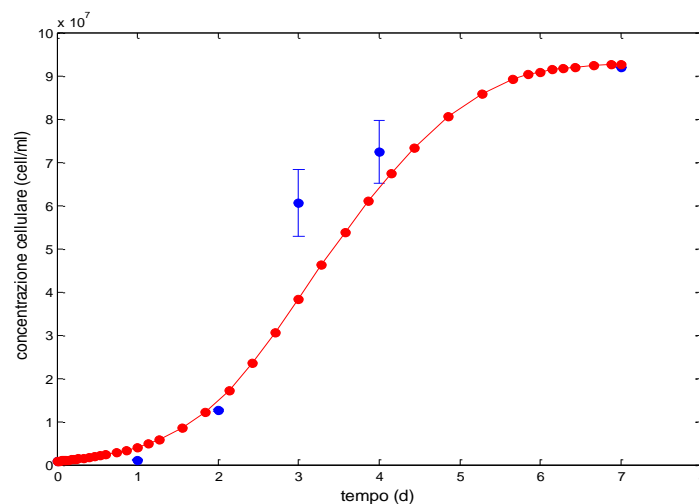


Figura 6.16. Profili sperimentali (indicati in blu) e calcolati (indicati con una linea continua rossa) di concentrazione cellulare. I dati si riferiscono al primo esperimento batch svolto a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

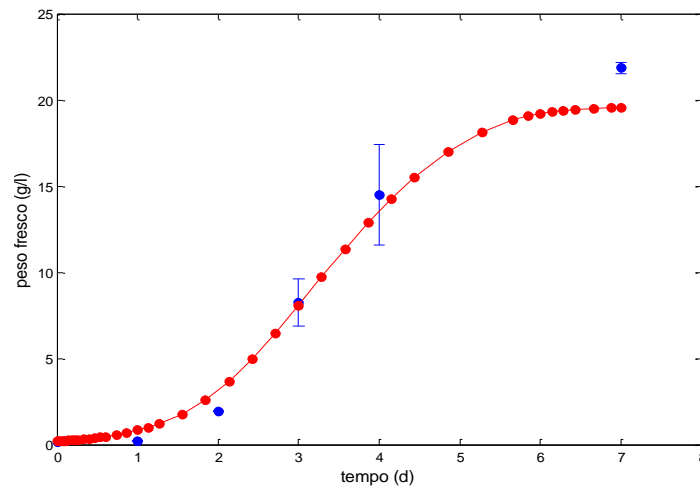


Figura 6.17. Profili sperimentali (indicati in blu) e calcolati (indicati con una linea continua rossa) di peso fresco. I dati si riferiscono al primo esperimento batch svolto a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Le Figure 6.18, 6.19 e 6.20 mostrano la variazione delle concentrazioni di fosforo e azoto (C_f e C_a) prodotta dalla simulazione, e i profili di irradianza lungo la profondità della coltura parametrizzati con la coordinata temporale; è interessante porre a confronto questi risultati con quelli ottenuti a intensità di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Dai grafici si può notare che a irradianza più elevata il consumo dei nutrienti è più rapido (come si era già brevemente accennato nella descrizione del profilo sperimentale di massa media fresca nel capitolo 3).

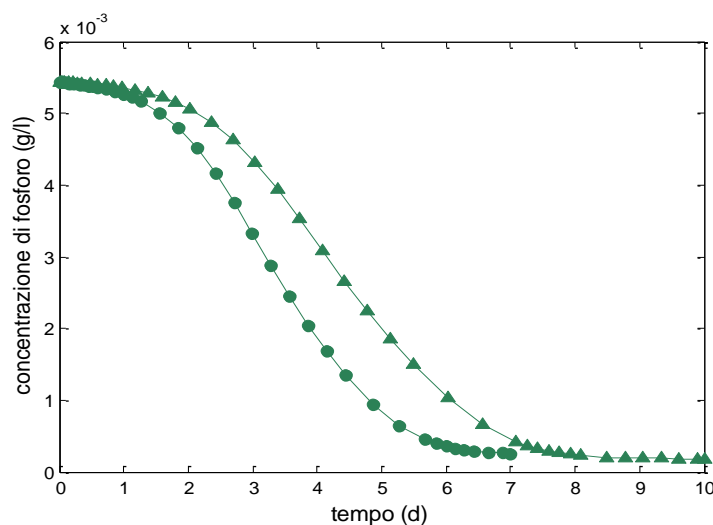


Figure 6.18. Profili simulati di concentrazione ponderale del fosforo in reattore batch a intensità di luce di 150 (linea continua con i triangoli) e $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (linea continua con i cerchi).

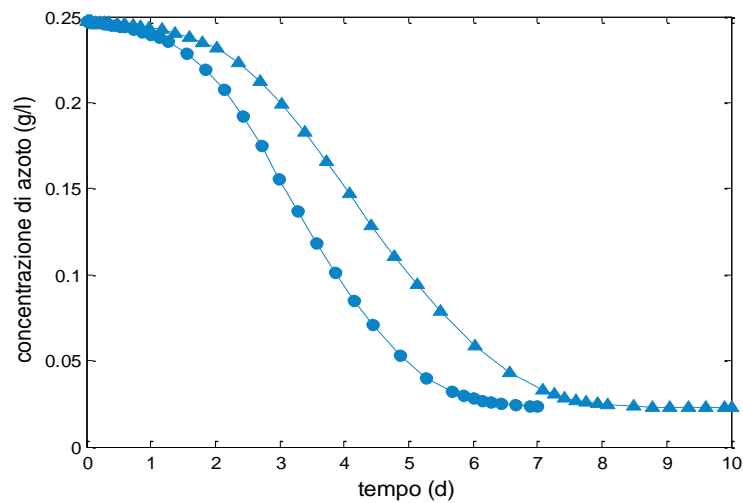


Figure 6.19. Profili simulati di concentrazione ponderale dell'azoto in reattore batch a intensità di luce di 150 (linea continua con i triangoli) e 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (linea continua con i cerchi).

Nella Figura 6.20 si riscontra, al tempo finale di simulazione, un'attenuazione della luce maggiore nel primo caso in quanto l'irradianza fornita al pannello dalla lampada è più bassa.

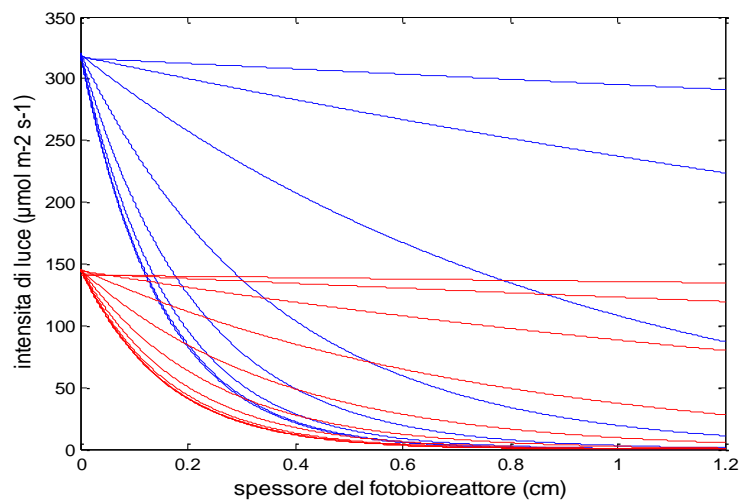


Figura 6.20. Profili simulati di intensità di luce lungo lo spessore del fotobioreattore batch, parametrizzati con la coordinata temporale, a irradianza incidente di 150 (linee blu) e 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (linee rosse).

La Figura 6.21 riassume le distribuzioni di massa in termini di concentrazione per ogni giorno simulato da $t = 0$ d fino a $t = 7$ d (in ordinata si considera la concentrazione normalizzata rispetto al fattore di scala W_{picco}).

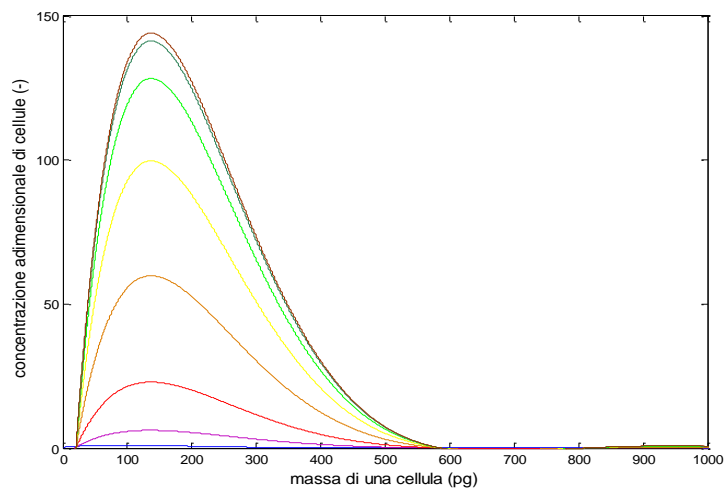


Figura 6.21. Distribuzioni adimensionali di massa, simulate in condizioni batch da $t = 0$ d (linea continua blu) a $t = 7$ d (linea continua marrone) a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; la concentrazione è normalizzata rispetto al valore di picco della distribuzione sperimentale di dimensioni dell'inoculo.

Nelle figure 6.22 e 6.23 si confrontano separatamente la curva sperimentale e quella calcolata di distribuzione a $t = 7$ d e $t = 4$ d che si riferiscono agli ultimi 2 giorni seguiti dell'esperimento batch.

Si nota in entrambi i casi un certo scostamento tra i dati misurati e quelli simulati.

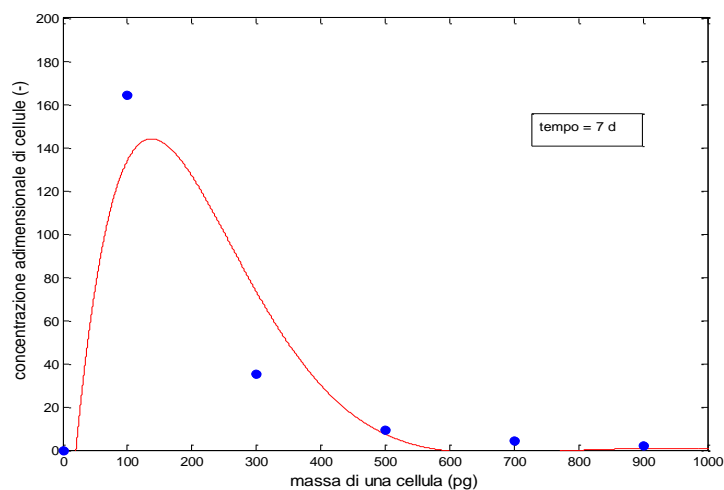


Figura 6.22. Confronto tra il profilo sperimentale (indicato in blu) e quello calcolato (indicato con una linea continua rossa) di distribuzione adimensionale di massa a $t = 7$ d. I dati si riferiscono al primo esperimento batch svolto a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

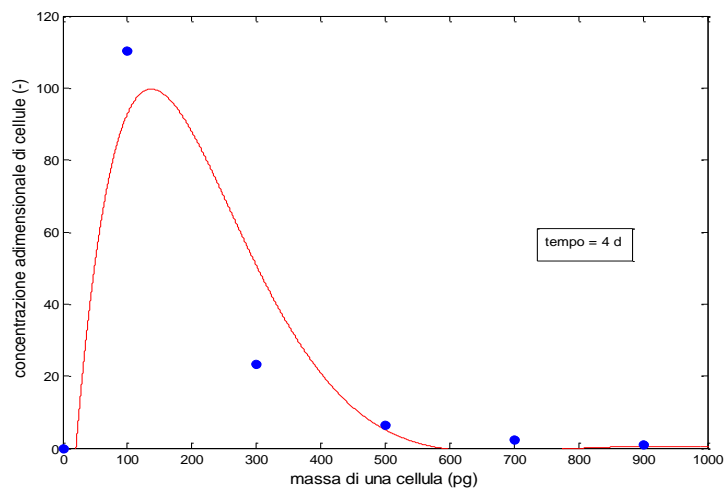


Figura 6.23. Confronto tra il profilo sperimentale (indicato in blu) e quello calcolato (indicato con una linea continua rossa) di distribuzione adimensionale di massa a $t = 4$ d. I dati si riferiscono al primo esperimento batch svolto a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Si presentano infine i grafici 6.24 e 6.25 relativi alla variazione nel tempo delle velocità specifiche di crescita sul peso e sul numero di cellule.

Mediando tra loro i valori di k_B appartenenti alla fase ‘esponenziale’ di crescita microalgale, si ottiene $k_B = 1.29 \text{ d}^{-1}$, come determinato sperimentalmente nel capitolo 3.

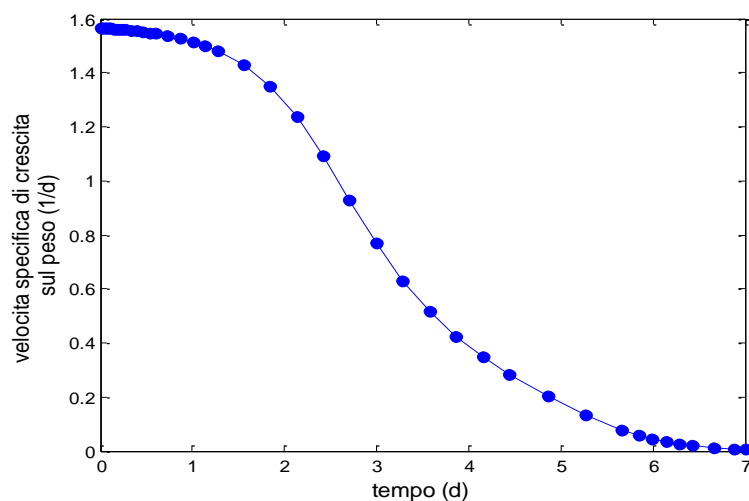


Figura 6.24. Profilo simulato di velocità specifica di crescita sul peso di cellule in reattore batch a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

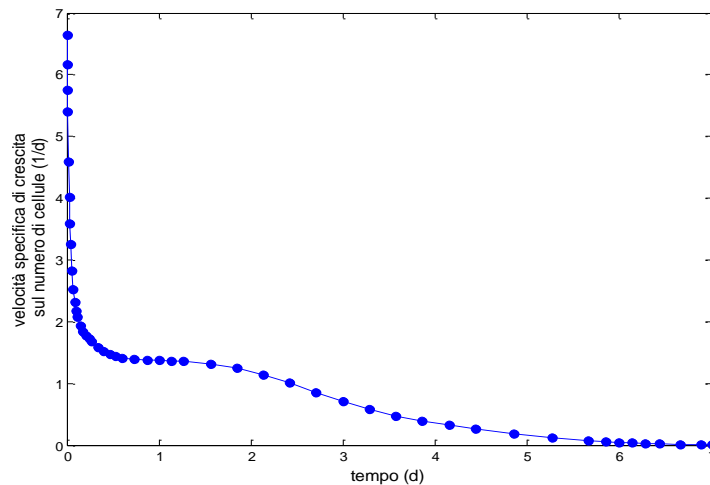


Figura 6.25. Profilo simulato di velocità specifica di crescita sul numero di cellule in reattore batch a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

6.3 Simulazioni del secondo esperimento batch a $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Nelle simulazioni della seconda prova sperimentale svolta a $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ si sono assegnati ai parametri gli stessi valori trovati nel paragrafo precedente. L'unica differenza sta nella condizione iniziale di distribuzione di massa: si fornisce infatti al programma la distribuzione del nuovo inonulo da cui è partito l'esperimento in questione.

Rispetto al primo caso, si riproducono più accuratamente i primi punti misurati e il valore finale di C_B piuttosto che di N (Figure 6.26 e 6.27).

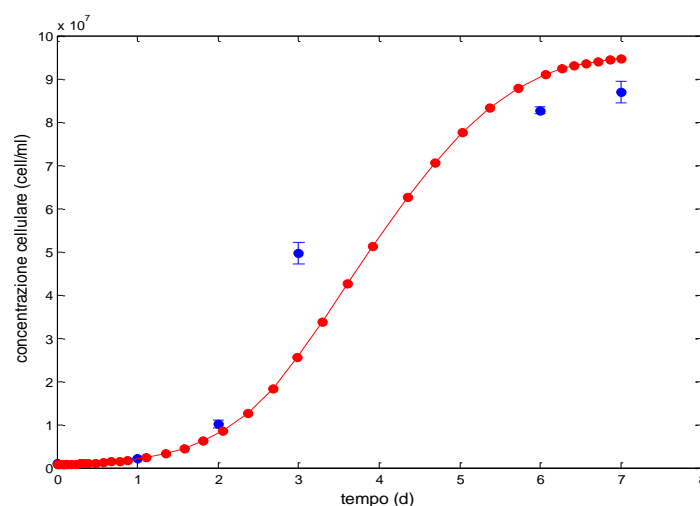


Figura 6.26. Profili sperimentali (indicati in blu) e calcolati (indicati con una linea continua rossa) di concentrazione cellulare. I dati si riferiscono al secondo esperimento batch svolto a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

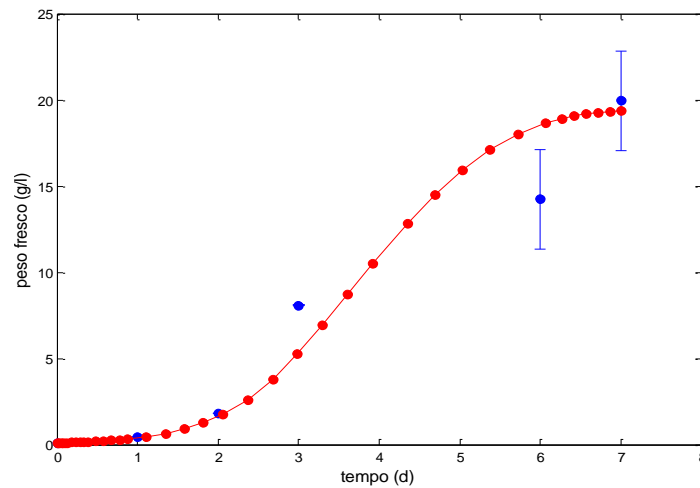


Figura 6.27. Profili sperimentali (indicati in blu) e calcolati (indicati con una linea continua rossa) di peso fresco. I dati si riferiscono al secondo esperimento batch svolto a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Dalla Figura 6.28 appare sempre evidente uno scostamento tra la curva di distribuzione di massa sperimentale e quella calcolata considerando l'ultimo giorno: il profilo simulato risulta traslato verso dimensioni medie delle cellule superiori.

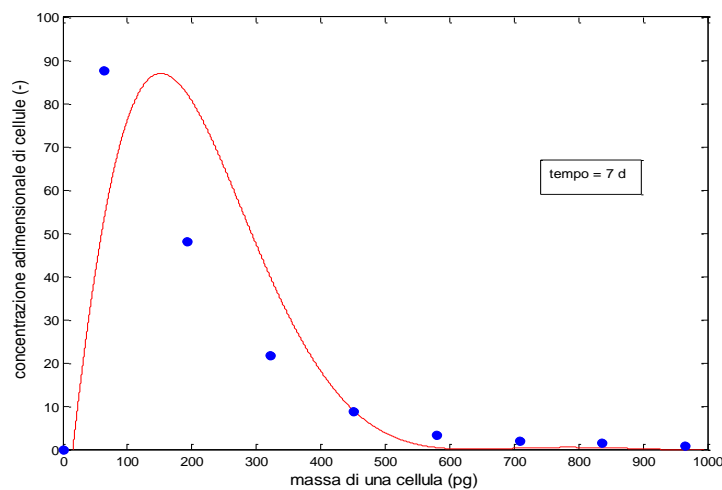


Figura 6.28. Confronto tra il profilo sperimentale (indicato in blu) e quello calcolato (indicato con una linea continua rossa) di distribuzione adimensionale di massa a $t = 7$ d. I dati si riferiscono al secondo esperimento batch svolto a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Mediando tra loro i valori calcolati di k_B appartenenti alla fase 'esponenziale' di crescita microalgale, si ottiene $k_B = 1.49 \text{ d}^{-1}$ (Figura 6.29), risultato simile a quello ottenuto sperimentalmente nel capitolo 3 ($k_B = 1.51 \text{ d}^{-1}$).

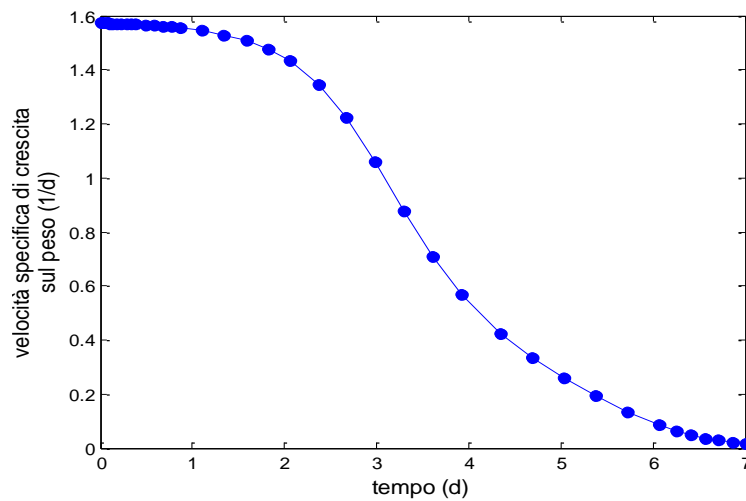


Figura 6.29. Profilo simulato di velocità specifica di crescita sul peso di cellule in reattore batch a intensità di luce di $350 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

6.4 Simulazioni dell'esperimento in continuo a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Nelle simulazioni della dinamica di crescita algale in condizioni continue, viene presa in considerazione solo la dipendenza dalla luce nella cinetica in quanto si alimentano i nutrienti in quantità non limitanti.

Si riproduce la curva di produttività in condizioni stazionarie inserendo i dati sperimentali di peso fresco nell'equazione $r_B = (k_{mean}(t) - k_p) \cdot C_B(t)$ con $k_{mean}(t) = \frac{k_{max}}{H} \cdot \int_0^H \frac{I(t,h)}{k_{mi} + I(t,h)} dh$ e

assegnando ai parametri del modello di Pruvost-Cornet i valori stimati nella prova batch alla stessa intensità di luce incidente. A stato stazionario, infatti, la velocità di produzione microalgale r_B coincide con il rapporto C_B/τ .

In Figura 6.30 si riportano i risultati ottenuti in termini di C_B/τ a confronto con i punti sperimentali: appare evidente che il profilo calcolato sottostima di molto quello sperimentale. Ovviamente la riproduzione risulta ancor meno soddisfacente se si riattribuiscono ai coefficienti le stime di Enzo, 2012 elencate in Tabella 6.1.

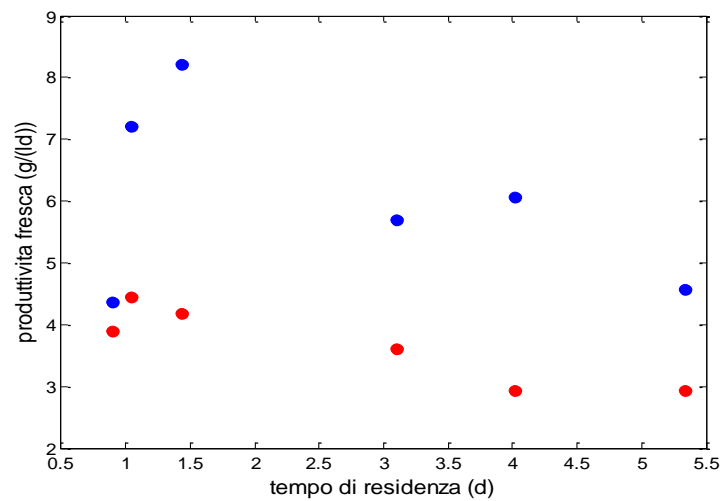


Figura 6.30. Confronto tra i punti sperimentali (indicati in blu) e quelli calcolati (indicati in rosso) di produttività in termini di peso fresco al variare del tempo di residenza e a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Prima di passare alla risoluzione dell'equazione di bilancio di popolazione, si è quindi deciso di modificare nuovamente i parametri del modello cercando di non discostarsi troppo da quelli stimati in condizioni batch a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e prendendo spunto da quelli riportati in Pruvost *et al.* (2010).

Pertanto:

- ρ_m viene posto unitario (si considera che il sistema di coltivazione in continuo abbia un'efficienza di conversione della luce superiore rispetto al caso batch);

- E_a ed bE_s vengono adattati in quanto sono funzione della tipologia e della quantità dei pigmenti, della distribuzione delle dimensioni della microalga e della sua forma, proprietà che possono potenzialmente cambiare con le condizioni operative (ad esempio si è osservato al microscopio che le cellule, coltivate in condizioni continue, tendono ad assumere una forma più ellittica rispetto a quelle in un fotobioreattore batch);

- Φ viene leggermente corretto poichè, da uno studio preliminare di sensitività, è risultato avere un'influenza significativa sul profilo di C_B vs τ .

I valori dei coefficienti che sembrano riprodurre in modo più accurato sia i dati misurati di N che di C_B sono: $E_a = 220 \text{ kg/m}^2$, $bE_s = 5 \text{ kg/m}^2$, $\rho_m = 1$ e $\Phi = 3 \cdot 10^{-9} \text{ kg}/\mu\text{mol}$. Per k_p , mc ed ε vengono mantenute le stime ricavate in condizioni batch e k_{mi} rimane fisso al valore in Tabella 6.1. In tal modo, rispetto al caso batch il coefficiente di assorbimento e la resa quantica sono incrementati mentre il coefficiente di scattering è diminuito.

Nelle Figure 6.31 e 6.32 si confrontano i dati di peso fresco e di conta raccolti in condizioni stazionarie al variare del tempo di residenza con quelli ottenuti dalla risoluzione del bilancio di popolazione.

Le simulazioni sono state eseguite anche a tempi di residenza diversi da quelli studiati per contestualizzare i risultati trovati e formulare delle considerazioni di carattere più generale.

Si può osservare che i profili calcolati tendono a sottostimare quelli sperimentali, in particolare se si considera la concentrazione cellulare.

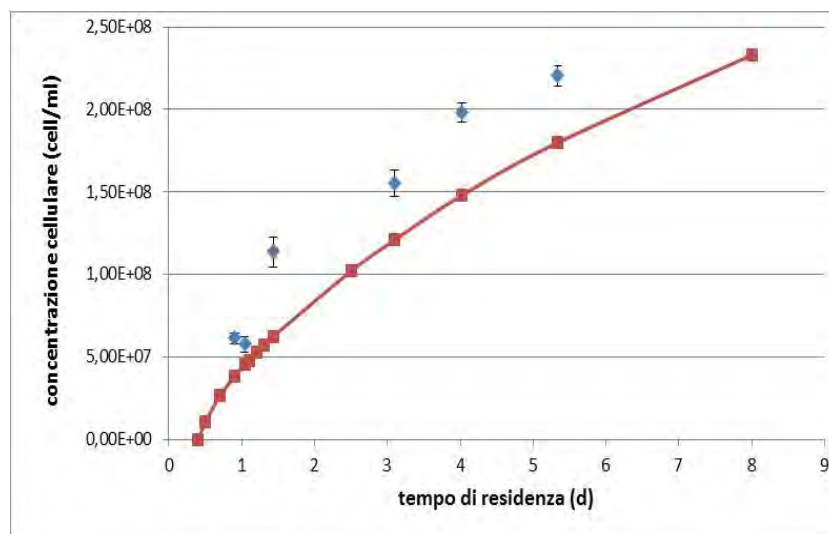


Figura 6.31. Confronto tra i punti sperimentali (indicati in blu) e quelli calcolati (indicati in rosso) di concentrazione cellulare, a stato stazionario al variare del tempo di residenza e a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

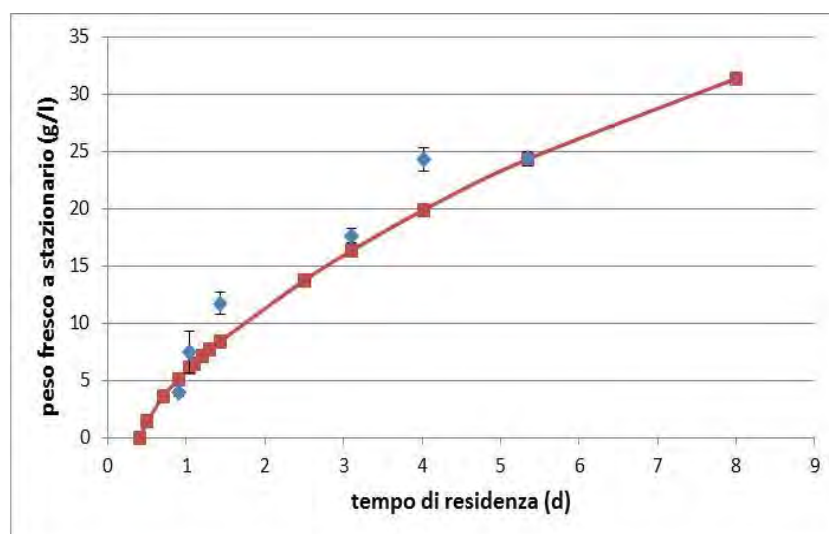


Figura 6.32. Confronto tra i punti sperimentali (indicati in blu) e quelli calcolati (indicati in rosso) di peso fresco, a stato stazionario al variare del tempo di residenza e a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Nelle Figure 6.33 e 6.34 si riportano i risultati in termini di produttività: le curve simulate presentano un punto di massimo in corrispondenza di $\tau \approx 1.3$ d e mostrano il fenomeno del *washout* a $\tau \approx 0.4$ d.

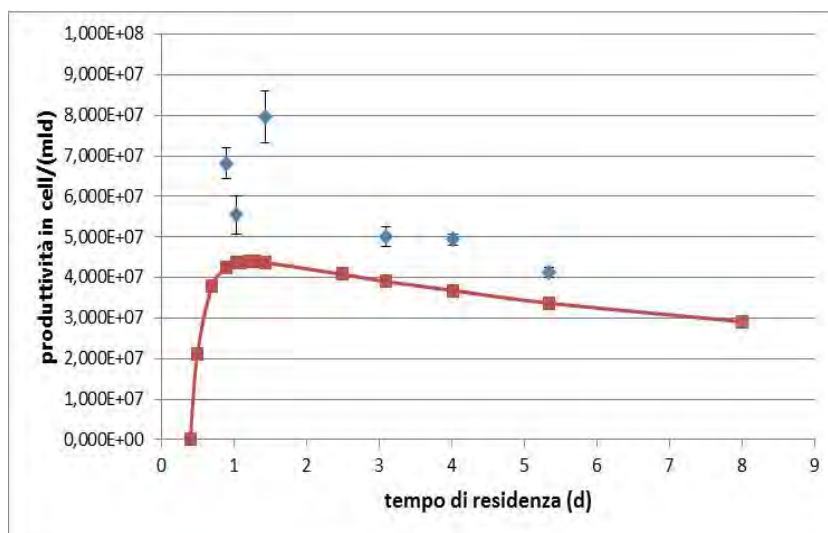


Figura 6.33. Confronto tra i punti sperimentali (indicati in blu) e quelli calcolati (indicati in rosso) di produttività sul numero di cellule, a stato stazionario al variare del tempo di residenza e a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

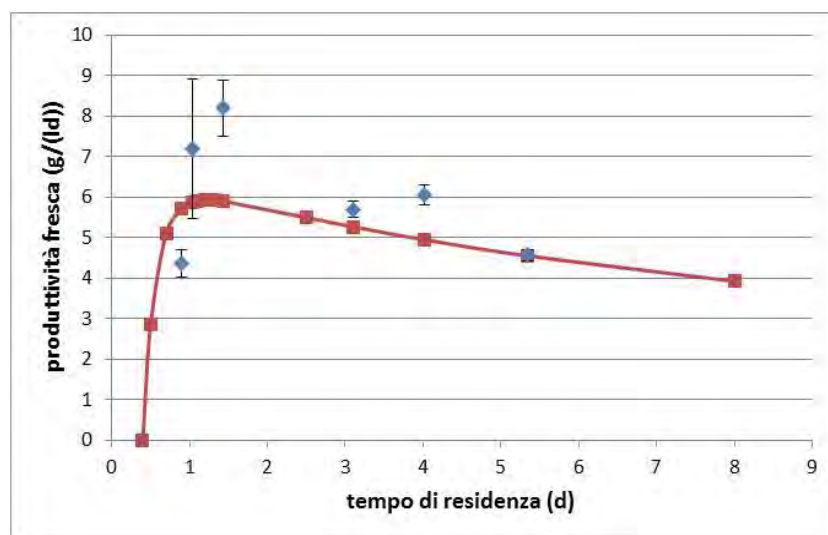


Figura 6.34. Confronto tra i punti sperimentali (indicati in blu) e quelli calcolati (indicati in rosso) di produttività sul peso fresco di cellule, a stato stazionario al variare del tempo di residenza e a intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

È interessante porre, infine, a confronto i profili simulati di irradianza, a stato stazionario, lungo la profondità del sistema di coltura, per ogni tempo di residenza considerato nel capitolo 3.

In Figura 6.35 si può osservare che:

-ai tempi di permanenza più bassi (0.9 e 1.04 d) si registra un valore di *back irradiance* diverso da zero. Una parte dell'energia luminosa fornita al reattore non viene utilizzata per il processo di fotosintesi delle microalghe ma viene dissipata per trasmissione attraverso la lastra del *flat-panel* non esposta alla sorgente di luce;

-ai tempi di permanenza più alti (3.1, 4.02 e 5.34 d) il profilo di intensità si azzerra ad una distanza h inferiore allo spessore H del fotobioreattore. Il fenomeno del *self-shading* è dunque rilevante.

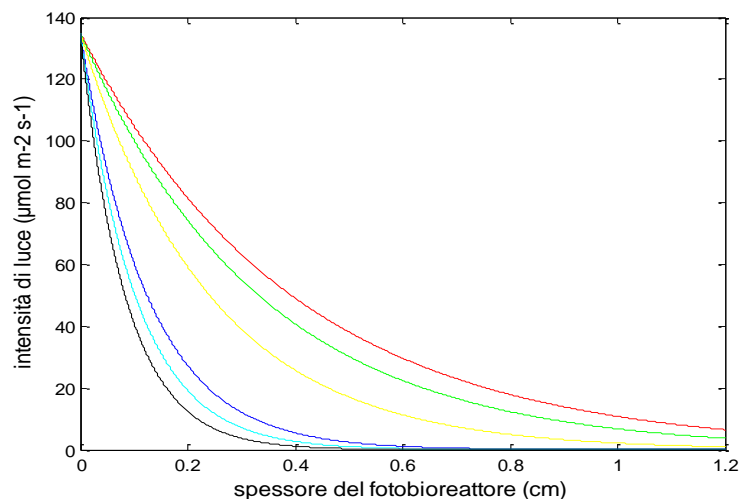


Figura 6.35. Profili simulati di intensità di luce, a stato stazionario, lungo lo spessore del fotobioreattore continuo, parametrizzati con il tempo di residenza (linea continua rossa per $\tau = 0.9$ d, verde per $\tau = 1.04$ d, gialla per $\tau = 1.43$ d, blu per $\tau = 3.1$ d, azzurro per $\tau = 4.02$ d e nera per $\tau = 5.34$ d), a irradianza incidente di $150 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$.

La figura 6.36 mostra separatamente la variazione di irradianza lungo la profondità del reattore al tempo di residenza di 1.3 d, in corrispondenza del quale si registra il valore massimo di produttività di biomassa algale.

Si può notare che non c'è dissipazione della luce attraverso il *flat-panel* né si verifica il fenomeno del *self-shading*.

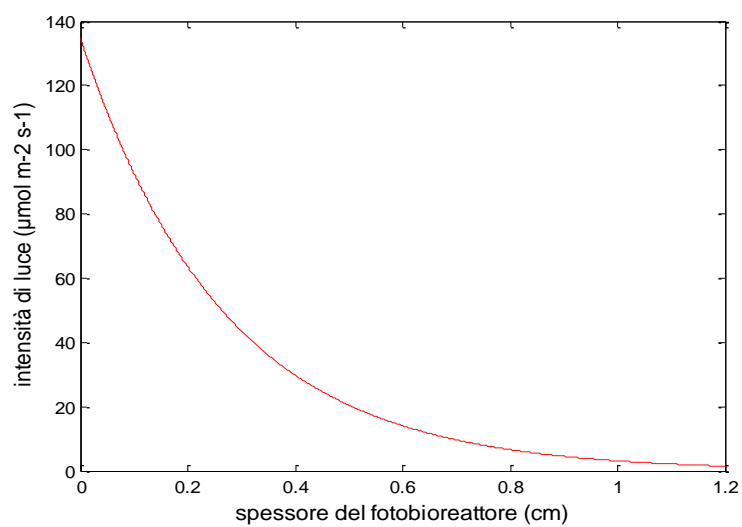


Figura 6.36. Profilo simulato di intensità di luce, a stato stazionario, lungo lo spessore del fotobioreattore continuo, a tempo di residenza di 1.3 d e a irradianza incidente di $150 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$.

6.5 Sintesi

In Tabella 6.3 vengono riassunti i valori che si è deciso di attribuire a tutti i parametri che entrano in gioco nei modelli matematici utilizzati per descrivere i processi di crescita e di divisione di una cellula, i profili di attenuazione della luce all'interno del fotobioreattore e nei bilanci ponderali dei nutrienti (nel caso in cui si considera anche la dipendenza dai substrati nella cinetica di crescita delle cellule).

Tabella 6.3. Valori dei parametri utilizzati nella cinetica di crescita, nel modello di divisione, nel modello di distribuzione della luce all'interno del reattore e nei bilanci ponderali dei nutrienti (azoto e fosforo) per i tre casi studiati (batch a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, batch a $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e continuo a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

	Batch 150	Batch 350	Continuo 150
ρ_m	0.875	0.875	1
Φ	$2.77 \cdot 10^{-9} \text{ kg}/\mu\text{mol}$	$2.77 \cdot 10^{-9} \text{ kg}/\mu\text{mol}$	$3 \cdot 10^{-9} \text{ kg}/\mu\text{mol}$
E_a	$170 \text{ m}^2/\text{kg}$	$150 \text{ m}^2/\text{kg}$	$220 \text{ m}^2/\text{kg}$
bE_s	$40 \text{ m}^2/\text{kg}$	$9 \text{ m}^2/\text{kg}$	$5 \text{ m}^2/\text{kg}$
k_p	0.1 d^{-1}	0.15 d^{-1}	0.1 d^{-1}
k_{mf}	0.27 mg/l	0.27 mg/l	-
y_f	$3.74 \cdot 10^{-4}$	$2.67 \cdot 10^{-4}$	-
y_a	0.016	0.0115	-
k_{ma}	12.1 mg/l	12.1 mg/l	-
k_{mi}	$75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
mc	185 pg	300 pg	185 pg
ε	145 pg	200 pg	145 pg

Conclusioni

In questa tesi è stata studiata, dal punto di vista sperimentale e teorico, la dinamica di crescita delle microalghe in fotobioreattori da laboratorio che operano sia in condizioni batch sia in condizioni continue.

Il modello matematico messo a punto si basa sullo sviluppo di un'equazione di bilancio di popolazione, dove la variabile interna utilizzata per rappresentare in modo completo lo stato fisiologico di una cellula è la massa. Nell'equazione sono stati incorporati i processi di crescita e di nascita/morte dovuti a divisione cellulare. Nella cinetica di crescita è stata considerata sia la dipendenza dai nutrienti (solo in condizioni batch) sia quella dalla luce, in quanto le microalghe sono organismi fotosintetici; al bilancio di popolazione sono stati quindi accoppiati bilanci di materia dei substrati e un modello di distribuzione della luce all'interno della coltura (proposto da Cornet e generalizzato da Pruvost).

Il modello sviluppato è stato validato sulla base dei dati sperimentali. Le analisi sperimentali sono state condotte per approfondire come la produzione algale, a livello non solo macroscopico di concentrazione ma anche microscopico di dimensioni medie delle cellule, sia influenzata dalle variabili operative, in particolar modo dalla luce che viene fornita ai fotobioreattori. I dati raccolti durante le prove sono stati utilizzati per stimare i valori dei parametri del modello.

Le prove sperimentali sono state eseguite in modalità batch a due intensità di luce, 150 e 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, per studiare la crescita algale sia in condizioni di luce limitante che di luce saturante per la crescita stessa. In modalità continua è stata misurata la produzione di biomassa a intensità di luce di 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, impostando tre diversi tempi di residenza (1.04 d, 3.1 d e 0.9 d).

Nelle simulazioni degli esperimenti batch i profili calcolati di concentrazione di biomassa in cell/ml (N) e g/l (C_B) riescono a riprodurre in modo molto soddisfacente quelli sperimentali. Anche lo scostamento tra le distribuzioni sperimentali di massa delle cellule e quelle calcolate rientra nei limiti dell'errore sperimentale e/o numerico.

Nelle simulazioni dell'esperimento in continuo sono stati riprodotti i dati di concentrazione e produttività a stato stazionario ai diversi tempi di residenza studiati. Anche se i risultati numerici tendono a sottostimare le misure sperimentali, i profili di concentrazione e produttività sono accettabili e restituiscono informazioni utili come di seguito:

- il tempo di residenza di *washout* ($\tau = 0.4$ d);
- il tempo di residenza ottimale, in corrispondenza del quale si ottiene la produttività massima con il fotobioreattore utilizzato ($\tau = 1.3$ d).

Sulla base dei risultati raggiunti, si ritiene fondamentale effettuare un'analisi più accurata dei parametri presenti nei modelli matematici per approfondirne il significato fisico e riuscire a rappresentare in modo più soddisfacente la crescita microalgale in condizioni continue; è opportuno infine validare ulteriormente il modello di bilancio di popolazione con nuovi dati sperimentali.

Nomenclatura

A = ampiezza di una classe nella distribuzione di massa (pg)

A_s = assorbanza (-)

b = frazione di *backscattering* (-)

Bh = termine di nascita ((ml pg d)⁻¹)

C = concentrazione di un generico componente (mol/l)

C_a = concentrazione ponderale di azoto (g/l)

C_{ABS} = sezione di attraversamento di assorbimento (m²)

C_B = peso fresco (g/l)

C_{BS} = peso secco (g/l)

$C_{BS-8\%acqua}$ = peso secco effettivo (g/l)

C_f = concentrazione ponderale di fosforo (g/l)

C_n = coefficienti nell'espansione in serie per la funzione di distribuzione W adimensionalizzata (-)

Coa = prezzo dell'olio microalgale (\$/gallone)

Cp = prezzo del petrolio (\$/barile)

C_s = concentrazione ponderale di un generico substrato (g/l)

C_{SCA} = sezione di attraversamento di scattering (m²)

D = velocità di diluizione (1/d)

Dh = termine di morte ((ml pg d)⁻¹)

E_a = coefficiente di assorbimento (m²/kg biomassa secca)

E_s = coefficiente di scattering (m²/kg biomassa secca)

f = distribuzione di massa in termini di frequenza (1/pg)

f_d = fattore di diluizione (-)

f_i = frequenza di cellule nella classe i -esima (1/pg)

$f_{i,mean}$ = frequenza media di cellule nella classe i -esima (1/pg)

H = spessore del reattore (cm)

h = distanza dalla lastra del pannello esposta direttamente alla sorgente di luce (cm)

h_d = distribuzione di massa delle cellule dividenti (1/pg)

I = intensità di luce ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

I_t = intensità di luce trasmessa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

- I_0 = intensità di luce incidente ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
 k = costante di crescita di una singola cellula (1/d)
 k_B = costante di crescita sul peso di cellule (1/d)
 k_{ma} = costante di saturazione per l'azoto (g/l)
 k_{max} = costante di crescita massima di una cellula nelle condizioni di coltura (1/d)
 k_{mean} = costante di crescita di una cellula mediata lungo lo spessore del reattore (1/d)
 k_{mf} = costante di saturazione per il fosforo (g/l)
 k_{mi} = costante di saturazione per la fotosintesi ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
 k_{ms} = costante di saturazione per un generico substrato (g/l)
 k_N = costante di crescita sul numero di cellule (1/d)
 k_p = costante di mantenimento (1/d)
 k_{rel} = costante di rilascio di materiale nello spazio extracellulare (1/d)
 k_{uptake} = costante di uptake dei nutrienti (1/d)
 l = cammino ottico (cm)
 m = massa di una cellula che si divide (pg)
 mc = massa media a cui una cellula si divide (pg)
 N = densità di popolazione (cell/ml)
 n = parametro adimensionale del modello di moser (-)
 n_C = moli di carbonio (mol)
 n_{classi} = numero di classi (-)
 n_{fot} = moli di fotoni (mol)
 n_i = numero di cellule contate nella classe i -esima (-)
 N_{mean} = concentrazione media di cellule (cell/ml)
 n_{mean} = numero medio di cellule contate nei tre quadrati in diagonale nella camera di burker (-)
 OD = densità ottica (-)
 p = distribuzione di massa delle cellule nate (1/pg)
 Q = portata volumetrica di liquido in ingresso al reattore (ml/d)
 r = velocità di crescita di una singola cellula (pg/d)
 r_B = velocità di crescita sul peso di cellule ($\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$)
 r_{mean} = velocità di crescita di una singola cellula mediata lungo lo spessore del reattore (pg/d)
 r_N = velocità di crescita sul numero di cellule ($\text{cell ml}^{-1} \text{d}^{-1}$)
 T = velocità/ probabilità specifica di divisione (1/d)
 t = tempo (d)

Tr = trasmittanza (-)

y_a = resa di azoto (g biomassa fresca/g azoto)

y_f = resa di fosforo (g biomassa fresca/g fosforo)

y_s = resa di un generico substrato (g biomassa fresca/g substrato)

x_{alga} = massa della biomassa secca per una mole di C (g biomassa secca/mol)

x_w = frazione volumetrica di acqua all'interno di una cellula (-)

V = volume di coltura prelevato (ml)

$V_{cellule}$ = volume occupato dalle cellule (ml)

V_{mean} = volume medio di una cellula (μm^3)

V_R = volume di reazione (ml)

W = distribuzione di massa in termini di concentrazione cellulare ($\text{cell ml}^{-1} \text{pg}^{-1}$)

W_i = concentrazione di cellule nella classe i -esima ($\text{cell pg}^{-1} \text{ml}^{-1}$)

$W_{i,mean}$ = concentrazione media di cellule nella classe i -esima ($\text{cell pg}^{-1} \text{ml}^{-1}$)

W_{picco} = concentrazione di cellule in corrispondenza del picco di una distribuzione sperimentale ($\text{cell pg}^{-1} \text{ml}^{-1}$)

z = massa (fresca) di una cellula (pg)

$z_{i,mean}$ = massa media di una cellula nella classe i -esima (pg)

z_{max} = limite superiore in massa di una cellula (pg)

z_{mean} = massa media (fresca) di una cellula (pg)

z_{min} = limite inferiore in massa di una cellula (pg)

$z_{S,mean}$ = massa media secca di una cellula (pg)

z_x = massa critica in corrispondenza della quale una cellula si divide in due identiche tra loro (pg)

- = adimensionale

Lettere greche

Φ_n = funzioni ortonormali associate ai polinomi di Legendre (-)

μ_i = momento adimensionale i -esimo (-)

μ_{if} = momento i -esimo di f (u.d.m variabile a seconda di i)

μ_{iW} = momento i -esimo di W (u.d.m variabile a seconda di i)

ρ = densità di una cellula ($\text{pg}/\mu\text{m}^3$)

ρ_{dm} = densità della biomassa secca (kg/m^3)

ρ_m = massima conversione energetica per la conversione dei fotoni (-)

Φ = resa quantica per lo schema Z della fotosintesi ($\text{kg biomassa secca}/\mu\text{mol}$)

λ = lunghezza d'onda (nm)

ϑ = angolo tra la direzione della radiazione incidente e quella normale alla superficie del reattore ($^\circ$)

$\varepsilon/\sqrt{2}$ = deviazione standard della distribuzione di massa delle cellule dividenti (pg)

ε_λ = coefficiente di estinzione molare ($\text{l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

Θ = velocità/ probabilità specifica di morte (1/d)

$\zeta/\sqrt{2}$ = deviazione standard della distribuzione di massa delle cellule nate (pg)

τ = tempo di permanenza (d)

Riferimenti bibliografici

Benemann, J. (1997). CO₂ mitigation with microalgae system. *Energy Conversion and Management*, 475-479.

Beraldi, M. (2013). “Effetto dei cicli giorno-notte sul funzionamento di fotobioreattori per la produzione industriale di microalghe: sperimentazione e simulazione””, MA tesi, Facoltà di Ingegneria, Dipartimento di Ingegneria Industriale.

Brennan L., P. Owende (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**, 557-577.

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

Cooke R., I. D. Kuntz (1974). The properties of water in biological systems. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, 3, 95-126.

Eakman, J M, A. G. Fredrickson , H. M. Tsuchiya (1966). Statistics and dynamics of microbial cell populations. Chem Eng Prog Symp Series No 69 62:37-49.

Enzo, M. (2012). “Sviluppo di un impianto pilota per la produzione di microalghe: misure di laboratorio e progetto di impianto”, MA tesi, Facoltà di Ingegneria, Dipartimento di Ingegneria Industriale.

Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, A. T. Naseri, N. Montazeri-Najafabady , M. A. Mobasher , and F. Dabbagh (2011). Microalgae Biofuel Potentials (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, **48**, 126-144.

Gris, B., T. Morosinotto, G. M. Giacometti, A. Bertucco, E. Sforza (2013). Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in Photobioreactors: Effects of Light Intensities and Light–Dark Cycles on Growth, Productivity, and Biochemical Composition. *Appl Biochem Biotechnol*.

Gunnar, B., I. Dundas (1984). Bacterial Dry Matter Content and Biomass Estimations. *Applied and environmental microbiology*, **48**, 755-757.

Hjortso, M. (2005). *Population Balances in Biomedical Engineering*. New York: McGraw Hill Prof.

Lagioia G., V. Amicarelli , G. Calabrò, F.A. Tresca (2011). Environmentally innovation in the fuel sector: the role of biofuel from algae. *Journal of Commodity Science, Technology and Quality*, **51**, 119-40.

Li, Y., M. Horsman, N. Wu, C.Q. Lan, N. Dubois-Calero (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnology*, **24**, 815-20.

Malcata, F. X. (2011). Trends in Biotechnology, **29(11)**, 542–549.

Mata, T.M., Martins, A.A. e N.S. Caetano (2009). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**, 217-232.

Mata, T.M., A.C Melo, S. Meireles, A.M Mendes, A.A. Martins, N.S. Caetano (2013). Potential of Microalgae *Scenedesmus obliquus* Grown in Brewery Wastewater for Biodiesel Production. *Chemical engineering transactions.*, **32**.

Nigam P.S., A. Singh (2010). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, **37**, 52-68.

Pottier L., J. Pruvost, J. Deremetz, J.F. Cornet, J. Legrand, C.G. Dussap (2005). A Fully Predictive Model for One-Dimensional Light Attenuation by *Chlamydomonas reinhardtii* in a Torus Photobioreactor. Wiley InterScience.

Pruvost, J., G. Van Vooren, B. Le Gouic, A. Couzinet-Mossion, J. Legrand (2011). “Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application”. *Bioresource Technology*, **102**, 150-158.

Ramkrishna, D. (2014). Population Balance Modeling: Current Status and Future Prospects. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, **5**, 123–46

Ramkrishna, D. 2000. Population balances. Theory and applications to particulate systems in engineering. San Diego: Academic Press.

Ramos Tercero E. A., E. Sforza, M. Morandini, A. Bertucco (2013). Cultivation of *Chlorella protothecoides* with Urban Wastewater in Continuous Photobioreactor: Biomass Productivity and Nutrient Removal. *Appl Biochem Biotechnol*, **172**, 1470–1485.

Richmond, A., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Science, 2004.

Solana M., C.S. Rizza, A. Bertucco (2014). Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *J. of supercritical fluids*, **92**, 311-318

Strumendo M., H. Arastoopour (2008). Solution of PBE by MOM in finite size domains. *Chemical Engineering Science*, **63**, 2624– 2640.

Thurmond W., *Algae 2020: Vol. 2: Global Biofuels, Drop-In Fuels, Biochems Market and Forecasts*, *Emerging Markets Online*, Houston (US), 2011.

Tsuchiya, H. M., A. G. Fredrickson, R. Aris (1966). "Dynamics of Microbial Cell Populations," *Adv. Chem. Eng.*, **6**, 125-206.

Siti internet visitati:

www.enea.it

www.eia.doe.gov/oiaf/ieo/index.html

www.epa.gov/climatechange

http://ec.europa.eu/energy/renewables/reports/reports_en.htm

http://www.italruu.it/files/fotosintesi_clorofilliana_5.pdf

www.acquacoltura.jonica.it

http://deltafarmpress.com/mag/farmin_commodities_future_algae/index.html

<http://curba.racine.ra.it/local/biologia/ipertesto%20ridotto/curvacrescita.htm>