



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA DI INGEGNERIA
DIPARTIMENTO DI PRINCIPI E IMPIANTI DI INGEGNERIA CHIMICA
“I. SORGATO”

TESI DI LAUREA IN INGEGNERIA CHIMICA

CLASSE 10 INGEGNERIA INDUSTRIALE

(509/99)

**INFLUENZA DELL'ILLUMINAZIONE
SULLA CRESCITA DI *Nannochloropsis salina*
PER LA PRODUZIONE DI OLIO A SCOPO ENERGETICO.**

Relatore: Prof. Alberto Bertucco

Correlatore: Dott.ssa Eleonora Sforza

Laureando: Akanbi Samson O. A. Jnr.

ANNO ACCADEMICO: 2010-2011

INDICE

INTRODUZIONE	3
Capitolo 1- Le Microalghe	4
1.1 Le microalghe e vantaggi di utilizzo	4
1.2 Metabolismo e sistemi di coltura	5
1.3 Fotobioreattori	6
1.4 Modelli cinetici di crescita microalgale in funzione dell'intensità luminosa	10
1.5 Specie algali di interesse	14
Capitolo 2- Scopo della tesi	15
Capitolo 3- Materiali e metodi	16
3.1 Caratteristiche morfologiche dei ceppi algali studiati e condizioni e mezzo di coltura.	16
3.2 Analisi della crescita	16
3.3 Determinazione contenuto di lipidi	17
3.4 Correlazione tra intensità di fluorescenza e percentuale di lipidi nel campione	18
3.5 Apparecchiature	18
3.6 Calcolo della velocità di crescita	21
Capitolo 4- Risultati e discussione	22
4.1 Confronto crescita a diverse intensità – illuminazione costante e continua	22
4.2 Contenuto lipidico	25
4.3 Confronto con illuminazione pulsata	26
4.4 Discussione	29
Conclusioni	31
Bibliografia	32

INTRODUZIONE

Questa tesi nasce al seguito di un periodo di tirocinio svolto presso il Dipartimento di Principi e Impianti di Ingegneria Chimica e ha come scopo l'analisi dell'influenza della luce sulla crescita di *Nannochloropsis salina*, una microalga studiata per la produzione di olio a scopo energetico.

Quindi, l'obiettivo principale della tesi è quello di studiare le condizioni migliori per la crescita della microalga e per la produzione di olio, variando l'intensità di illuminazione, sia nel caso di illuminazione continua che nel caso di illuminazione intermittente al fine di migliorare la crescita delle colture algali.

Nella prima parte della tesi (capitolo 1), viene fatto una breve descrizione delle microalghe, del loro metabolismo e dei sistemi di coltura, modelli cinetici e vantaggi legati al loro impiego. Inoltre, vengono descritte le principali tipologie di impianti per la crescita delle microalghe.

Il capitolo 2 riassume lo scopo della tesi.

Le tecniche e i materiali utilizzati sono riportati nel capitolo 3.

Il capitolo 4 riporta i risultati ottenuti, che vengono commentati e discussi.

Un ringraziamento particolare va al Prof. Alberto Bertucco e la Dott.ssa Eleonora Sforza, per la disponibilità e il sostegno dato nella realizzazione di questa tesi.

Capitolo 1

LE MICROALGHE

1.1 Le microalghe e i vantaggi di utilizzo

Le microalghe, insieme ai cianobatteri, sono organismi unicellulari fotoautotrofi, che a partire da CO₂ ed energia radiante del sole, producono zuccheri per il proprio metabolismo energetico e biosintetico, ed ossigeno che in parte usano con la respirazione ed in parte rilasciano nel mezzo esterno. Negli ambienti acquatici, esse sono i produttori primari e costituiscono un importante anello della catena trofica degli ecosistemi marini, garantendo il flusso di materia e energia necessario per il mantenimento degli organismi eterotrofi.

Le alghe hanno cellule di tipo procariotico ed eucariotico, presentano un diverso corredo di pigmenti fotosintetici (soprattutto clorofilla e carotenoidi), e possiedono sostanze di riserva e componenti parietali del tutto specifici, utilizzati come elementi utili per stabilire la loro posizione sistematica.

Le microalghe presentano velocità di crescita, in presenza di nutrienti quali i sali minerali, luce e anidride carbonica, che può essere notevolmente maggiore di quella delle piante terrestri. Ciò rende le microalghe particolarmente interessanti per l'assorbimento di CO₂ atmosferica, al fine della produzione di biocombustibili; dopo la fase di estrazione di olio, la parte rimasta della biomassa algale può essere trasformata in etanolo, metano oppure utilizzata per la produzione di fertilizzante organico (grazie all'alto contenuto dell'azoto e fosforo), o semplicemente bruciato per la cogenerazione di energia (Liu Y et al., 2008).

Le microalghe possono essere utilizzate anche per la depurazione di reflui civili e agro-zootecnici, con eliminazione di composti come NH₄⁺, NO₃⁻ e PO₄⁻, che possono essere utilizzati come componenti per la crescita delle alghe e per la produzione di biomolecole di interesse commerciale (Wang B et al., 2008).

Microalghe di varie specie vengono già prodotte e messe sul mercato in vari Paesi, dove sono utilizzate per ottenere integratori alimentari, mangimi, pigmenti, acidi grassi ω3, biomasse per acquacoltura. Trovano impiego anche nelle industrie farmaceutica, cosmetica e nella prevenzione di inquinamento ambientale. La coltivazione delle microalghe avviene in bacini, vasche, fotobioreattori o fermentatori con tecniche e volumi diversi, a seconda della specie coltivata e delle particolari applicazioni. Ancora in fase sperimentale sono le coltivazioni di specie per il risanamento di reflui contaminati da agenti xenobiotici e metalli pesanti e per la produzione di biodiesel e idrogeno. Le ricerche in tal senso sono volte a conseguire elevate portate di produzione con rendimenti prevedibili e programmabili, tali da incidere significativamente sui fabbisogni di carburanti per l'autotrazione ed il trasporto aereo. (Chisti, 2007).

1.2 Metabolismo e sistemi di coltura

Le colture microalgali possono avere diversi tipi di metabolismo per la crescita; che può essere autotrofa, eterotrofa, mixotrofa e fotoeterotrofa, e il metabolismo è mutamento sottoposto a variazioni, in risposta al cambiamento delle condizioni ambientali.

Gli organismi che crescono in condizione di autotrofia sono organismi che ottengono l'energia attraverso l'assorbimento di energia luminosa per la riduzione di CO₂ per ossidazione dei substrati, soprattutto acqua, con il rilascio di O₂. La maggior parte delle alghe appartengono a questa categoria, anche se molte richiedono minime quantità di composti organici per la crescita, come ad esempio le vitamine.

Per eterotrofia s'intende la condizione di alcuni organismi animali o vegetali, che necessitano di fonti di carbonio organico per sostenere la propria crescita. Alcune microalghe sono in grado di assimilare e quindi utilizzare carbonio organico come fonte di energia per la crescita al buio. La crescita eterotrofa risolve problemi tecnici e fisiologici legati alla presenza e alla distribuzione della luce e della CO₂ associate alla crescita in autotrofia. Offre quindi la possibilità di accrescere la concentrazione cellulare e la produttività. La crescita mixotrofica, invece, è definita come un regime di crescita durante il quale la CO₂ e il carbonio organico vengono assimilati simultaneamente, operando quindi sia il metabolismo fotosintetico che la respirazione cellulare. Di norma, la velocità di crescita di cellule cresciute in mixotrofia è approssimativamente la somma delle velocità di crescita delle colture eterotrofe e autotrofe. I vantaggi dell'eterotrofia, come l'alta concentrazione e produttività, sono applicabili anche alla mixotrofia. Inoltre la capacità delle microalghe di crescere utilizzando le due vie metaboliche è unica, e fornisce numerosi vantaggi. La foto-eterotrofia, conosciuta anche come foto-assimilazione o foto-metabolismo, descrive un metabolismo in cui è necessaria la presenza di luce per utilizzare i composti organici come fonte di carbonio.

Non soltanto il carbonio (sotto forma di CO₂ oppure come carbonio organico) è necessario per il metabolismo delle microalghe: anche vitamine, sale e altri nutrienti (azoto e fosforo) sono fondamentali per la crescita algale, così come risulta importante l'equilibrio tra i seguenti parametri: ossigeno, anidride carbonica, pH, temperatura, e l'intensità luminosa (Chojnacka K et al., 2004).

Le colture microalgali si suddividono in colture di laboratorio e colture massive, le prime per preservare in purezza i differenti ceppi ed assicurare volumi di inoculo per le colture massive, le seconde per raggiungere quantità e qualità adeguate alle esigenze produttive (Rodolfi I, 2009).

Le colture in laboratorio, oltre al mantenimento e alla caratterizzazione delle specie algali, consentono la ricerca di base sulle microalghe.

Le colture massive sono, in genere, caratterizzate da elevate concentrazioni, per cui le condizioni di coltivazione devono essere strettamente controllate per consentire un buon sviluppo del fitoplancton. Le tecniche variano a seconda dell'uso finale della biomassa:

variano sostanzialmente i volumi di coltivazione e le modalità di coltura (sistemi chiusi o aperti). Si dà inizio alle colture in piccoli volumi per arrivare ai volumi maggiori di utilizzo (da 20-30 L a veri e propri bacini di crescita) tramite passaggi in volumi crescenti. Questa tecnica permette la riduzione dei tempi di sviluppo in quanto le colture vengono a trovarsi sempre nella fase di crescita esponenziale, garantendo un controllo più accurato ed uno sviluppo più programmabile. Una volta raggiunti i volumi richiesti, le alghe possono essere coltivate in modo semi-continuo, continuo o in discontinuo. Il modo semi-continuo consiste nel mantenere attiva la coltura per lunghi periodo di tempo, prelevandone ad intervalli prestabiliti il 20-30% e riportando a volume con mezzo acquoso arricchito. Quando prelievo e ricambio sono continui, si parla di modo continuo. Queste tecniche tuttavia espongono le colture a maggiori rischi d'inquinamento.

La tecnica di coltivazione di tipo discontinuo consiste nel portare la coltura alla massima concentrazione possibile (che varia con la specie coltivata), e nell'utilizzo completo in una sola volta della biomassa ottenuta.

Rispetto alla tecnica di coltivazione delle alghe in sistemi continui, le colture coltivate in sistemi discontinui risultano più semplice, e garantiscono una maggiore purezza della popolazione algale ma richiedono una rigorosa programmazione della coltivazione.

1.3 Fotobioreattori.

La coltivazione delle microalghe può essere fatto in due tipi di sistemi: in sistemi aperti (open ponds), quali laghi o stagni o in sistemi chiusi, chiamati fotobioreattori. Un bioreattore può essere definito come un sistema in cui avviene reazioni mediate da microorganismi o in cui si coltivano microorganismi, così come il fotobioreattore è un reattore in cui gli organismi fototrofi, microbici, cellule algali o vegetali sono coltivati o utilizzati per effettuare una reazione fotobiologica. È da notare che quest'ultima definizione può essere riferita sia a una coltura in sistemi chiusi che in aperti. (Chisti Y, 2002).

La scelta del sistema di coltura da utilizzare deve basarsi su diversi fattori: il terreno di coltura, la quantità d'acqua, le sostanze nutritive, la temperatura, il consumo energetico e il prodotto finale che si vuole ottenere. In particolare, la scelta dei sistemi di coltura su larga-scala deve valutare le loro proprietà, il loro rendimento effettivo e la possibilità di trasferire gli stessi sistemi per piccola produzione, su larga scala.

I fotobioreattori sono sistemi flessibili che possono essere ottimizzati in funzione delle caratteristiche biologiche e fisiologiche delle specie algali coltivate, che permettono di coltivare le specie di alghe che non possono essere coltivate in vasche aperte. Un fotobioreattore deve garantire al contempo elevate aree specifiche e semplicità costruttiva così da rendere minimi i costi di impianto, date le elevate superfici richieste (Tredici MR, 2004).

Inoltre bisogna tenere conto dell'effetto del mescolamento per garantire lo scambio di materia. Infatti, le microalghe necessitano di un grado di mescolamento che deve essere

assicurato limitando i costi energetici e moderando la complessità dell'impianto. Tale mescolamento, nel caso di un reattore flat-plate viene garantito dall'insufflazione di aria arricchita in CO₂. Quindi, a differenza dei sistemi aperti, i fotobioreattori offrono un miglior controllo sulla condizione di coltura e parametri di crescita (pH, temperatura, miscelazione, CO₂, O₂), evitando il fenomeno di evaporazione e contaminazione, e in particolare consentono di ridurre la perdita di CO₂ e di raggiungere una densità di microalghe (o concentrazione cellulare) superiore. Nonostante tutti i vantaggi sopraelencati, i fotobioreattori sono soggetti a diversi svantaggi che devono essere considerati e risolti. Le loro principali limitazioni sono: surriscaldamento, quindi richiedono un sistema di raffreddamento (ombreggiamento, spruzzi con acqua nebulizzato), e rischio di accumulo dell'ossigeno prodotto per fotosintesi, che richiede sistemi di eliminazione di questo gas e quindi un maggior costo di impianto.

● **Fotobioreattori a piastre**

I fotobioreattori a piastre sono composti da piastre molto vicine tra loro (tipo *flat plate*) e tale disegno consente di ottenere sia un'elevata efficienza di utilizzo della luce solare, sia un elevato rapporto superficie-volume (Fig.1.1). Il maggiore vantaggio è dovuto alla possibilità di uno scambio gas-liquido, aperto verso l'esterno, limitando l'accumulo dell'ossigeno nel sistema. La stessa zona però non permette un assoluto controllo delle contaminazioni dall'esterno.

La temperatura può essere regolata mediante spruzzi di acqua dall'esterno. Un reattore con questa configurazione è stato utilizzato per la crescita di *Nannochloropsis* ottenendo produttività di 0.85 g/L d (Carvalho, 2006).

In generale il vantaggio principale dei fotobioreattori a piastre è la loro elevata produttività e la distribuzione uniforme della luce. Inoltre la geometria di questi reattori permette l'orientazione a seconda della posizione del sole in modo da ottenere la migliore efficienza in termini di radiazione incidente (Carvalho, 2006).



Figura 1.1 fotobioreattori a piastre

(http://www.scubla.it/pagine_impianti/fotobioreattore.php)

● Fotobioreattori elicoidali

I fotobioreattori elicoidali sono composti da tubi di plastica flessibile avvolti in una struttura circolare (Fig.1.2). La configurazione più utilizzata è il cosiddetto *biocoil*, composto da tubi in polietilene da 3cm di diametro accoppiati ad un'unità per lo scambio gas-liquido ed un sistema di scambio di calore, (il fluido è movimentato da pompa di centrifuga).

Attualmente questo è uno dei sistemi che fornisce i risultati migliori per effetto dell'elevato rapporto superficie/volume e inoltre presenta un limitato ingombro. Un sistema di luci installato all'interno assicura il controllo dell'intensità luminosa, compensando l'angolo di incidenza non ottimale dei raggi solari (Carvalho, 2006).

Lo *scale-up* dei reattori elicoidali è molto semplice e si basa sull'aumento delle spire. L'uso di una pompa centrifuga per la movimentazione può determinare un aumento dello sforzo di taglio a cui è sottoposta la coltura e quindi limitare la produttività. Una modifica proposta da (Travesio, 2006) utilizza un air-lift al posto di una pompa centrifuga, con lo scopo di diminuire i danni causati alle cellule.



Figura 1.2 fotobioreattore elicoidale(wongawetlands.nsw.gov.au/news/2007442352.htm).

● Fotobioreattori a tubo verticale

Esempi di reattori tubolari verticali sono gli *air lift* e le colonne a bolle, generalmente in polietilene, in vetro o altri materiali che siano sufficientemente trasparenti in modo da assicurare una buona penetrazione ai raggi luminosi. (si veda la figura 1.3).

L'aria è insufflata dal fondo in modo da assicurare un mescolamento adeguato, una sufficiente alimentazione di CO₂ e una rimozione efficiente dell'ossigeno. Spesso si utilizzano sacchi in plastica con il vantaggio di avere bassi costi, elevata trasparenza e sufficiente sterilità nella fase di avviamento, garantita dalle temperature elevate raggiunte nella fase di estrusione del film. In letteratura i volumi utilizzati sono dell'ordine di 20-50L; per quanto riguarda lo scale-up, l'esperienza indica che la produttività in questo tipo di reattore è inversamente proporzionale al volume del sacco.

In alcune configurazioni la temperatura è controllata mediante un fluido di raffreddamento che scorre attraverso un'intercapedine, mentre la luce è data dall'interno.

Per i reattori tubolari verticali il diametro deve essere relativamente grande, se confrontato con i fotobioreattori orizzontali, in modo da assicurare un sufficiente volume e scambio di materia gas-liquido. Queste specifiche d'altro canto diminuiscono il rapporto superficie/volume e quindi l'efficienza di utilizzo della luce.



Figura 1.3 fotobioreattori tubolari verticali di tipo air lift.

(http://www.scubla.it/pagine_impianti/fotobioreattore.php)

• Fotobioreattori a tubi orizzontali

I reattori a tubi orizzontali sono generalmente costituiti da più tubi montati in serie e in parallelo su rastrelliere, sono adatti per trattare elevati volumi e non sono sensibili alle contaminazioni (Fig.1.4). In ogni caso i tubi devono essere periodicamente svuotati e sanificati.

In letteratura si trova un reattore tubolare orizzontale sviluppato da Torzillo (Carvalho, 2006), con un diametro dei tubi di 14 cm. La movimentazione è assicurata mediante una pompa a diaframma e il trasferimento gas-liquido avviene nelle connessioni con i tubi.

Il volume totale è di 8000 L posto su una superficie di 80 m², ma si nota che l'efficienza fotosintetica non aumenta in modo consistente.

Uno dei principali problemi incontrati è il controllo della temperatura, risolto mediante spray di acqua. Gudin e Chaumont (Carvalho, 2006) hanno sviluppato un reattore con una capacità di 7000 L con una produttività di 36 g/m² d. Lo scambio gas-liquido avviene in un'unità dedicata e la coltura viene pompata tra la zona di raccolta e quella di scambio con la CO₂. Uno dei principali problemi riscontrati è il costo elevato e la fragilità dei tubi.



Figura 1.4 fotobioreattori tubolari orizzontali.

1.4 Modelli Cinetici di crescita microalgale in funzione dell'intensità luminosa

La questione principale nella coltivazione di massa di microalghe foto-autotrofe riguarda l'utilizzo efficace della luce per la produttività foto sintetica delle cellule di biomassa e di metaboliti secondari. Questo è particolarmente vero per la coltivazione di massa di microalghe all'aperto, in cui l'uso efficace dell'energia solare è una pietra fondamentale su cui si basano le prospettive della biotecnologia in vasto campo.

L'energia luminosa ricevuta da parte di microrganismi foto-autotrofi è una funzione della densità di flusso di fotoni che arriva sulla superficie della coltura. Le cellule assorbono solo una frazione del flusso di fotoni, la dimensione effettiva delle quali è condizionato da una serie di fattori; tra cui la densità delle cellule, le proprietà ottiche delle cellule, lunghezza del percorso ottico del reattore e il tasso di coltura di miscelazione. I fotoni che non sono assorbito da centri di reazione fotosintetica delle cellule si dissipano in gran parte sotto forma di calore o possono essere riflessi. Come regola generale, le colture di massa di microalghe riflettono solo una piccola o piccolissima frazione dei fotoni incidenti su una superficie di coltura: la luce riflessa da una sospensione cellulare di *Spirulina* sp. nella gamma di 400-670nm è stata stimata ad essere inferiore al 2% (Iehana 1987).

Da momento che praticamente tutti i fotoni di alta densità di flusso possono essere catturati da colture di elevata densità cellulare, la densità delle cellule continuerà ad aumentare in modo esponenziale finche tutti i fotoni disponibili vengono assorbiti.

Una volta che questa densità cellulare viene raggiunta, la massa delle cellule si accumula in costante ritmo lineare fino ad avere luce per cellule o qualche substrato nel mezzo di coltura diventa troppo basso, oppure in alternativa, qualche attività inibitoria arresta la condizione di crescita delle cellule.

• Modello cinetico

Il seguente modello è stato preso dal libro “Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology” cap. 8.

Il parametro più importante è quello che descrive l'intensità media di luce all'interno di un reattore, da cui si calcolo l'irraggiamento medio disponibile per le singole cellule nella coltura può essere stimato; è stato chiarito in uno studio di Molina Grima et al. (Molina Grima et al. 1995, 1999) e Acie'n-Fernàndez et al. (1997) che hanno proposto un modello cinetico. Questo è un concetto più fondamentale e utile per la comprensione degli effetti della luce sulle microalghe coltivate in fotobioreattori: dal momento che la penetrazione della luce è fortemente limitata a causa della densità cellulare elevata, solo l'irradianza media (piuttosto che l'irradianza caduta sulla zona di coltura illuminata) fornisce un significato quantitativo della risposta della coltura ad alto irraggiamento.

Il modello proposto è basato sul calcolo di un'intensità luminosa I_{av} media nel volume di reazione V :

$$I_{av} = \frac{1}{V} \int_V I dV . \quad (1.1)$$

Nel caso in questione, l'estinzione della luce viene studiata lungo la sola direzione z , per cui l'intensità media diviene:

$$I_{av} = \frac{1}{h} \int_h I(z) dz, \quad (1.2)$$

Dove h rappresenta la dimensione verticale del reattore (m).

L'equazione per il calcolo della costante cinetica è:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{I_{av}^{\left(\frac{b+c}{I_{z=0}}\right)}}{\left[I_k \left(1 + \left(\frac{I_{z=0}}{K_1} \right)^a \right) \right]^{\left(\frac{b+c}{I_{z=0}}\right)} + I_{av}^{\left(\frac{b+c}{I_{z=0}}\right)}} \quad (1.3)$$

Dove μ_{\max} è la velocità massima di crescita (h^{-1}) ed I_k ($\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) è una costante specifica di intensità che rappresenta la I_{av} in grado di dare una velocità di crescita pari a metà di quella massima; con a , b e c parametri adimensionali e variano al seconda del tipo di alga considerato.

Le unità di misure dei parametri utilizzati nell'equazione 1.3 sono riportati nella tabella 1.1

Tabella 1.1. Riassunto dei parametri dell'equazione 1.3.

Parametri	Unità
μ_{\max}	h^{-1}
I_k	$\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
K_i	$\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
a	Adim
b	Adim
c	Adim

Si deve stimare anche il valore del coefficiente di assorbimento della luce, a partire dal valore dell'intensità luminosa; dal momento che l'intensità di radiazione diminuisce in modo esponenziale in tutto il percorso ottico e l'intensità di radiazione sul bordo del lato illuminato del reattore è denotato con I_0 , allora l'intensità ad una distanza x dal lato illuminato del reattore piatto è dato da:

$$I(x) = I_0 e^{-\mu x} \quad (1.4)$$

dove μ in questo caso è il coefficiente di assorbimento, (se x è misurato in centimetri (cm), allora il coefficiente di assorbimento μ è misurato in cm^{-1}), come dimostrato da Zarmi (2002). La radiazione media è data da una media di valore di $I(x)$ su tutto il percorso ottico ($0 \leq x \leq L$):

$$I_{\text{av}} = \frac{1}{L} \int_0^L I(x) dx = \frac{I_0}{L} \int_0^L e^{-\mu x} dx = I_0 \frac{1 - e^{-\mu L}}{\mu L} \quad (1.5)$$

Per densità molto bassa, il coefficiente di assorbimento è molto basso, ovvero, $\mu L \ll 1$, e l'ultima espressione può essere approssimata mediante questa equazione;

$$I_{\text{av}} \cong I_0 \left(1 - \frac{1}{2} \mu L \right) \quad (1.6)$$

L'equazione 1.6 è valida per basse densità cellulari.

Per densità molto elevata, il coefficiente di assorbimento è grande, ovvero, $\mu L \gg 1$, e l'espressione esponenziale per l'intensità di radiazione media è così piccola che può essere trascurata, fornendo:

$$I_{\text{av}} \cong \frac{I_0}{\mu L} \quad (1.7).$$

In molti casi, il coefficiente di assorbimento varia linearmente con la densità della coltura:

$$\mu = \alpha \rho \quad (1.8)$$

dove ρ è la densità della coltura, (misurata in gL^{-1}) e α è un coefficiente di proporzionalità, che deve essere determinato empiricamente. Nella coltura di elevata densità, μ può anche avere una dipendenza non lineare dalla densità.

$$\mu = \alpha \rho + \beta \rho^2 \quad (1.9)$$

dove β è un'altro parametro che deve essere determinato empiricamente.

Per avere un'idea di come l'intensità di radiazione media varia con la densità della coltura, si utilizza l'approssimazione lineare ($\mu = \alpha \rho$). Quindi l'espressione per l'intensità media diventa:

$$I_{\text{av}} = I_0 \frac{1 - e^{-\alpha \rho L}}{\alpha \rho L} \quad (1.10)$$

Si nota che nell'ultima espressione l'intensità media dipende solo dal valore della densità superficiale (ρL).

Fino a quando l'intensità di radiazione media rimane più o meno costante all'aumentare dell'irraggiamento, la coltura sta rispondendo bene all'aumento dell'irraggiamento.

Appena si ha l'aumento dell'intensità di radiazione media, che corrisponde alla quantità di luce disponibile per ogni cellule, anche se le cellule sono esposte ad un irraggiamento eccessivo, è da notare che, per un valore di densità superficiale relativamente piccola, l'intensità di radiazione media è solo una piccola frazione dell'intensità entrante, I_0 (Gitelson et al., 2000).

Consideriamo per esempio, una densità superficiale pari a 10gm^{-2} , per un reattore con percorso ottico $L = 1\text{cm}$, che corrisponde ad una densità volumetrica di 1gL^{-1} . Se la radiazione all'ingresso è $2000\mu\text{molim}^{-2}\text{s}^{-1}$, il valore: $I_0 = I_{av}/I_0$ è basso, circa 0.083 e il tempo di reazione al buio (nel caso di luce intermittente) dovrebbe essere di conseguenza lungo (è stimato dell'ordine di 10ms).

1.5. Specie algali di interesse.

La specie più interessante dal punto di vista della produzione di olio vegetale, sembra essere *Nannochloropsis salina*, che è in grado di produrre fino al 70% di lipidi su massa secca, con buone velocità di crescita (Borowitzka, 1988).

Il genere *Nannochloropsis* è stato descritto per la prima volta da Hibbered (1981) che lo spostò dalla classe delle *Chlorophyceae* a quella delle *Eustigmatophyceae* nella famiglia delle Monodopsidaceae. Il genere *Nannochloropsis* è difficile da identificare, perché le cellule sono piccole e indistinguibili da altre *chlorophytes* attraverso l'osservazione al microscopio ottico. Inoltre le cellule di *Nannochloropsis* sono difficili da fissare nelle tecniche di preparazione per la microscopia elettronica. Sono state descritte 5 specie di *Nannochloropsis*: *N. oculata* e *N. salina* (Hibbered, 1981), *N. gaditana* (Lubian, 1982) e *N. granulata* (Karlson et al., 1996) e *N. limnetica* (l'unica di acqua dolce).

Le specie del genere *Nannochloropsis* sono caratterizzate da aspetti biochimici unici, come l'assenza di clorofilla b o c e la composizione di altri pigmenti (xantofille) (Whittle et al., 1975; Volkman et al., 1993), alti contenuti di EPA (Maruyama et al., 1986) e la presenza di specifici steroli (Patterson et al. 1994; Gladu et al., 1995). Le caratteristiche della struttura di quest'alga sono: vescicole lamellate presenti nel citoplasma e la connessione dell'involucro del cloroplasto con l'involucro nucleare (Santos et al., 1995).

Capitolo 2

Scopo della tesi

Questa tesi è uno studio sperimentale di come l'illuminazione influenza la crescita della coltura algale (*Nannochloropsis salina*), per la produzione olio a scopo energetico. Le alghe sono probabilmente la miglior fonte di olio vegetale per produzione di energia rinnovabile e biodiesel, quindi la produzione di olio dalle alghe potrebbe essere l'unica strada per sostituire grandi quantità di gasolio con biodiesel.

L'aspetto più critico è la scelta della specie di alga ottimale e la messa a punto delle condizioni di crescita tali da ottenere la più alta velocità di crescita insieme ad un alto contenuto lipidico.

L'utilizzo delle microalghe, quindi, rappresenta un vantaggio per la produzione di oli rispetto alle macroalghe e alle piante superiori, poiché le microalghe contengono più olio, crescono più rapidamente ed hanno una struttura meno complessa. Quindi lo scopo della tesi è di studiare le condizioni migliori che consentono di ottenere la più alta velocità di crescita ed un alto contenuto lipidico nelle microalghe, variando il tipo di illuminazione. Inoltre, le colture algali sono state sottoposte a cicli ad alta frequenza di illuminazione pulsata, al fine di simulare, con i cicli di luce e buio, eventuali cicli di mescolamento che potrebbero essere presenti in una coltura agitata.

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1. Caratteristiche morfologiche dei ceppi algali studiati e condizioni e mezzo di coltura.

3.1.1. Specie algale considerata

I nostri esperimenti sono stati condotti con l'utilizzo di una specie algale chiamata *Nannochloropsis salina*. Il ceppo algale utilizzato per gli esperimenti è il 40.85, che è stato formato dalla SAG Culture Collection (Goettingen).

3.1.2 I mezzi di coltura

Il terreno di coltura per la crescita microalgale è composto da;

- miscela di Sali marini (22g/l)
- nitrato di sodio NaNO_3 , come fonte aggiuntiva di azoto
- Tampone tris 40mM (peso molecolare 121,14)

Questi composti, sciolti in acqua ad un volume finale di 980ml vengono autoclavati ad una temperatura di 121°C per 20 minuti per garantire la sterilità, successivamente viene aggiunto una soluzione di Guillard (f/2) contenente tutte i micro/macro nutrienti indicati in tabella 3.1:

Tabella 3.1: componente del mezzo Guillard's marine water enrichment (f/2)

Componente	Concentrazione (M)
NaNO_3	$8,82 \times 10^{-4}$
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$3,62 \times 10^{-5}$
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	$1,06 \times 10^{-4}$
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,17 \times 10^{-5}$
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$1,17 \times 10^{-5}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$3,93 \times 10^{-8}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,60 \times 10^{-8}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$7,65 \times 10^{-8}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$4,20 \times 10^{-8}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$9,10 \times 10^{-7}$
Thiamine HCl (vit. B ₁)	$2,96 \times 10^{-7}$
Biotin (vit. H)	$2,05 \times 10^{-9}$
Cyanocobalamin (vit. B ₁₂)	$3,69 \times 10^{-10}$

3.2. Analisi della crescita

La crescita delle microalghe è stata seguita mediante tre metodiche:

- la misura della densità ottica,
- la conta diretta del numero di cellule,
- la misurazione del peso secco.

3.2.1. Misura della densità ottica

Dopo aver effettuato il prelievo del campione da analizzare, si misura il pH per verificare che sia compreso nel range di valori a cui le cellule microalgali possono vivere. Con un'opportuna diluizione di tale campione, si prosegue con la misurazione della densità ottica, mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro (Perkin Elmer-lambda Bio 40) a una lunghezza d'onda di 750nm.

3.2.2. Conta diretta del numero di cellule

La conta cellulare viene fatto giornalmente dopo aver effettuato un'opportuna diluizione, mediante l'utilizzo di un microscopio ottico ed un emocitometro di Bürker.

3.2.3. Misurazione del peso secco

Per ottenere una misura quantitativa della concentrazione in peso secco della coltura algale, campioni da 10 ml sono stati filtrati attraverso dischi di carta, di massa nota, con porosità di 0,22 µm. I campioni così ottenuti sono stati posti in stufa a 100°C fino al raggiungimento di una massa costante, misurata con bilancia (precisione: 0,0001g).

3.3. Determinazione del contenuto di lipidi

In laboratorio è stato determinato il contenuto lipidico delle colture algali con tecniche di fluorescenza, utilizzando un colorante lipofilico fluorescente (Nile Red) in grado di emettere fluorescenza a valori di lunghezza d'onda prestabiliti (570-590nm) in presenza di lipidi intracellulari. La concentrazione di cellule nel campione valutata come ottimale per la misura è di $2 \cdot 10^6$ cellule/ml. I campioni vengono diluiti in H₂O deionizzata, alla concentrazione richiesta, successivamente viene aggiunto il colorante Nile Red alla concentrazione finale di 2,5 µg/ml.

I campioni vengono successivamente incubati a 37°C per 10 minuti per favorire la penetrazione del colorante all'interno delle cellule. Il fluorimetro utilizzato per l'analisi è un Olis DM45 e il software utilizzato per registrare lo spettro di fluorescenza è Olis GlobalWorks. La lunghezza d'onda di eccitazione è 488 nm, le lunghezze d'onda di emissione vengono registrate nell'intervallo compreso tra 500 nm e 700 nm. Si procede quindi con il calcolo della fluorescenza del campione sottraendo al valore di fluorescenza il segnale derivante dalla coltura cellulare, ottenuto da una lettura del campione senza l'aggiunta di colorante. Viene quindi calcolata la media dell'intensità di fluorescenza nell'intervallo tra 575 nm e 585 nm, che rappresenta il picco di emissione del colorante in presenza di lipidi.

3.4. Correlazione tra intensità di fluorescenza e percentuale di lipidi nel campione.

Dati ottenuti da diverse estrazioni sono stati correlati con l'intensità di fluorescenza dei campioni, per ottenere una correlazione tra le due misure.

Il risultati della correlazione per *N.salina* è (Longo S. Tesi di laurea 2010):

$$y = 5 \cdot 10^{-5}x + 0,1325 \quad (3.1)$$

$$R = 0,9857$$

Dove x rappresenta l'intensità di fluorescenza misurata e y la percentuale di lipidi in peso secco (DW).

N. salina si potrebbe arrivare a un valore massimo di percentuali di lipidi intorno a 69 ± 0.01 (%DW).

3.5. Apparecchiature.

Il tipo di reattore che abbiamo usato per condurre l'esperimento è di tipo flat-plate a disposizione verticale, che minimizza l'effetto di diminuzione della luce a causa della concentrazione cellulare. Il reattore è costituito da una forma ad "U" in policarbonato che definisce la struttura e lo spessore del reattore. Le pareti anch'esse in policarbonato, vengono attaccate alla U con silicone. (si veda figura 3.1)

Tale reattore può avere un volume massimo di 120 ml, e l'immissione della miscela aria + CO₂ (95/5, v/v) avviene grazie ai fori che sono stati ricavati sui lati più lunghi in prossimità della base. Attraverso di essi è stato fatto passare un tubicino forato. La tenuta viene garantita ancora una volta dal silicone immesso negli interstizi tra il tubicino e la "U". I fori sul tubicino sono stati effettuati con un ago ad una distanza di circa 1.5 cm l'uno dall'altro. Molto importante è la scelta dello spessore (del flat plate, 8 mm) fatta in modo da poter considerare, ai fini della modellazione, l'irradianza costante lungo il cammino ottico del reattore.

Esso viene infatti illuminato su una faccia in modo che il fascio possa essere considerato perpendicolare alla superficie (semplificazione definita *quasi-collimated irradiance flux* da Cornet *et al.*, 1992)

Il sistema può essere considerato agitato mediante *bubbling*; il grado di agitazione è strettamente legato alla portata di gas che viene alimentata. Il reattore viene riempito con il *medium* di coltivazione e l'inoculo, e successivamente collegata all'impianto precedentemente sterilizzato. La sterilità durante i prelievi di campioni dalla bottiglia viene garantita operando in prossimità di un Bunsen acceso che genera un'atmosfera ossidante nell'area di lavoro.



Figura 3.1. Reattore flat-plate

• La lampada a led

Il tipo di lampada che abbiamo utilizzato per l'illuminazione della coltura algale è un modello di una ditta ceca (PhotoSynthetic Instruments PSI); le sorgenti luminose PSI sono un'array di luce diodi ad alta prestazione (LED), e possono operare in regimi multipli: flash, a luce continua, oppure modulando armonicamente la luce. Queste lampade possono lavorare anche con modulazioni definite dall'utente, e in particolare, nel nostro caso, attraverso l'alimentatore siamo in grado di regolare manualmente l'intensità luminosa voluta.

La lampada e' in grado di garantire irradianze fino a circa $1700 \mu\text{E}/(\text{m}^2\text{s})$ ed è costituita da 112 led disposti in un rettangolo di 11x7. Operativamente, i pannelli devono essere messi ad una distanza di almeno 20 cm dalla fonte luminosa per avere omogeneità del flusso radiativo ed evitare effetti di riscaldamento. La loro funzione può essere sostanzialmente migliorata mediante l'impiego di un controller; in particolare abbiamo usato il light controller (LC 100), che consente di tarare la scala attraverso le misure dirette dell'intensità luminosa ad una certa distanza (che deve ovviamente rimanere costante).

Inoltre il controller permette di gestire alcune funzioni di irradianza, con i quali è possibile effettuare dei cicli luce-ombra a frequenze anche oltre 5000 Hz. Operativamente viene

immessa la durata dell'intervallo di luce e la durata dell'intervallo di ombra, la somma delle quali dà il periodo il cui inverso è la frequenza di ciclo. Un'altra caratteristica del controller è quella di gestire l'irradianza secondo funzioni preimpostate. La funzione più interessante è simil-sinusoidale attraverso la quale è possibile simulare in laboratorio l'andamento dell'irradianza solare. Oltre all'utilizzo del LC 100, si possono impiegare anche dei software: light studio software, che consente di gestire facilmente le irradianze mediante l'impiego di un computer.

Sia la LC 100 che la light studio software, offrono la possibilità di creare protocolli definiti dall'utente.

Un'immagine della LC 100 è mostrato nella figura 3.2 e la disposizione dell'apparecchiatura in figura 3.3.



Figura 3.2. LC 100 (www.psi.cz)

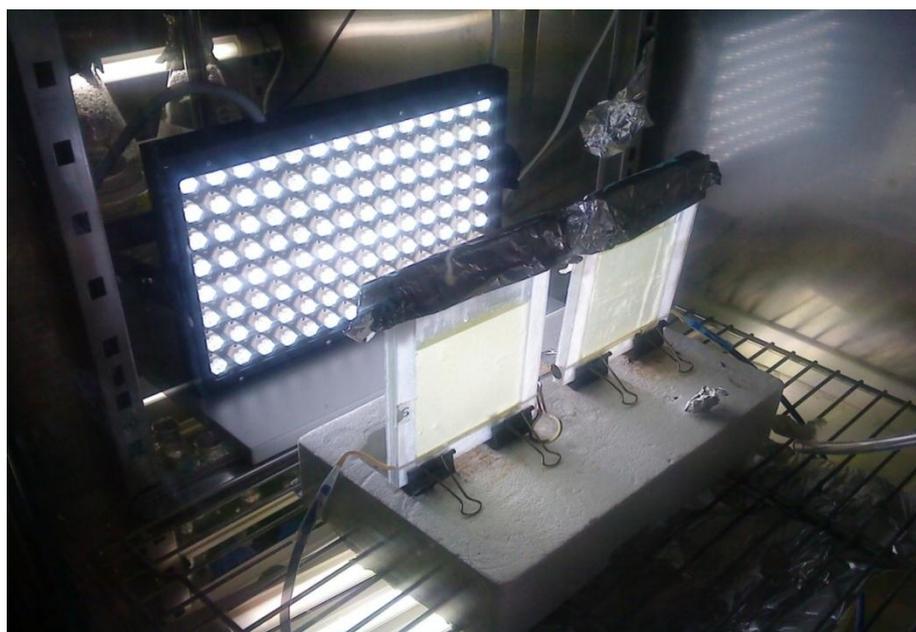


Figura 3.3. impianto per la coltivazione delle microalghie.

3.6. Calcolo della velocità di crescita

La massima velocità di crescita è quella che si raggiunge nella fase esponenziale, dove non vi è limitazione dovuto al substrato.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (3.2)$$

dove X è il numero di cellule, t il tempo e μ la velocità di crescita.

Integrando l'equazione (3.2) tra le condizioni iniziali (giorno 0) e le condizioni finali, si ottiene:

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu \cdot (t - t_0) \quad (3.3)$$

In figura 3.4 è riportato l'andamento di una curva di crescita di *N. salina*, in scala semi-logaritmica.

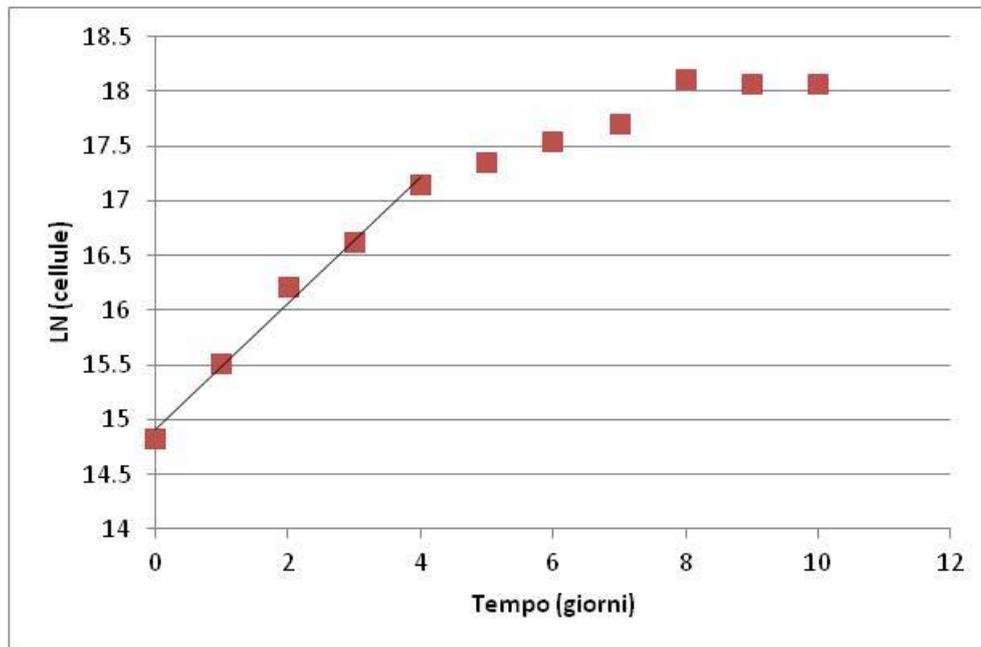


Figura 3.4. grafico semi-logaritmico della concentrazione cellulare di *N. salina* e interpolazione lineare dei punti rappresentativi della fase esponenziale.

Per il calcolo della velocità di crescita si prendono in considerazione i punti relativi alla fase esponenziale, e dall'equazione 3.3 si vede che la velocità di crescita è la pendenza della retta di interpolazione lineare dei punti scelti. Si ottiene un valore per μ pari a $0.547 \text{ giorni}^{-1}$.

Capitolo 4

Risultati e discussione

4.1 Confronto di crescita a diverse intensità – illuminazione costante e continua

Uno degli obiettivi del nostro studio è quello di studiare la crescita delle colture algali e di confrontare le diverse condizioni di intensità luminosa, al fine di determinare l'effetto della luce sulla cinetica di crescita microalgale.

In laboratorio sono state condotte curve di crescita di *N. salina* a diverse intensità, e i risultati sono riportati nelle figure 4.1 e 4.2.

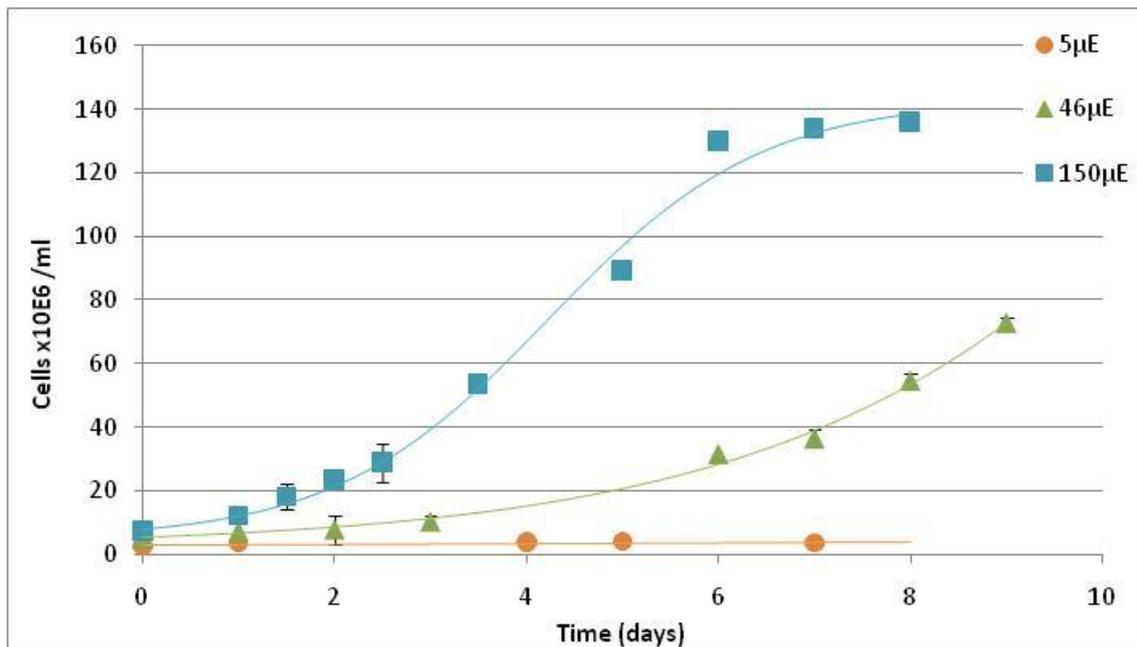


Figura 4.1. curve di crescita di *N. salina*. Curve di crescita a diverse intensità di luce. (● 4.6 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, ▲ 46 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, ■ 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$).

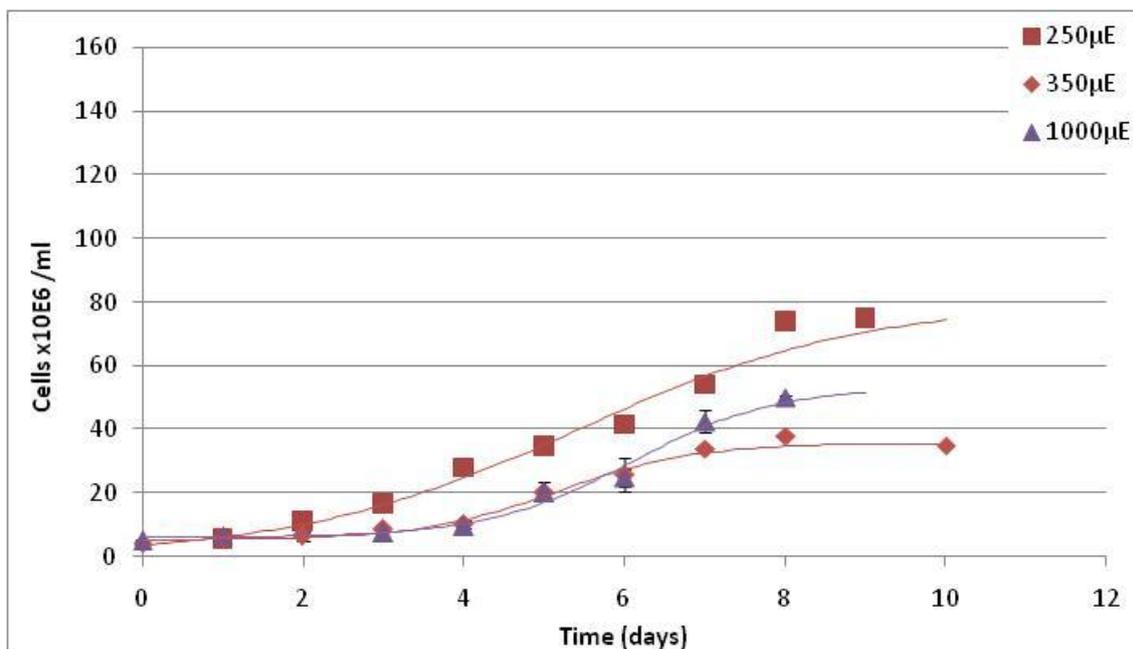


Figura 4.2 curve di crescita di *N. salina*. Variazione delle concentrazioni delle cellule a diverse intensità luminosa in funzione del tempo (■250 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, ◆350 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, ▲1000 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$).

Dall'analisi delle curve di crescita (fig. 4.1 e 4.2) si nota che le colture con illuminazione a 150 e 1000 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ mantengono una crescita esponenziale per 7 giorni circa e raggiungono la fase stazionaria dopo 8 giorni a diverse concentrazioni: la coltura illuminata a intensità di 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ presenta una concentrazione che è circa tre volte quella a 1000 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. A loro volta, le colture con illuminazione a 250 e 350 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ mantengono una crescita esponenziale per 8 giorni circa e raggiungono la fase stazionaria dopo circa 9 e 10 giorni rispettivamente, con una concentrazione finale della coltura a 250 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ quasi due volte superiore rispetto a quella a 350 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. Quindi, a intensità basse, cioè fino a 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, la coltura entra subito in fase esponenziale, mentre a intensità superiori, che sono evidentemente stressanti per le cellule, si ha all'inizio una fase lag, che è necessaria all'adattamento cellulare a tali intensità. Inoltre, le cellule alle alte intensità mostrano segnali di stress, dal momento che cambiano colore, virando al giallo, segnale di aumento del contenuto di carotenoidi, e non raggiungono in fase stazionaria le stesse concentrazioni ottenute alle basse intensità.

In figura 4.3 viene riportato l'andamento della costante cinetica di crescita algale in funzione delle diverse intensità di illuminazione a cui sono stati condotti screening gli esperimenti con *N. salina*.

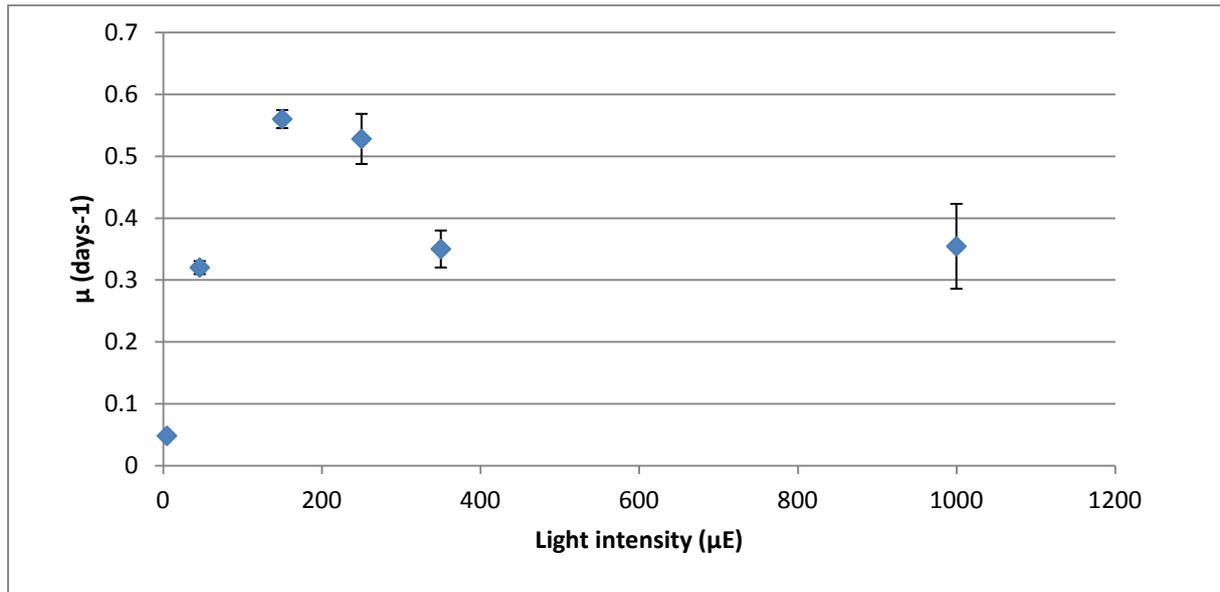


Figura 4.3. Velocità di crescita algale in funzione dell'intensità di illuminazione.

Come si nota dalla figura 4.3 la massima velocità di crescita si ottiene nel caso dell'esperimento condotto a un'intensità di illuminazione a $150\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, così come lo è la concentrazione delle cellule ottenute a questa illuminazione ($\mu=0,577\text{giorno}^{-1}$, concentrazione $140\text{cells}\cdot 10^6/\text{ml}$). La prima parte, fino ai $150\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ è pressoché lineare, mentre a intensità superiori ai $150\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ si va a saturazione, e oltre ancora l'intensità di luce diventa inibente perché le cellule sono stressate. C'è da tenere conto che il pannello è sottile, quindi tutte le cellule sono esposte all'elevata intensità e vengono danneggiate.

Si conclude che le condizioni migliori per la crescita delle colture microalgale sono quelle degli esperimenti condotti a un'intensità intorno a $150\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. Inoltre, si ottiene un margine di errore più basso nel caso di illuminazione a $150\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ e con elevata velocità di crescita, perché, più si aumenta l'intensità di illuminazione più le cellule sono stressate, e quindi le misure di concentrazione delle cellule sono più soggetti a errori: si è visto che le curve ripetute presentano lunghe fasi lag che spesso variano di uno o due giorni, come risulta dalla tabella 4.1.

Tabella 4.1. Confronto velocità di crescita ed errori a diverse intensità di illuminazione

Intensità di illuminazione(μE)	Velocità di crescita (giorni^{-1})	Errore
4,6	0,048	0,0001
46	0,320	0,010
150	0,560	0,014
250	0,528	0,041
350	0,350	0,029
1000	0,354	0,068

4.2 Contenuto lipidico.

Utilizzando la tecnica di fluorescenza al Nile Red abbiamo determinato il contenuto lipidico di *N. salina*. I risultati sono riportati in figura 4.4.

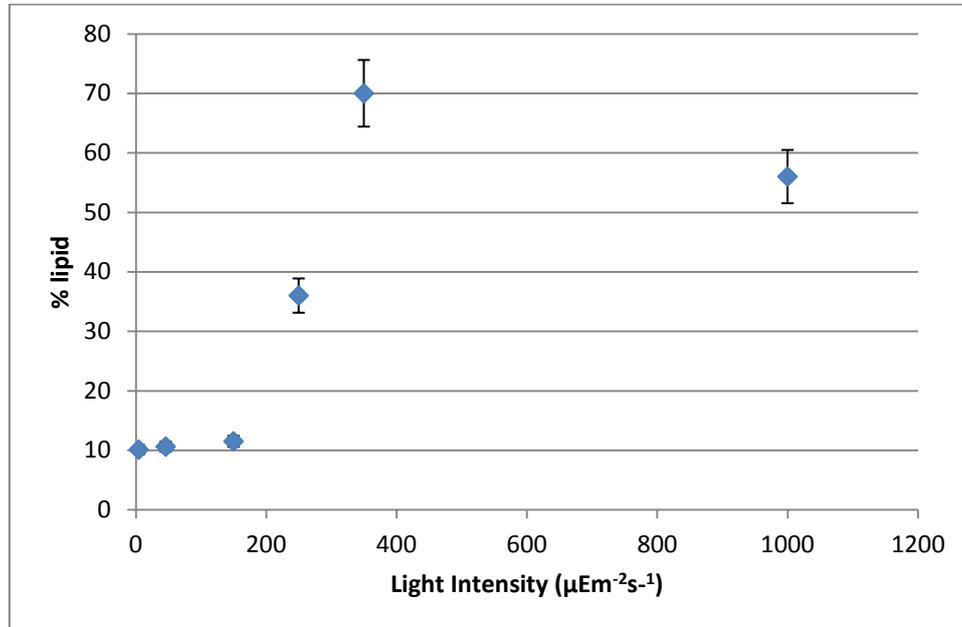


Figura 4.4. Contenuto lipidico di *N. salina*, a diverse intensità di illuminazione.

Come si vede dalla figura 4.4, il contenuto di lipidi di *N. salina* varia in funzione dell'intensità di illuminazione. L'aumento dell'intensità di illuminazione comporta un abbassamento della velocità di crescita delle alghe, ma le cellule sono più stressate e questo provoca l'aumento del contenuto lipidico delle alghe.

Quindi il contenuto lipidico della *N. salina* aumenta all'aumentare dell'intensità di fluorescenza, finché non si raggiunge una limitazione nella condizione di crescita, quando i lipidi vengono immagazzinati come prodotti (Boussiba 1987): si veda la tabella 4.2.

Tabella 4.2. Variazione della percentuale di lipidi di *N. salina*, in funzione dell'intensità di fluorescenza, dell'intensità di illuminazione e della velocità di crescita.

Intensità luminosa ($\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$)	Intensità di fluorescenza IF	Lipidi (%)
4.6	821	10.1
46	921	10.6
150	1100	11.5
250	6000	36.0
350	15000	70.0
1000	10000	56.0

4.3 Confronto con illuminazione pulsata

E' stato deciso di misurare la capacità di *N. salina* di crescere in condizione di luce/buio, per verificare se l'alga fosse in grado di migliorare la sua crescita, aumentando la frequenza della luce pulsata, evitando gli effetti di foto inibizione e foto saturazione che abbiamo osservato alle alte intensità.

Quindi, si è voluta verificare l'efficacia dei cicli luce/buio di breve, media e lunga durata (imposti attraverso la fonte luminosa stessa) realizzando esperimenti in condizioni di luce inibenti e in condizione di luce saturante per sfruttare al meglio l'utilizzo di luce intermittente per la crescita e per la produzione di lipidi attraverso l'effetto del mescolamento. Applicando in maniera intermittente la luce, le intensità di illuminazione alte vengono diluite, rendendole disponibili in piccole dosi per più cellule, lungo un determinato periodo di tempo e garantendo così l'utilizzo più efficace dei fotoni

La crescita delle colture algali ad illuminazione pulsata è stato condotto nel laboratorio ad una intensità di illuminazione intorno a $350\mu\text{E}$. Il confronto con le altre condizione di crescita è riportato di seguito, dove vengono considerate le condizioni di luce/buio di breve, media e lunga durata, rispettivamente a 350 puls 1/3, 350 puls 1/2 e 350 tutte ad una frequenza di 10Hz. Per 350 puls 1/3 s'intende intensità fornita a $350\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ con circa 33 millisecondi di illuminazione e 66 millisecondi di buio, mentre a 350 puls 1/2 implica che si lavora con 50 millisecondi di illuminazione e 50 millisecondi di buio e per ultimo a $350\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ di illuminazione costante.

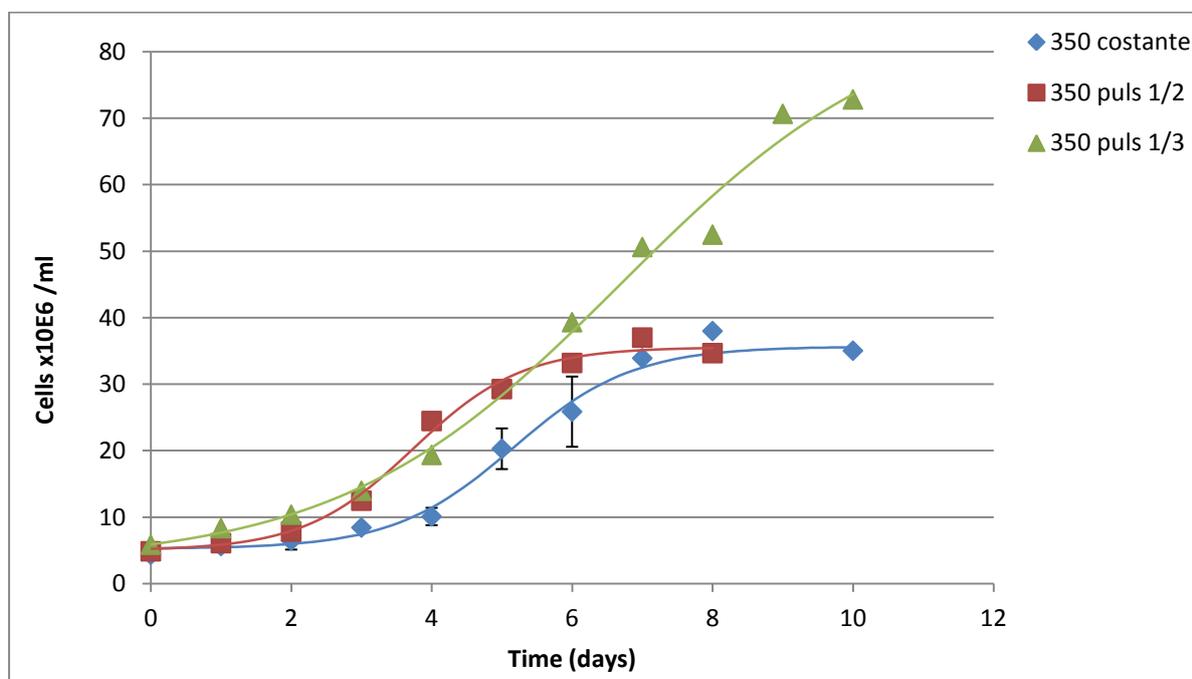


Figura 4.5 curve di crescita di *N. Salina*. Variazione delle concentrazioni delle cellule a intensità luminosa di $350\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ in funzione del tempo.

Dall'analisi della figura 4.5, considerando il caso dell'illuminazione pulsata (350 puls 1/3), si nota che si riesce a raggiungere una concentrazione finale delle colture microalgali quasi due volte superiore rispetto al caso di illuminazione costante, e questo dimostra che le colture algali di *N. salina* sono in grado di crescere anche in condizione di luce intermittente. Ciò si spiega col fatto che, anche ad elevata intensità, pulsando la luce, le alghe sono meno stressate, e si verifica un aumento della crescita cellulare.

In figura 4.6 viene riportato l'andamento della costante cinetica di crescita algale in funzione delle diverse intensità di illuminazione pulsata a cui sono stati condotti screening gli esperimenti su *N. salina*.

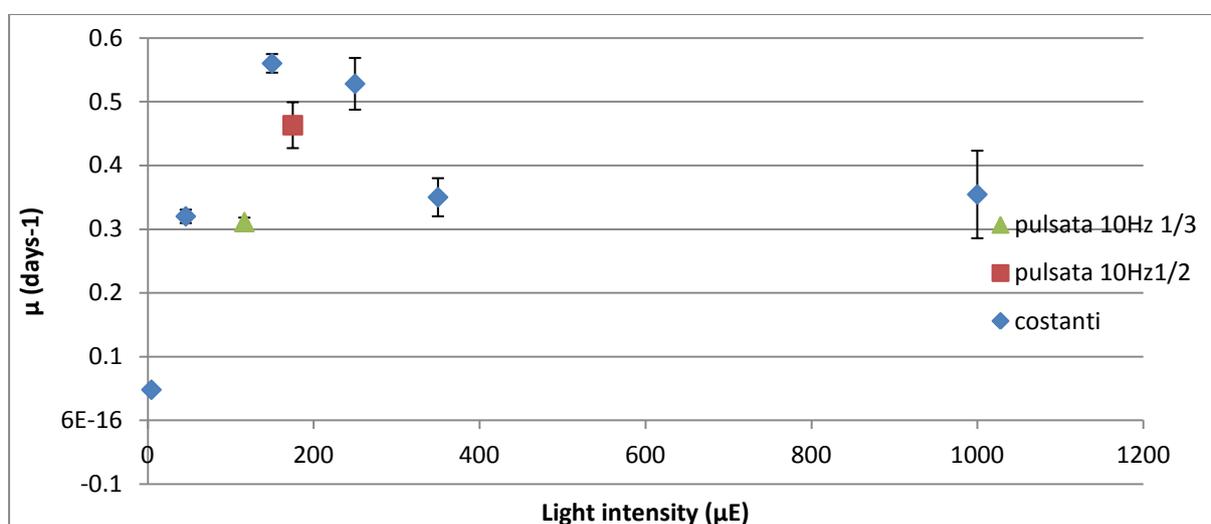


Figura 4.6. curva di velocità di crescita algale in funzione dell'intensità di illuminazione.

Anche in questa situazione, la condizione migliore di crescita si ottiene nel caso dell'esperimento condotto a 150 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, con un margine di errore pari a 0.015.

Considerando il caso di intensità di illuminazione a 350 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, si nota che la maggior velocità di crescita algale si ottiene nel caso dell'esperimento condotto ad intensità di illuminazione di 350 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (puls 1/2) che risulta superiore rispetto al caso di illuminazione costante di un valore pari ad 0.1107, ed inoltre, come viene riportato nella tabella 4.3, il margine di errore è abbastanza paragonabile rispetto agli altri due esperimenti condotti a 350 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (costante e puls 1/3).

Tabella 4.3

Intensità di illuminazione ($\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$)	Velocità di crescita (giorni^{-1})	Errore
350 (costante)	0,350	0,030
350 (puls 1/2)	0,463	0,036
350 (puls 1/3)	0,311	0,007

Tabella 4.4

Intensità ($\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$)	Intensità di fluorescenza	Lipidi (%)
350(1/2)	11200	62.0
350(1/3)	2354	17.8

Si veda in fine dalla tabella 4.4 che la percentuale di lipidi più alta nel caso degli esperimenti condotti a intensità pulsata si ottiene ad intensità pari a 350 (1/2) $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, e ciò conferma ancora che le condizioni migliori di crescita si ottengono nel caso degli esperimenti condotti a basse intensità, privi di fenomeni di foto inibizione e foto saturazione, che si verifica alle alte intensità.

4.4 Discussione.

L'obiettivo dello studio sull'influenza dell'illuminazione sulla crescita di *N.salina* è cercare di prevedere la crescita in un ambiente variabile (sia nell'intensità che nello spettro) come quello determinato dalle condizioni naturali di irradianza solare. L'approccio seguito è di considerare per prima cosa la curva di crescita e le caratteristiche dell'alga in condizioni di irradianza costante (supposti non limitanti i nutrienti). Solitamente, nei nostri laboratori, la curva viene ricavata con esperimenti discontinui, e attribuendo all'irradianza la crescita in fase esponenziale, calcolato sui primi punti della curva di crescita a basse concentrazioni cellulari, minimizzando quindi l'effetto di ombra dovuto alla concentrazione cellulare.

I campionamenti vengono poi analizzati anche per misurare il quantitativo di lipidi tramite la fluorescenza al Nile Red. In questo approccio ci sono però alcuni problemi:

- Le condizioni dei nutrienti variano e la curva non ne tiene conto. Viene quindi implicitamente fatta l'ipotesi che tutti i nutrienti non siano limitanti e non ci sia un'interferenza con la componente luminosa.
- L'aumento graduale delle concentrazione non permette di avere una misura molto accurata delle condizioni di irradianza, anche semplicemente media, nel reattore.
- La riproducibilità è molto difficile da ottenere a causa dei diversi stati di acclimatazione dell'inoculo. Si osserva infatti che nelle condizioni di elevata irradianza occorrono almeno un paio di giorni prima che la coltura manifesti crescita esponenziale. Tuttavia non si sa a priori se le alghe sono già acclimate all'irradianza a cui vengono esposte nell'esperimento. Ad appesantire notevolmente la questione ci sono alcuni dati di letteratura che mostrano che alcune dinamiche di acclimatazione richiedono tempi dell'ordine della trentina di giorni (Farges *et al.*, 2009), anche se nel nostro caso non sono stati osservati periodi di adattamenti superiori ai tre giorni.

Tutto ciò equivale a dire che nei sistemi batch si effettua implicitamente l'ipotesi che nessuna variazione delle grandezze diverse dall'irradianza abbia effetto rilevante sulla crescita.

Tale ipotesi è molto pesante nella modellazione di un sistema vivente come le microalghe. Le fasi di crescita delle colture algali possono essere suddivise in tre: la fase lag, la fase esponenziale e per ultimo la fase lineare di crescita. Con la fase lag si intende la fase di adattamento fisiologico delle alghe, al seguito di un cambiamento nelle condizioni di nutrimento e di coltura. Dopo questa fase, si ha la fase esponenziale, nella quale le alghe si sono adattate alle condizioni ambientale e di coltura, e cominciano a moltiplicarsi e quindi a crescere. In fine la fase lineare corrisponde alla fase finale di crescita delle alghe, che si ottiene quando le alghe raggiungono una condizione di saturazione sia nel nutrimento che nelle condizioni di irraggiamento.

Nella seconda parte del lavoro, abbiamo visto come varia la crescita delle colture algali, variando le intensità di illuminazione. In particolare, si è osservato che le condizioni migliori di crescita si ottengono nel caso degli esperimenti condotti a basse intensità (caratterizzati da alti valori di velocità di crescita e margini di errori relativamente bassi), mentre per le alte intensità le condizioni di crescita peggiorano, con le alghe che presentano una lunga fase lag (foto acclimatazione), perché sono più stressate, e le determinazioni delle concentrazioni sono più soggette ad errori.

Una delle soluzioni proposte per migliorare l'impiego della luce ad alta intensità per la crescita delle alghe è quello di realizzare gli esperimenti con utilizzo di luce pulsata: aumentando le frequenze della luce pulsata, si potrebbe evitare il fenomeno di foto saturazione e foto inibizione osservate alle alte intensità. È stato dimostrato che un aumento del grado di agitazione, o di mescolamento della coltura, comporta un aumento della concentrazione cellulare (Markl, 1980). Ovviamente, tale aumento della concentrazione è anche da attribuire all'aumento della frequenza della luce pulsata, che è anche una maniera di diluire la luce, rendendola più piccola in dose e disponibile a più cellule in un determinato istante di tempo. La spiegazione per cui le cellule ad elevata densità necessitano di un numero di Reynolds elevato (grado di turbolenza della coltura) per ottenere la massima produttività è tutto ricapitolato nelle frequenze dei cicli luce/buio: aumentando la densità cellulare, infatti, l'utilizzo efficace di una intensità elevata richiede che la frequenza della luce pulsata venga aumentata, e questo consente di aumentare la concentrazione di biomassa prodotta (Kok, 1953, Laws et al. 1983).

L'interesse per la produzione di olio a partire dalle microalghe è dovuto all'elevato contenuto di lipidi in alcune specie delle alghe, e anche per il fatto che la sintesi di lipidi, soprattutto quelli non polari (TAGs, triacylglycerols), che sono i substrati migliori per la produzione di biodiesel, può essere modulata variando semplicemente le condizioni di crescita.

Il contenuto totale di lipidi nelle microalghe può variare tra 1-85% del peso secco (Borowitska, 1988; Chisti, 2007; Spoehr e Milner, 1949), con valori superiori al 40% ottenuti sotto la condizione di limitazione di nutrienti. Fattori come la temperatura, l'irradianza e soprattutto la disponibilità dei nutrienti influenzano tanto sia la composizione dei lipidi, che il contenuto lipidico di varie alghe (Guschina e Harwood, 2006; Hu, 2004; Hu et al, 2008; Roessler, 1990). In generale, irradianza alta stimola un accumulo di TAGs (Roessler, 1990), mentre nella condizione di bassa irradianza, si ha la produzione di lipidi polari (fosfolipidi e glicolipidi), associati strutturalmente e funzionalmente alle membrane delle cellule.

In effetti, dagli esperimenti che abbiamo eseguito in laboratorio sulla *N. salina*, la percentuale di lipidi più alta (70%) è stata ottenuta nel caso dell'esperimento condotto a $350\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, invece, per la luce pulsata a $350(1/2)\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ il percentuale di lipidi si aggira intorno ai 62% del peso secco. E ciò dimostra che il contenuto lipidico delle alghe varia, cambiando le condizioni di crescita.

CONCLUSIONI

Lo scopo di questa tesi è stato di analizzare l'influenza della luce sulla crescita delle colture algali (*N. salina*) per la produzione di olio a scopo energetico.

I risultati ottenuti mostrano come ad intensità diverse si riescono ottenere diversi risultati sia sulla crescita sia nella produzione di olio dalle microalghe; in particolare, abbiamo visto che le condizioni migliori per la crescita si ottengono negli esperimenti condotti a basse intensità, mentre ad intensità maggiore le alghe sono più stressate, e quindi le concentrazioni finali di biomasse sono più basse e più soggette a errori. Abbiamo anche dimostrato che impiegando i cicli di luce/buio ad alta frequenza, si riesce a migliorare l'efficacia delle illuminazioni ad alta intensità, aumentando così sia la velocità di crescita delle alghe che il loro contenuto lipidico.

Nel nostro studio è stato utilizzato un fotobioreattore "di ultima generazione", nel quale la lunghezza del percorso della luce è di pochi centimetri, e consente a questi reattori di produrre elevate concentrazioni di biomassa finale.

Intensità della luce, quantità di nutrienti, temperatura, grado di mescolamento della coltura e le concentrazioni di CO₂ e O₂ devono essere regolate con attenzione per garantire risultati ottimali in termini di contenuti di olio e di resa in biomassa.

Queste indicazioni sono fondamentali per migliorare le prestazioni dei fotobioreattori riguardo all'efficacia dell'utilizzo della luce, che si traduce in un minore ingombro di area ed in una riduzione dei costi di installazione a produttività finale.

BIBLIOGRAFIA

Borowitzka MA. 1998. Fats, oil and hydrocarbons In: Micro-algal biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press, p 257-287

Boussiba S, Vonshak A, Cohen Z, Avissar Y, Richmond A., 1987, Lipid and biomass production by the halotolerant microalgal *Nannochloropsis salina*, *Biomass*, 12, 37-47

Carvalho A., Luís A., Meireles, Malcata F. 2006. Microalgal Reactors: A Review of Enclosed System Designs and Performances. *Biotechnol. Prog.* 22, 1490-1506;

Chen W., Zhang C., Song L., Sommerfeld M., Hu Q., 2009, A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae export, *J of microbiological methods*, 77(1), 41-47

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

Chisti Y., Jauregui-Haza U.J., 2002, Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors, *Biochemical Engineering Journal*, 10, 143-153

Chojnacka K, Marquez-Roche FJ. 2004. kinetic stoichiometric relationship of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae *Biotechnology*, 3(1), 21-34

Guschina I., Harwood J. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. 2006. *Progress in Lipid Research*, **45**, 160–186;

Gladu P.K., Patterson G.W. 1995. Some biochemical characteristics of UTEX 2341, a marine eustigmatophyte identified previously as *Chlorella minutissima* (Chlorophyceae), *Journal of Phycology*, **31**, 774–777;

Gladue R.M., Maxey J.E. 1994. Microalgal feeds for aquaculture. *Appl. Phycol.* **6**, 131–41;

Gudin C., Chaumont D. 1991. Cell fragility-the key problem of microalgae mass production on closed photobioreactors. *Bioresour. Technol.* **38**, 145-151;

Hibbered D.J. 1981. Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xantophyceae), *Botanical Journal of the Linnean Society*, **82**, 93–119;

Hu H., Gao K. 2003. Optimization of growth and fatty acid composition of a unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. *Biotechnology letters*, **25**, 421-425;

Li Y, Horsman M, Wu N, Lan C Q, Dubois-Calero N. 2008. Biofuels from microalgae. *Biotechnology progress*. 24(4): 815-20

Lubian L.M. 1982. *Nannochloropsis gaditana* sp. nov. una nueva Eustigmatophyceae marina, *Lazaroa*. **4**, 287–293;

Molina Grima E., 2000, Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular air lift photobioreactors, *Biotechnol Bioeng*, 67(4), 465-475.

Patterson G.W., Teitsa-Tzardis E., Wikfors G.H., Ghosh P., Smith B.C., Gladu P.K. 1994. Sterols of eustigmatophytes, *Lipids*. **29**, 661–664;

Pulz O. 2001. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 287–93;

Richmond A. 1986 Handbook of Microalgal mass Cultures, CRC Press, Boca Raton, FL;

Richmond A., Lichtenberg E., Stahl B., Vonshak A. 1990. Quantitative assessment of the major limitations on productivity of *Spirulina platensis* in open raceways. *Appl. Phycol.* **2**, 195–206;

Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R. 2009. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor, *Biotechnol Bioeng.* **102**(1), 100-12;

Santos L.M.A., Leedale G.F. 1995. Some notes on the ultrastructure of small azoosporic members of the algal class Eustigmatopyceae, *Nova Hedwigia*. **60**, 215–225;

Roessler PG. 1990. Enviromental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implication and future research directions. *J Phycol* 26:393-399

Spoehr HA, Milner HW. 1949. The chemical composition of chlorella: effect of environmental conditions. *Plants physiol* 24:120-149

Tredici, M.R. & Chini Zitelli, G. (1998) “Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors.” *Biotechnol. Bioeng.*, **57**, 187-97.

Volkman J.K., Brown M.R., Dunston G.A., Jeffrey S.W. 1993. The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae, *Journal of Phycology*. **29**, 69–78;

Wang B, Li Y, Wu N, Lan C Q: 2008. Carbon dioxide bio-mitigation on living microalgae. *Applied microbiology and Biotechnology*. 79(5): 707-18

Whittle S., Casselton P. 1975. The chloroplast pigments of the algal class Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. I. Eustigmatophyceae, *British Phycological Journal*. **10**, 179–191;

www.wongawetlands.nsw.gov.au/news/2007442352

http://www.scubla.it/pagine_impianti_fotobioreattore.php

www.psi.cz