

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**

**ANALISI D'IMMAGINE MULTIVARIATA PER LA STIMA
DELLA CONCENTRAZIONE MICROALGALE IN
MICRO-FOTOBIOREATTORI**

Relatore: Prof. Fabrizio Bezzo

Correlatore: Dott. Christopher Castaldello

Laureando: ALESSIO GUBERT

ANNO ACCADEMICO 2019-2020

Riassunto

Le microalghe stanno riscontrando un interesse sempre maggiore in ambito industriale, grazie ad una produttività molto elevata e al contenuto di molecole ad alto valore aggiunto. I problemi che sorgono nel passaggio dalla micro alla macro-scala stanno rallentando in modo deciso il passaggio alla produzione industriale di microalghe. L'utilizzo di micro-fotobioreattori potrebbe velocizzare notevolmente l'acquisizione di dati, così da permettere l'elaborazione di modelli che favoriscano lo sviluppo di tecnologie atte alla produzione microalgale su larga scala. Al momento, i micro-fotobioreattori sono scarsamente utilizzati, poiché risulta difficile monitorare la crescita delle microalghe.

Questa Tesi si propone di verificare un nuovo metodo di monitoraggio della biomassa microalgale tramite analisi d'immagine multivariata, affiancandola a tecniche di fluorescenza clorofilliana. I risultati ottenuti mostrano come la combinazione di analisi d'immagine e di fluorescenza clorofilliana permetta di ottenere stime di concentrazione più precise rispetto a quelle in cui si utilizzino solo misure di fluorescenza. Gli errori relativi medi ottenuti nella predizione su una singola intensità luminosa variano da 16%, per la luce pari a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, a 25% per la luce di $35 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mentre per la predizione comprendente tutte le intensità luminose l'errore relativo medio è 22.5%. Il metodo ha evidenziato alcune criticità nella stima di pozzetti a bassa concentrazione e nella predizione durante la fase di acclimatazione della microalga, ovvero nei primi due giorni di ogni esperimento.

Indice

NOMENCLATURA.....	1
INTRODUZIONE.....	3
CAPITOLO 1 - STATO DELL'ARTE E OBIETTIVI DELLA TESI	5
1.1 LE MICROALGHE	5
1.1.1 Applicazioni industriali	5
1.1.2 Problematiche della coltivazione su scala industriale	8
1.2 I MICRO-FOTOBIOREATTORI	9
1.3 ANALISI D'IMMAGINE MULTIVARIATA	10
1.4 OBIETTIVI DELLA TESI	12
CAPITOLO 2 - MATERIALI E METODI	13
2.1 STRUMENTAZIONI E PROCEDURE.....	13
2.1.1 Sistemi di crescita microalgale.....	13
2.1.2 Tecniche analitiche.....	14
2.1.2.1 Densità ottica.....	14
2.1.2.2 Conta cellulare.....	15
2.1.2.3 Peso secco	16
2.1.2.4 Misura pH.....	16
2.1.2.5 Valutazione del contenuto di pigmenti.....	16
2.1.3 Micro fotobioreattori	18
2.1.4 Misure di fluorescenza	19
2.1.4.1 Fluorimetro.....	19
2.1.4.2 Protocollo	20
2.1.5 Acquisizione di immagini	22
2.1.6 Procedure sperimentali per la crescita ed il monitoraggio	22
2.2 METODI MATEMATICI	23
2.2.1 Masking.....	24

2.2.2	Analisi delle componenti principali (PCA).....	25
2.2.3	Multi-Way PCA	26
2.2.4	Regressione dei minimi quadrati parziali (PLS)	28
CAPITOLO 3 - ANALISI PRELIMINARI.....		31
3.1	CONFRONTO CON I DATI DI LETTERATURA	31
3.1.1	Monitoraggio della crescita.....	31
3.1.2	Analisi dei pigmenti	34
3.1.3	Misure di fluorescenza	36
3.2	ANALISI PRELIMINARE SECONDO METODI MATEMATICI	37
3.2.1	Analisi delle componenti principali	37
3.2.2	Multiway-PCA	41
CAPITOLO 4 - RISULTATI		45
4.1	METODI DI REGRESSIONE	45
4.1.1	Matrice dei predittori.....	45
4.1.2	Vettore delle risposte.....	46
4.1.3	Modello di regressione	47
4.2	RISULTATI	48
4.2.1	PLS su singola intensità di luce e singolo giorno.....	48
4.2.2	PLS su singola intensità di luce	50
4.2.3	PLS su più intensità luminose	53
4.2.4	PLS sulle concentrazioni iniziali.....	57
4.3	COMMENTI FINALI	59
CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI.....		61
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....		63

Nomenclatura

b_r	=	parametri di regressione
\mathbf{E}	=	matrice dei residui della decomposizione della matrice \mathbf{X}
\mathbf{F}	=	matrice dei residui della decomposizione della matrice \mathbf{Y}
F_0	=	valore minimo della fluorescenza clorofilliana
F_M	=	valore massimo della fluorescenza clorofilliana
F_V	=	differenza tra F_M e F_0
I_0	=	intensità luminosa
i	=	generica coordinata verticale
j	=	generica coordinata orizzontale
k	=	generico istante temporale
m	=	dimensione orizzontale dell'immagine, dimensione verticale della matrice \mathbf{X}
M	=	numero di predittori per analisi di tipo PLS
n	=	dimensione verticale dell'immagine, dimensione orizzontale della matrice \mathbf{X}
N	=	numero di pozzetti
\mathbf{p}	=	vettore dei <i>loadings</i> della decomposizione della matrice \mathbf{X}
\mathbf{P}	=	matrice dei <i>loadings</i> della decomposizione della matrice \mathbf{X}
P	=	numero di permutazioni
\mathbf{q}	=	vettore dei <i>loadings</i> della decomposizione della matrice \mathbf{Y}
\mathbf{Q}	=	matrice dei <i>loadings</i> della decomposizione della matrice \mathbf{Y}
r	=	rango della matrice
\mathbf{t}	=	vettore degli <i>scores</i> della decomposizione della matrice \mathbf{X}
\mathbf{T}	=	matrice degli <i>scores</i> della decomposizione della matrice \mathbf{X}
\mathbf{u}	=	vettore degli <i>scores</i> della decomposizione della matrice \mathbf{Y}
\mathbf{U}	=	matrice degli <i>scores</i> della decomposizione della matrice \mathbf{Y}
\mathbf{X}	=	matrice composta da m righe ed n colonne
\mathbf{X}^{BWU}	=	matrice ottenuta tramite <i>unfolding</i> di tipo <i>batch-wise</i>
\mathbf{X}^{VWU}	=	matrice ottenuta tramite <i>unfolding</i> di tipo <i>variable-wise</i>
\mathbf{y}	=	vettore delle risposte della regressione PLS
\mathbf{Y}	=	matrice delle risposte della regressione PLS

Acronimi

BWU	=	<i>batch-wise unfolding</i>
CAD	=	<i>computer aided design</i>
Car	=	carotenoidi
Chl a	=	clorofilla a
Chl b	=	clorofilla b
DDT	=	para-diclorodifeniltricloroetano
DMSO	=	dimetilsolfossido
mPBR	=	micro-fotobioreattore
OD	=	densità ottica
PAM	=	<i>Pulse Amplitude Modulated</i>
PCA	=	Analisi delle componenti principali
PDMS	=	polidimetilsilossano
PLS	=	regressione dei minimi quadrati parziali
PUFA	=	acidi grassi polinsaturi
RGB	=	canali di colore rosso, verde e blu
RMSEP	=	scarti quadratici medi di predizione
VWU	=	<i>variable-wise unfolding</i>

Apici e pedici

L_x	=	parametro calcolato a seguito dell'impulso luminoso <i>x-esimo</i>
D_x	=	parametro calcolato a seguito del periodo di buio <i>x-esimo</i>
L_{ss}	=	parametro calcolato allo stato stazionario
T	=	trasposto

Introduzione

Le microalghe sono organismi microscopici fotosintetici, che, grazie ad una produttività teorica superiore a quella delle colture tradizionali, stanno riscontrando sempre un maggior interesse in ambito industriale. Le possibili applicazioni spaziano dalla produzione a scopi alimentari alla chimica fine, dall'industria farmaceutica e cosmetica al trattamento di acque reflue (Milledge, 2011).

Tuttavia, allo stato attuale, le produttività dei processi basati su microalghe è molto bassa, in quanto avvengono interazioni tra le cellule e fenomeni fisiologici, che sono difficili da descrivere a livello matematico. Lo sviluppo di tecnologie, che permettano la descrizione delle variabili chiave nel processo di crescita della microalga, può accelerare lo sviluppo di modelli matematici, in modo che essi vengano impiegati per ottimizzarne la produzione industriale.

L'utilizzo della scala microscopica permetterebbe di ridurre i costi e il tempo necessari per lo svolgimento degli esperimenti, così da consentire la creazione di set di dati di dimensioni maggiori e con un maggior numero di combinazioni tra le variabili fondamentali nel processo di crescita delle microalghe (Perin *et al.*, 2016). La difficoltà nel monitorare la crescita della biomassa microalgale contenuta nei micro-fotobioreattori, però, ne ha sempre limitato l'utilizzo, poiché un semplice prelievo distruggerebbe il contenuto del pozzetto.

Lo sviluppo di nuovi metodi di monitoraggio risulta, quindi, di vitale importanza. Ad oggi, i metodi proposti, si basano sull'analisi della fluorescenza clorofilliana, che presentano dei limiti dovuti alla rumorosità della misura e allo stato di acclimatazione della microalga.

Questa Tesi si propone di verificare un metodo di monitoraggio della crescita della microalga basato sull'analisi d'immagine multivariata, affiancata a tecniche di fluorescenza clorofilliana classiche, in modo da ottenere le informazioni necessarie alla caratterizzazione della microalga attraverso l'acquisizione, e la successiva analisi, di fotografie digitali.

Di seguito viene riportata la struttura della Tesi.

Il Capitolo 1 è composto da un'introduzione dei principali argomenti inclusi nel lavoro, partendo da una breve descrizione biologica delle microalghe, ai possibili sviluppi industriali futuri, che sono però limitati da svariate problematiche. Successivamente sono descritti i micro-fotobioreattori, la loro importanza e i problemi che sorgono dal loro utilizzo. Infine, sono presentate le tecniche di analisi d'immagine multivariata.

Nel Capitolo 2 sono descritti dettagliatamente i test, le procedure sperimentali e i metodi matematici impiegati. Nella prima parte sono riportate le tecniche analitiche impiegate per caratterizzare la microalga. In seguito, sono descritti gli strumenti utilizzati, le piattaforme microfluidiche e le procedure sperimentali applicate per lo svolgimento degli esperimenti. Alla

fine, sono riportati i metodi matematici impiegati per la caratterizzazione della biomassa microalgale.

Nel Capitolo 3 sono riportate delle analisi preliminari, svolte per verificare la consistenza degli esperimenti eseguiti e per valutare la possibilità di introdurre il nuovo metodo di monitoraggio. Inizialmente, è stato effettuato un confronto con i dati presenti in letteratura, mentre nella parte successiva sono riportati i risultati ottenuti tramite tecniche di analisi d'immagine multivariata. Il Capitolo 4 si suddivide in due sezioni. Nella prima, sono descritti i vari modelli utilizzati per testare il metodo di monitoraggio della crescita, mentre nella seconda parte sono presentati i risultati ottenuti.

Infine, sono riportate le conclusioni generali sui risultati ottenuti durante il lavoro di Tesi.

Capitolo 1

Stato dell'arte e obiettivi della Tesi

In questo capitolo saranno descritte le microalghe, sottolineando la loro importanza industriale e le problematiche connesse alla loro coltivazione su larga scala. Successivamente, saranno descritti criticamente i micro-fotobioreattori come strumento per la caratterizzazione delle microalghe, presentando tecniche di analisi d'immagine multivariata come possibile sistema di monitoraggio per i micro-fotobioreattori.

1.1 Le microalghe

Le microalghe sono organismi microscopici unicellulari eucarioti, che producono biomassa ed ossigeno utilizzando la radiazione luminosa come fonte di energia, l'anidride carbonica come fonte di carbonio e dei sali come nutrienti (Mata *et al.*, 2010). Esse hanno, inoltre, la capacità di crescere in condizioni ambientali anche estreme, non necessariamente acquatiche, e non richiedono l'utilizzo di prodotti fitosanitari. Le microalghe sono tra gli organismi fotosintetici più efficienti per applicazioni industriali, dato il loro elevato potenziale produttivo, superiore a quello delle piante terrestri. Le microalghe vengono classificate in base alla tipologia dei pigmenti contenuti, alla costituzione della parete cellulare ed alle proprietà chimiche dei prodotti che esse immagazzinano. Nonostante ciò, dato il miglioramento delle tecniche di caratterizzazione genetica, la loro classificazione è riveduta di continuo. La loro adattabilità ai differenti ambienti è osservabile anche nella capacità di mutare il metabolismo in funzione delle differenti condizioni climatiche e delle fonti di carbonio disponibili (Pastore, 2016).

Grazie alle loro proprietà metaboliche, le microalghe hanno recentemente riscontrato forte interesse a livello globale, per la produzione di tipo alimentare, sia umana che animale, per il trattamento di acque reflue e gas e per la produzione di diverse molecole ad alto valore aggiunto, destinate all'industria farmaceutica e chimica (Khan *et al.*, 2018).

1.1.1 Applicazioni industriali

La rapida produzione di biomassa ed un elevato contenuto di nutrienti stanno consentendo lo sviluppo di impianti di produzione su larga scala a scopi alimentari. Le microalghe, ed in particolare specie come *Chlorella* e *Spirulina*, posseggono un contenuto molto elevato di carboidrati, proteine ed enzimi, elementi che le rendono molto valide in campo nutrizionale (Priyadarshani e Rath, 2012). Dal momento che le microalghe vengono già utilizzate come cibo

in alcuni Paesi, come la Cina, sono considerate come una possibile soluzione alla necessità di nuove risorse alimentari richieste dalla crescente popolazione mondiale; tuttavia, al momento, tali specie vengono utilizzate solamente come integratori alimentari, a causa degli elevati costi produttivi. Nel campo della nutrizione animale, invece, l'utilizzo delle microalghe è stato approfondito maggiormente e circa il 30% della produzione mondiale è destinata a tale impiego (Milledge, 2011). Un esempio è l'utilizzo microalghe come fonte alimentare per l'acquacoltura, ma il loro uso è limitato dall'elevato contenuto di cellulosa, che influenza negativamente la digestione degli animali. Per tale motivo le microalghe sono impiegate in modo indiretto, nutrendo lo zooplancton che è poi usato come cibo per i pesci. Tale problema non si riscontra con i ruminanti, data la loro capacità di digerire direttamente la cellulosa, ma tale fonte di cibo è utilizzata raramente dati i costi necessari alla produzione microalgale.

Inoltre, le microalghe contengono un'elevata quantità di molecole ad alto valore aggiunto, che presentano un forte interesse nell'industria chimica, cosmetica e farmaceutica. Le principali molecole su cui si stanno concentrando gli studi sono carotenoidi, proteine e acidi grassi. I carotenoidi sono pigmenti rossi ed arancioni, che trovano numerose applicazioni nell'industria alimentare, come coloranti e come integratori alimentari. I principali carotenoidi di interesse sono il β -carotene, molecola fondamentale nel corpo umano in quanto è convertita in vitamina A (Allen Olson, 1989), e l'astaxantina, utilizzata principalmente in acquacoltura e come antiossidante. Queste molecole di origine naturale sono preferite a quelle prodotte sinteticamente grazie a migliori proprietà, come la miglior deposizione di pigmento della astaxantina e la proprietà di essere liposolubile del β -carotene. Nonostante ciò, il loro utilizzo è strettamente limitato a causa dei costi di produzione molto elevati (Milledge, 2011). Alcune specie di microalga producono delle proteine chiamate ficobiliproteine, pigmenti molto intensi e solubili in acqua, che trovano un largo impiego nell'industria cosmetica ed alimentare come coloranti. Tali sostanze vengono anche utilizzate in ambito clinico e di ricerca immunologica, grazie a proprietà di fluorescenza molto sensibili ed intense (Spolaore *et al.*, 2006). Tra le molecole ad alto valore aggiunto, che diverse specie di microalghe producono, vi sono gli acidi grassi polinsaturi (PUFA). Queste molecole apportano numerosi benefici alla salute, ma il corpo umano non possiede gli enzimi necessari alla loro sintesi. Per tale motivo è importante trovare fonti esterne che permettano di fornire al corpo umano gli acidi grassi essenziali. Ad oggi, la fonte principale di queste molecole è il pesce, ma la possibilità che esso accumuli tossine al suo interno ha reso le microalghe un possibile sostituto commerciale per l'apporto di acidi grassi (Milledge, 2011). La specie *Phaeodactylum tricornerutum* sta riscontrando molto interesse viste le notevoli quantità prodotte di acido eicosapentaenoico e acido docosaesaenoico, acidi grassi omega-3 essenziali per lo sviluppo del sistema nervoso (Guesnet e Alessandri, 2011) e per evitare malattie come arteriosclerosi e trombosi (Dyerberg *et al.*, 1978). Anche in questo caso, tuttavia, l'utilizzo di microalghe come fonte di molecole ad alto

valore aggiunto è ancora limitato dagli alti costi di produzione e da rese troppo basse per impieghi di tipo industriale (Khan *et al.*, 2018).

La capacità di adattare il metabolismo ad ambienti differenti ed estremi rende le microalghe degli organismi funzionali al trattamento di acque reflue, abbattendo inquinanti come azoto, fosforo e carbonio organico. Le microalghe, infatti, utilizzano i composti organici presenti nei reflui per ottenere i nutrimenti necessari alla loro crescita. Tale processo può essere applicato sia ad acque di scarico di tipo urbano che industriale, escludendo acque con concentrazioni elevate di metalli e isotopi radioattivi. È possibile, inoltre, effettuare un consorzio di microalghe e batteri per attuare una *bioremediation*, ovvero una bonifica a carattere biologico di ambienti da metalli o sostanze chimiche (Pastore, 2016). Le microalghe necessitano di piccole concentrazioni di ioni metallici per la loro crescita, ma se le dosi presenti nell'ambiente sono eccessive compromettono il metabolismo della microalga e risultano essere tossiche. Tramite le interazioni che si sviluppano con i batteri, le microalghe riescono ad assimilare una quantità maggiore di metalli, riducendo la sensibilità a tali composti. Tale applicazione risulta molto performante anche per la degradazione di pesticidi, come DDT e atrazina (Fuentes *et al.*, 2016). Un ulteriore impiego in ambito ambientale delle microalghe interessa il trattamento di gas di scarico provenienti da industrie e centrali termoelettriche. Questi gas hanno un contenuto di anidride carbonica elevato, specialmente se proveniente da reazioni di combustione, che tramite questi organismi può subire un processo di bio-fissazione (Mata *et al.*, 2010). L'anidride carbonica è rimossa dal gas ed è impiegata come fonte di carbonio per la crescita della microalga. Questo procedimento può essere utilizzato anche con contenuti di anidride carbonica molto elevati e con la presenza di ossidi di azoto e zolfo (Zeiler *et al.*, 1995). La purificazione di gas di scarico tramite microalghe può sostituire i tradizionali metodi di rimozione di inquinanti, i quali necessitano di materiali adsorbenti che devono poi essere smaltiti o rigenerati (Mata *et al.*, 2010).

Un'importante applicazione delle microalghe, che è stata molto studiata e discussa nell'ultimo decennio, è la produzione di biocombustibili. La resa lipidica delle microalghe è molto maggiore rispetto alle tradizionali colture da olio che vengono utilizzate per la produzione di biocarburanti, come colza e palma, permettendo di ottenere rese elevate. Inoltre, le colture microalgali non richiedono terreno coltivabile per la loro produzione, fattore che rende il loro utilizzo eticamente ed economicamente non competitivo con le colture alimentari impiegate attualmente (Gris *et al.*, 2014). La produzione di biocarburanti tramite microalghe, però, non è ancora percorribile, poiché con le tecnologie attuali i costi non sono sostenibili industrialmente, rendendo totalmente sconveniente questo tipo di produzione rispetto a quella di combustibili di origine fossile (Chisti, 2013).

1.1.2 Problematiche della coltivazione su scala industriale

La maggior parte delle applicazioni precedentemente descritte sono limitate dagli elevati costi di produzione, dovuti a tecnologie non ancora mature e rese molto basse (Milledge, 2011). È quindi necessario studiare ed approfondire numerosi aspetti in modo da aumentare la produttività di biomassa e rendere così possibile la coltivazione microalgale su scala industriale. Tra le problematiche che devono essere affrontate per rendere competitiva la loro coltivazione, vi sono il miglioramento genetico delle specie per ottimizzare la capacità produttiva, il perfezionamento dei fotobioreattori e della trasmissione della luce, il trasferimento di materia in fase gas. La luce è un parametro fondamentale nella crescita delle microalghe, dato che fornisce l'energia necessaria alla loro crescita, ma, se presente in eccesso, può portare al danneggiamento delle cellule, riducendo l'efficienza fotosintetica e portando a stress ossidativo (Gris *et al.*, 2014). La radiazione luminosa è di primaria importanza anche per lo sviluppo di fotobioreattori performanti. L'elevata densità ottica che le microalghe raggiungono nei fotobioreattori causa delle grosse disomogeneità nella distribuzione della luce, specialmente negli strati più distanti dalla fonte luminosa: mentre le cellule in queste zone crescono in modo ridotto, le alghe nelle parti maggiormente esposte alla radiazione luminosa sono costrette ad utilizzare meccanismi di protezione, dissipando l'energia in eccesso. Questo duplice fenomeno porta ad un drastico calo dell'efficienza energetica e della produttività. È necessario sviluppare dei reattori con delle geometrie tali da minimizzare il percorso che la radiazione luminosa deve compiere, come dei reattori a piatto piano, dotati di uno spessore ridotto, molto inferiore rispetto alle altre due dimensioni. Tali reattori, però, non sono economicamente sostenibili su scala industriale (Gris *et al.*, 2014) ed è fondamentale, quindi, la ricerca di nuove soluzioni geometriche per aumentare produttività ed efficienza.

Nello svolgimento di questo lavoro di tesi è stata utilizzata la specie *Scenedesmus obliquus*, molto indicata per la produzione su scala industriale, grazie ad una crescita molto veloce ed alla capacità di immagazzinare una grande quantità di lipidi (Gris *et al.*, 2014). In Figura 1.1 sono rappresentate alcune cellule della microalga *Scenedesmus obliquus*.

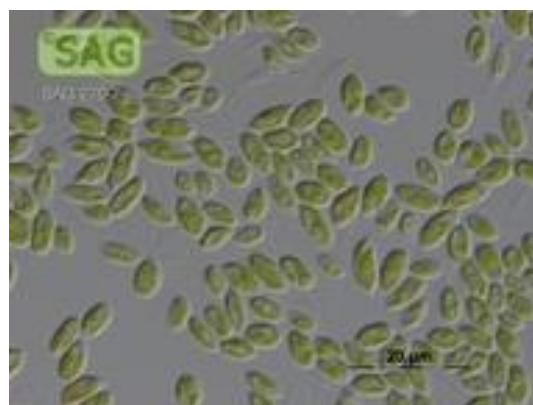


Figura 1.1: microalga *Scenedesmus obliquus* 276.7. (SAG).

1.2 I micro-fotobioreattori

Lo sviluppo di tecnologie che permettano la produzione su scala industriale di biomassa microalgale, in modo da poter essere utilizzata in numerose applicazioni a livello globale, può essere velocizzato dall'impiego di modelli matematici che riescano a descrivere in modo efficace l'impatto di variabili chiave, come la risposta fotosintetica delle alghe. Per rappresentare in modo adeguato un sistema molto articolato, il modello deve contenere al suo interno molte variabili. La validazione di tali modelli richiede, quindi, un numero molto elevato di dati, ottenuti tramite esperimenti molto lunghi e costosi, finalizzati a svolgere valutazioni discriminanti su aspetti come la scelta della specie di microalga, la configurazione del reattore e l'intensità della radiazione luminosa. Le tecnologie di micro-scala possono quindi fornire un contributo fondamentale nel raccogliere dati e nell'identificare l'influenza che i vari parametri esercitano sulla crescita cellulare. La riduzione a scala microscopica permette di ridurre i costi ed i tempi necessari per lo svolgimento degli esperimenti (Perin *et al.*, 2016), in modo da aumentare il loro numero e le possibili combinazioni di variabili, ottenendo quindi dei set di dati maggiormente completi.

Alla base dei micro-fotobioreattori vi sono le piattaforme microfluidiche, ovvero dei pozzetti collegati da micro-canali in cui verrà inoculata la microalga. Queste piattaforme vengono preparate in polidimetilsilossano (PDMS) tramite *replica molding*. In questo modo è possibile replicare tali dispositivi ed uniformare i vari esperimenti. Da un'analisi della letteratura scientifica è emerso che le piattaforme microfluidiche, inizialmente, sono state introdotte per investigare principalmente l'impatto della disponibilità dei nutrienti, mentre recentemente si è cercato di sviluppare piattaforme con cui sia possibile ricavare informazioni anche sulla crescita (Castaldello *et al.*, 2019). In Figura 1.2 è possibile osservare una piattaforma microfluidica: si possono notare i vari pozzetti, che identificano i micro-fotobioreattori, e i canali e microcanali di passaggio dei nutrienti.

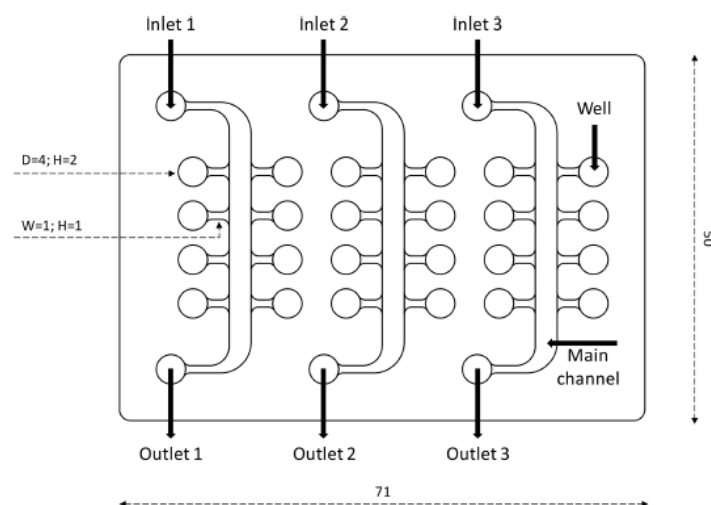


Figura 1.2: piattaforma microfluidica con la presenza di 24 pozzetti (Castaldello *et al.*, 2019).

Lo svolgimento di esperimenti su scala microscopica fornisce anche ulteriori vantaggi, come la possibilità di osservare la velocità di crescita della microalga, limitando gli effetti indesiderati che avvengono su scala di laboratorio, come l'agitazione della biomassa e i fenomeni di auto-ombreggiamento, ovvero l'ombra delle cellule che si trovano vicino alla luce esercitano su quelle poste nella parte posteriore del reattore. Tali fenomeni causano dei cicli di luce-buio che influenzano negativamente gli esperimenti svolti su scala di laboratorio, impedendo di individuare in modo corretto la risposta fotosintetica. I micro-fotobioreattori, in cui viene inoculata la microalga, permettono di ottenere uno strato molto sottile di biomassa in cui non si verifica il mescolamento e tale da limitare l'auto-ombreggiamento (Castaldello *et al.*, 2019). L'utilizzo di micro-fotobioreattori per la crescita di microalghe fa sorgere un problema molto importante: svolgere le analisi per monitorare la crescita utilizzando metodi invasivi (che necessitano di un campione della biomassa) non è possibile, poiché un prelievo di campione andrebbe a distruggere in modo irreversibile il contenuto del pozzetto. Diventa necessario, quindi, lo sviluppo di metodi alternativi e robusti per monitorare in modo efficace la crescita della microalga. I principali metodi fino ad ora proposti riguardano l'utilizzo della fluorescenza clorofilliana, tramite la quale si individuano delle correlazioni tra i parametri misurati e la concentrazione della biomassa. Tali misure vengono effettuate *in vivo*, inserendo la piattaforma microfluidica sotto il fluorimetro. Questa tecnica è stata utilizzata su diverse specie, come *Nannochloropsis gaditana* da Perin *et al.*, (2016) e *Scenedesmus obliquus* da Castaldello *et al.*, (2019). L'utilizzo della sola fluorescenza, però, si rivela essere non totalmente affidabile a causa dell'elevata rumorosità delle misure, dei limiti che si presentano nell'effettuare le misure *online* e dell'acclimatazione dell'alga. La fluorescenza della clorofilla, infatti, dipende fortemente dal contenuto dei pigmenti nelle cellule e differenze nell'acclimatazione nelle biomasse microalgali potrebbero portare a stime della concentrazione non affidabili e con errori elevati.

Un metodo alternativo ed integrativo per monitorare la crescita microalgale è l'utilizzo dell'analisi d'immagine multivariata.

1.3 Analisi d'immagine multivariata

Un'immagine è una rappresentazione visiva della realtà, sia fisica che astratta. Le immagini si distinguono in due categorie in base alla tecnologia con cui vengono acquisite: analogiche e digitali. Le immagini analogiche sono costituite da un dominio continuo, dove si ha un'impressione diretta, e non campionata, dell'oggetto da acquisire. L'estrazione di informazione dalle immagini continue avviene attraverso l'individuazione di una funzione matematica $f(x,y)$, dove x e y sono le due dimensioni dell'immagine, ma questa operazione può risultare altamente complicata se fa riferimento ad immagini raffiguranti oggetti complessi (Soprana, 2017). Per tale motivo si attua un processo di digitalizzazione delle immagini, tramite il quale si passa da un dominio continuo ad uno discreto, come rappresentato in Figura 1.3. Le

due dimensioni dell'immagine vengono discretizzate in m e n piccoli segmenti, formando in tal modo un numero $m \times n$ di quadratini, chiamati *pixel*. Il *pixel* è l'unità base dell'immagine digitale ed esso determina la risoluzione con cui l'immagine viene acquisita. I valori che solitamente si utilizzano nelle immagini digitali variano per m da 256 a 1024 e per n da 512 a 2048, a seconda della risoluzione necessaria per mantenere la riconoscibilità dell'oggetto. Risoluzioni troppo basse, infatti, potrebbero rendere difficile l'identificazione del soggetto desiderato, mentre risoluzioni troppo elevate potrebbero portare ad un appesantimento computazionale nella fase di elaborazione ed estrazione dell'informazione. La discretizzazione ha dimensione finita, cosa che rende possibile la memorizzazione all'interno del calcolatore, e si basa sulle potenze di due in modo da interagire ottimamente con la memoria di un calcolatore (Tomba, 2009).

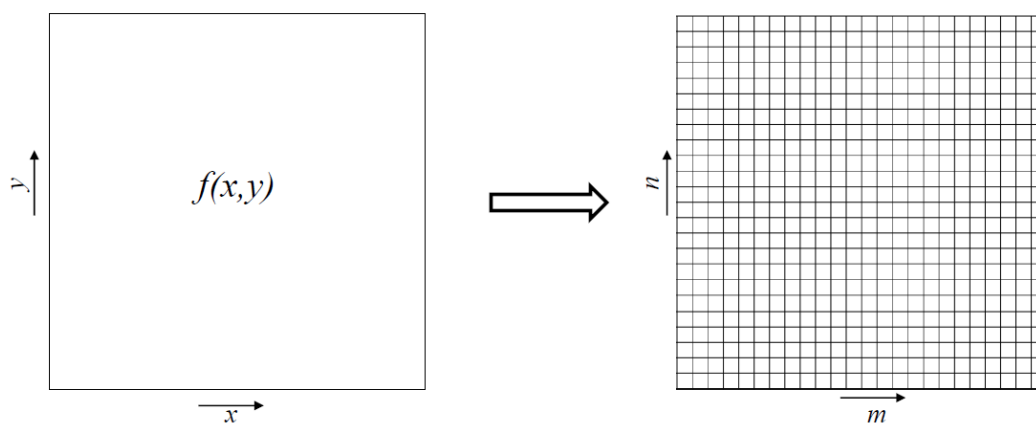


Figura 1.3: procedimento di digitalizzazione di un'immagine, passando da un dominio continuo ad uno discreto.

Inizialmente l'analisi d'immagine veniva applicata solamente su immagini in scala di grigi; oggi il suo impiego si è esteso anche alle immagini a colori, sfruttando le coordinate dei tre canali di colore (Prats-Montalbán *et al.*, 2011). L'analisi d'immagine fa parte di un campo più ampio conosciuto come *elaborazione d'immagine*, che comprende anche azioni differenti dall'estrazione di informazioni, come la pre-elaborazione dell'immagine, che permette di ottenere un miglioramento nella qualità della stessa.

L'analisi d'immagine multivariata è stata introdotta per elaborare le informazioni contenute in immagini che presentano più di un valore per *pixel*, come per esempio le immagini a colori, dove sono presenti i canali di rosso, verde e blu (RGB). Inizialmente vengono considerati individualmente i singoli *pixel*, andando ad elaborare l'informazione contenuta in ognuno di essi, e successivamente l'immagine viene riportata attraverso una matrice tridimensionale ($m \times n \times \text{RGB}$), dove sulle dimensioni principali sono presenti le coordinate dei *pixel*, mentre sulla terza dimensione appaiono i tre canali di colore. In immagini ad alta risoluzione, tale matrice può avere una dimensione molto elevata e contenere una notevole quantità d'informazione. Per tale motivo uno strumento molto utilizzato è l'analisi delle componenti principali (PCA), che

va ad individuare nuove variabili che riescono a descrivere la maggior varianza possibile. Tale metodo permette un'efficace riduzione del set di dati, mantenendo però inalterata la quantità e la qualità dell'informazione contenuta nell'immagine (Prats-Montalbán *et al.*, 2011). Un metodo predittivo molto utilizzato è la regressione dei minimi quadrati parziali (PLS), che permette di rapportare due set di dati attraverso un modello lineare (Facco, 2014). In tal modo è possibile calibrare il modello servendosi dell'informazione fornita da una parte dell'immagine e stimare la variabile desiderata sulla restante parte di *pixel*, confrontando l'informazione in essa contenuta con la calibrazione precedentemente effettuata.

1.4 Obiettivi della tesi

Il lavoro svolto in questa ricerca si propone di testare e verificare un nuovo metodo di monitoraggio per la crescita di biomassa microalgale basato su metodi di analisi d'immagine multivariata. Tale metodo viene affiancato a classiche misure di fluorescenza clorofilliana, in modo da combinare le informazioni ottenute e raggiungere una maggior precisione nella stima della concentrazione microalgale. Lo sviluppo di questo metodo permetterebbe di monitorare *online* la crescita della microalga e potrebbe rendere possibile lo svolgimento di esperimenti utilizzando micro-fotobioreattori, in modo da ottenere una maggiore quantità di dati in minor tempo e in modo da ridurre i costi degli esperimenti.

Capitolo 2

Materiali e Metodi

Nella prima parte di questo capitolo viene presentato l'apparato sperimentale per la crescita e il monitoraggio di colture microalgali, descrivendo anche le modalità di acquisizione delle informazioni necessarie per i successivi test, i protocolli e le tecniche analitiche impiegate e le procedure sperimentali. Nella seconda parte vengono descritti i metodi matematici applicati agli esperimenti.

2.1 Strumentazioni e procedure

Gli esperimenti sono stati svolti utilizzando sempre gli stessi strumenti, le stesse procedure sperimentali e le stesse tecniche analitiche al fine di garantire consistenza ed uniformità dei risultati.

2.1.1 Sistemi di crescita microalgale

La specie di microalga utilizzata per lo svolgimento degli esperimenti è *Scenedesmus obliquus* 276.7 (SAG-Goettingen), coltivata in terreno BG11 (Rippka *et al.*, 1979), modificato con aggiunta di HEPES 10 mM per evitare l'acidificazione dovuta alla somministrazione di CO₂ (Gris *et al.*, 2014). La crescita della coltura pre-inoculo avviene all'interno di reattori sterili di vetro a bottiglia, posizionati all'interno di un incubatore, alla temperatura di 23±1°C. Le bottiglie sono continuamente mescolate tramite agitatore magnetico e sono insufflate con una miscela di aria arricchita con un 5% v/v di CO₂.

Un campione a concentrazione nota viene prelevato in fase esponenziale e viene inoculato all'interno di un fotobioreattore a piatto piano, rappresentato in Figura 2.1, di 1.2 cm di spessore. La conformazione del reattore permette di ottenere una superficie di esposizione alla luce maggiore e di ridurre la sovrapposizione delle microalghe rispetto al reattore a bottiglia. Le pareti del reattore sono in policarbonato, materiale trasparente che permette il maggior passaggio di fotoni (Gris *et al.*, 2014). Tale fotobioreattore presenta uno *sparger* sul fondo che permette il passaggio della miscela aria-CO₂ ed aiuta la movimentazione della microalga. Il *mixing* viene attuato attraverso un'ancoretta magnetica posta sulla parete posteriore del reattore. Il terreno e tutti i materiali utilizzati sono precedentemente sterilizzati in autoclave per 20 minuti alla temperatura di 121°C per evitare ogni possibile contaminazione.

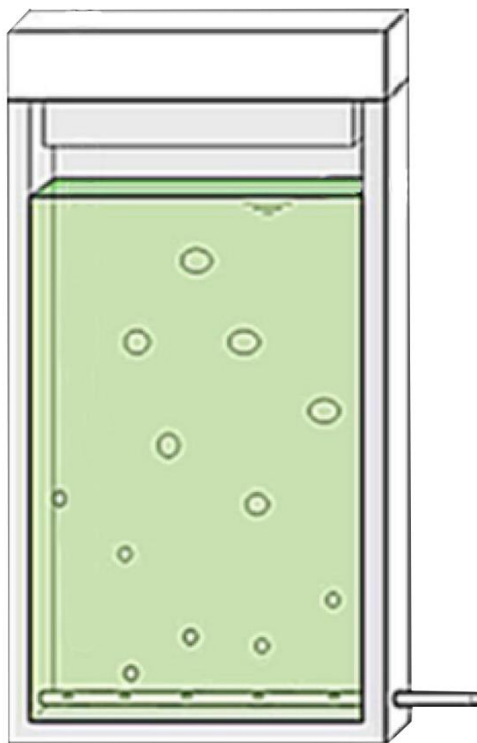


Figura 2.1: rappresentazione del fotobioreattore a piatto piano. Adattato da De Farias Silva (2016).

I fotobioreattori, nel corso degli esperimenti, sono stati sottoposti ad intensità di luce costanti in un range da 35 a 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, misurata con un fotoradiometro (HD 2012.1, Delta Ohm). Per le medie e basse intensità luminose (da 35 a 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) è stato utilizzato un pannello led (SMD2835, Silamp), mentre per le intensità maggiori è stata utilizzata una lampada a LED (Light Source SL3500, Photon System Instruments, Repubblica Ceca).

2.1.2 Tecniche analitiche

La microalga è stata monitorata quotidianamente, sia per valutare lo stato di crescita e di salute della stessa, sia per ottenere i dati necessari allo svolgimento delle analisi successive.

2.1.2.1 Densità ottica

La misura della densità ottica (OD, *optical density*) è stata effettuata tramite uno spettrofotometro (UV-1900 UV-Visible Spectrophotometer, Shimadzu), utilizzando circa 1.5 mL di campione, con il quale si misura l'assorbanza alla specifica lunghezza d'onda di 750 nm. A questa lunghezza d'onda non vi è assorbimento di fotoni da parte della clorofilla, permettendo così di misurare l'assorbanza delle sole cellule presenti nel campione (Pastore, 2016). L'errore di misurazione dello strumento è uguale a ± 0.002 assorbanza.

2.1.2.2 Conta cellulare

La misura di concentrazione cellulare è stata eseguita tramite conta cellulare con microscopio ottico. Per lo svolgimento di tale analisi viene impiegata una camera di conta Burkler (HGB, Germania). Tale strumento consiste in un supporto in vetro su cui sono incisi dei quadrati, secondo lo schema riportato in Figura 2.2. La conta viene effettuata per linee nei quadrati evidenziati nella figura e, dopo aver sommato le cellule delle righe di un singolo quadrato viene effettuata la media. Per il calcolo della concentrazione cellulare si applica l'equazione:

$$Conc \left[\frac{mln \text{ cell}}{mL} \right] = media \text{ quadrati} \cdot 10^4 \cdot diluizione \quad (2.1)$$

Per ridurre il più possibile l'errore è consigliabile lavorare avendo un numero di cellule per riga di 100 o di poco inferiore. Quindi, è necessario diluire con acqua distillata se tale numero risulta maggiore (Pastore, 2016).

Ogni camera Burkler è costituita da due aree come quella rappresentata in Figura 2.2, quindi la conta viene effettuata due volte e poi mediata. Tale misura risulta molto importante, dato che i metodi matematici successivamente applicati serviranno per predire la concentrazione cellulare della microalga. La conta cellulare presenta un errore, che dipende dalla diluizione applicata, in un range di 1-10%, come indicato da Sforza (2019).

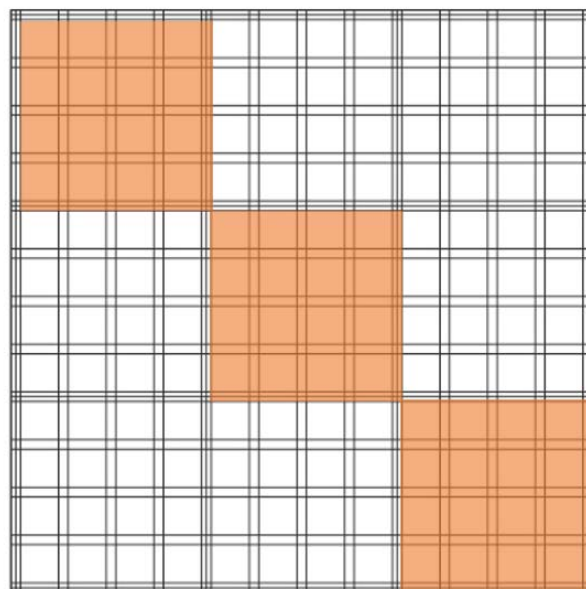


Figura 2.2: rappresentazione della costituzione dei quadrati di una camera Burkler. Le zone colorate indicano i quadrati dove si effettua la conta cellulare.

2.1.2.3 Peso secco

La valutazione del peso secco permette di valutare la quantità di biomassa presente in un determinato volume. Per lo svolgimento dell'analisi si preleva un campione di microalga dal fotobioreattore a piatto piano che viene filtrato tramite dei filtri in cellulosa con diametro dei pori uguale a 0.45 μm , precedentemente inseriti in forno per 15 minuti a 105°C per far evaporare tutta l'umidità in essi contenuta. In tal modo è possibile ottenere la tara derivante dal peso del filtro. In seguito alla filtrazione, il filtro viene posto in forno per almeno due ore ad una temperatura di 105°C ed è quindi possibile andare a misurare il peso lordo. Il valore della quantità di biomassa per unità di volume è calcolabile con l'equazione (Pastore, 2016):

$$\text{Peso secco} \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{peso lordo} - \text{tara}}{\text{volume}} \quad (2.2)$$

Il calcolo del valore del peso secco è stato svolto solamente all'ultimo giorno di ogni esperimento. La bilancia con cui sono state effettuate le misurazioni presenta un errore uguale a ± 0.0001 g.

2.1.2.4 Misura pH

La misura del pH è stata svolta quotidianamente, andando a valutare il valore del pH all'interno del reattore verificando che sia tra 7 e 8, range ottimale di crescita per *S. obliquus* (Gris *et al.*, 2014). Per la misura è stato utilizzato un pHmetro portatile (HI 9124, Hanna). L'errore dello strumento è uguale a ± 0.02 .

2.1.2.5 Valutazione del contenuto di pigmenti

Per l'estrazione dei pigmenti è stato utilizzato un protocollo a caldo come indicato da Gris *et al.* (2014). Tale protocollo prevede l'utilizzo di un campione fresco contenente 10 milioni di cellule. Inizialmente il campione viene centrifugato alla velocità di 14500 giri al minuto per 10 minuti, in modo da separare il pellet dal surnatante, che viene eliminato. Successivamente si introduce nel pellet una punta di spatola di polvere di quarzo che, con l'ausilio di un pestello da eppendorf, permette la rottura delle pareti cellulari consentendo la solubilizzazione dei pigmenti. Per l'estrazione viene utilizzato come solvente il dimetilsolfossido (DMSO); 100 μl di DMSO vengono aggiunti durante la fase di pestellatura, mentre i restanti 400 μl vengono aggiunti al termine di tale fase. Il campione viene quindi incubato in forno per 15 minuti a 60°C, in modo da consentire la completa rottura delle pareti cellulari. Al termine dell'incubazione si centrifuga nuovamente a 14500 giri al minuto per 10 minuti e si rimuove il solvente, separandolo dal pellet depositatosi sul fondo. Dall'aggiunta di solvente è necessario operare in

condizioni di buio per evitare che la luce vada a degradare i pigmenti estratti. La quantificazione del contenuto di pigmenti avviene per via spettrofotometrica, analizzando lo spettro a lunghezze d'onda da 350 nm a 750 nm ed utilizzando cuvette in quarzo. Vengono calcolate le concentrazioni di clorofilla a (Chl a), clorofilla b (Chl b) e dei carotenoidi (Car) utilizzando l'assorbanza alle lunghezze d'onda di 480, 649 e 665 nm e le equazioni fornite dal lavoro di Wellburn (1994). Le equazioni 2.3 e 2.4 si riferiscono al calcolo della concentrazione di clorofilla a e clorofilla b, mentre l'equazione 2.5 fa riferimento al calcolo della concentrazione dei carotenoidi.

$$Chl\ a = 12.19 \cdot A_{665} - 3.45 \cdot A_{649} \quad (2.3)$$

$$Chl\ b = 21.99 \cdot A_{649} - 5.32 \cdot A_{665} \quad (2.4)$$

$$Car = (1000 \cdot A_{480} - 2.14 \cdot Chl\ a - 70.16 \cdot Chl\ b)/220 \quad (2.5)$$

La valutazione del contenuto dei pigmenti è stata effettuata su due campioni, facendo poi la media dei valori ottenuti. In Figura 2.3 è presentato un esempio di spettro delle clorofille.

Figura 2.3: esempio di spettro delle clorofille. Le due linee si riferiscono ai differenti campioni prelevati lo stesso giorno dallo stesso reattore.

2.1.3 Micro fotobioreattori

Campioni di coltura provenienti dai reattori a piatto piano, vengono trasferiti giornalmente in micro-fotobioreattori di recente sviluppo (*micro-photobioreactors*, mPBR) (Castaldello *et al.*, 2019). Il supporto su cui sono presenti i pozzetti, che fungono da micro-reattori, è una piattaforma microfluidica, progettata con un software CAD ed è presentata in Figura 2.4. Il supporto ha dimensioni 50×71 mm ed è composto da tre canali principali a base quadrata, in cui viene fatto fluire il terreno necessario al nutrimento della microalga. Questi canali presentano un'entrata ed un'uscita, garantendo così la possibilità di svolgere anche esperimenti a flusso continuo. I canali principali sono caratterizzati da un canale di collegamento, a base quadrata, con otto micro-reattori ciascuno, disposti su due file da quattro. Con questo design ogni micro-fotobioreattore risulta essere indipendente, consentendo di osservare ogni pozzetto come un singolo esperimento. Ogni micro-fotobioreattore ha un diametro di 4mm e una profondità di 2mm, avendo così un volume di $20\mu\text{L}$ (Castaldello *et al.*, 2019). In questa applicazione, la piattaforma microfluidica non è stata utilizzata per la crescita della coltura microalgale, ma solo per simulare dei micro-fotobioreattori con concentrazione nota.

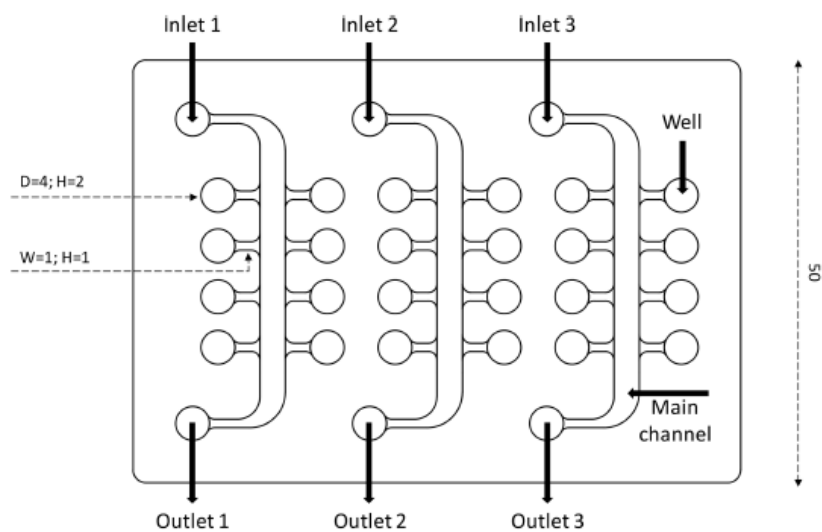


Figura 2.4: geometria della piattaforma microfluidica progettata attraverso un software CAD. (Castaldello *et al.*, 2019)

La preparazione delle piattaforme microfluidiche avviene tramite uno stampo progettato attraverso un software CAD e stampato in materiale WaterShed XC 11122 (Proto Labs Ltd, U.K.). Le piattaforme microfluidiche sono preparate in polidimetilsilossano (McDonald e Whitesides, 2002), materiale ideale per la preparazione di tale dispositivo poiché trasparente, caratteristica necessaria per la coltivazione delle microalghe, ed inerte rispetto al materiale biologico contenuto all'interno (Kuncová-Kallio e Kallio, 2006). Il polidimetilsilossano (PDMS) è composto dal prepolimero Sylgard 184 (Dow Corning) e dall'agente reticolante, preparati in una miscela 10:1 in peso, che viene inserita in un degasatore in modo da rimuovere

le bolle di aria formatesi nella fase di miscelazione. Successivamente la miscela viscosa viene versata nello stampo della piattaforma microfluidica, la quale viene sottoposta nuovamente alla rimozione delle bolle di aria tramite degasatore dato che quest'ultime, se intrappolate nella miscela, porterebbero ad una riduzione delle proprietà ottiche della piattaforma. Lo stampo, con la miscela al suo interno, viene quindi posto in forno a 50°C per tre ore per far avvenire il processo di reticolazione del polimero. Al termine della reticolazione, la piattaforma microfluidica viene separata dallo stampo ed è pronta ad essere utilizzata. Con la stessa procedura, viene prodotto anche un tappo di spessore di 1mm che viene posto sopra la piattaforma durante gli esperimenti, evitando possibili contaminazioni ed impedendo l'evaporazione del fluido contenuto (Castaldello *et al.*, 2019).

2.1.4 Misure di fluorescenza

2.1.4.1 Fluorimetro

Il fluorimetro è uno strumento utilizzato per la misurazione di diversi parametri della fluorescenza nello spettro del visibile. Il fluorimetro usato per le analisi è OpenFluorCam® FC 800 di tipologia aperta, come mostrato in Figura 2.5, prodotto da Photon System Instruments (Repubblica Ceca). Tale strumento è stato impiegato per effettuare delle misurazioni inerenti alla fluorescenza clorofilliana.

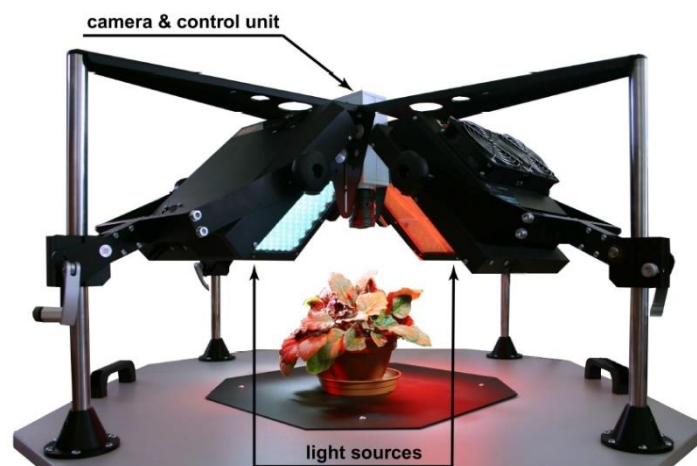


Figura 2.5: fluorimetro Fluorcam® di tipologia aperta utilizzato per le analisi (PSI, 2012).

La clorofilla è una pigmento-proteina complessa presente all'interno dei fotosistemi II e nei complessi antenna contenuti nella membrana tilacoidale del cloroplasto. Tale molecola risulta fondamentale nel processo di fotosintesi in quanto facilita la conversione della radiazione solare assorbita in energia chimica (Duysens, 1964). L'energia luminosa assorbita dalla clorofilla può portare a tre diversi processi in competizione tra loro: reazione di fotosintesi (processo fotochimico), emissione di radiazione luminosa (processo di fluorescenza) ed emissione sotto

forma di calore (processo di *quenching* non fotochimico, NPQ) come indicato da Murchie e Lawson (2013). L'emissione di calore è un meccanismo di fotoprotezione della microalga, che con tale processo evita la ossidazione dovuta ad un assorbimento eccessivo di radiazione luminosa. L'analisi della fluorescenza della clorofilla tramite fluorimetro è una tecnica non invasiva e permette di ottenere numerose informazioni sullo stato della microalga, in particolare sulla resa quantica dei sistemi fotosintetici e sulla dissipazione di calore.

Vi sono diversi parametri di interesse che vengono descritti di seguito utilizzando le definizioni di Murchie e Lawson (2013) e del manuale del fluorimetro fornito da PSI (2012):

- F_0 , valore minimo della fluorescenza della clorofilla ottenuto in uno stato di adattamento all'assenza di luce. I fotosistemi II sono aperti e non è presente NPQ.
- F_M , valore massimo della fluorescenza della clorofilla ottenuto applicando un impulso di luce che va a saturare i fotosistemi II della microalga adattata al buio.
- F_V , è calcolato come la differenza tra F_0 e F_M .
- F_V/F_M , è la massima resa quantica dei fotosistemi II in uno stato di adattamento al buio. Tale parametro funge da indicatore dello stato di salute della microalga, quantificandone lo stress luminoso subito. Il range ottimale della massima resa quantica va da 0.7 a 0.8.
- NPQ_x , calcolato come $(F_M - F_{M,x})/F_{M,x}$, dove $F_{M,x}$ sono i valori di massima fluorescenza allo stato x , che può essere di adattamento alla luce, di adattamento al buio oppure stato stazionario. Le varie misure vengono effettuate a seguito di un impulso luminoso molto intenso, che verrà quantificato nel paragrafo §2.1.4.2. Il valore di NPQ fornisce indicazioni sulle perdite di energia tramite calore da parte del fotosistema II.

Per lo sviluppo del protocollo eseguito dallo strumento è stato utilizzato il software Fluorcam7[®], fornito da PSI.

2.1.4.2 Protocollo

I test con il fluorimetro vengono svolti quotidianamente e seguono un protocollo che rimane invariato. Precedentemente lo svolgimento dell'analisi, le piattaforme microfluidiche vengono mantenute per 20 minuti al buio, in modo da scaricare completamente gli apparati fotosintetici e permettere le misure dei parametri in uno stato adattato all'assenza di luce. Il protocollo utilizzato è *Quenching Act2*, fornito dal software Fluorcam7[®], che si basa sull'utilizzo della luce attinica 2 (*Act2*), modificando però i valori di intensità e sensibilità del sistema. Tale protocollo si basa su due tipi di luce differenti. La prima è una luce attinica, mentre la seconda è la luce *Super*, che fornisce degli impulsi luminosi molto brevi (*pulse*), che vanno a saturare l'apparato fotosintetico. I valori scelti per i parametri sono i seguenti:

- Otturatore elettronico (*shutter*), 1, ovvero un'apertura dell'otturatore uguale a 20 μ s
- Sensibilità della fotocamera (*Sensitivity*), 5, in una scala da 0 (minima sensibilità) a 100 (massima sensibilità)
- Luce attinica (*Act2*), 45, valore equivalente a 1150 μ mol m⁻² s⁻¹

- Impulsi (*Super*), 35, valore equivalente a $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Il fluorimetro presenta un sistema di calcolo basato su un'iniziale misura del rumore, la successiva misura del parametro tramite un breve flash, con emissione nel rosso lontano, e la successiva sottrazione tra le due misure. La misurazione ha una durata di 40 ms, di cui 20 ms sono necessari alla misura del rumore di fondo e i restanti per la misura del valore effettivo. La sottrazione necessita anch'essa di 20 ms. Tale sistema di misura, impiegando i flash, viene definito PAM, *Pulse Amplitude Modulated*. L'acquisizione delle immagini da parte del fluorimetro avviene al termine della fase di misurazione; a seconda del parametro quantificato e dal numero di misure effettuate, l'immagine può essere basata sulla misura massima calcolata o sulla media delle varie misure. Il protocollo ha una durata totale di 193 s, la cui descrizione dettagliata viene presentata di seguito:

- $t=0$ s: ciclo di misurazione del parametro F_0 , con durata 5 s e con un periodo di misurazione uguale a 1 s.
- $t=5$ s: impulso luminoso di durata 800 ms in cui la luce attinica e la luce *Super* si accendono allo stesso istante. Tale impulso permette di effettuare la misurazione del parametro F_M .
- $t=6$ s: prima fase di buio, in cui si vanno a rilassare gli apparati fotosintetici della microalga ed in questo intervallo non viene effettuata alcuna misurazione.
- $t=23$ s: fase di esposizione attinica di durata 70 s; in questa fase sono presenti degli impulsi luminosi *Super* ai tempi $t=31$ s, $t=41$ s, $t=51$ s, $t=71$ s e $t=91$ s, i quali permettono la misurazione dei valori di F_M riferiti alle varie luci. Gli impulsi hanno una durata di 800 ms e la misurazione ha inizio dopo 400 ms dall'attivazione della luce *Super*. Per 360 ms vi è un'unica misurazione, supportata da un flash di durata 20 ms ogni 20 ms. I valori calcolati, in ordine di tempo, sono $F_{M,L1}$, $F_{M,L2}$, $F_{M,L3}$, $F_{M,L4}$ e $F_{M,L55}$, ovvero la misurazione di F_M allo stato stazionario (il pedice *L* indica che la misura è presa dopo l'impulso luminoso (*light*)).
- $t=93$ s: seconda fase di buio, che dura fino alla fine del protocollo. In questo intervallo di tempo vengono valutati i parametri di F_M riferiti alle varie fasi di buio. A $t=121$ s, $t=151$ s e $t=181$ s si attivano degli impulsi luminosi *Super* di durata 800 ms, durante i quali vengono effettuate le misure. La misura inizia 400 ms dopo l'avvio dell'impulso ed ha una durata di 360 ms. La misura, in questo intervallo di tempo, è continua ed è supportata dall'attivazione di un flash di durata 20 ms ogni 20 ms. I parametri osservati in questa fase sono $F_{M,D1}$, $F_{M,D2}$ e $F_{M,D3}$ (il pedice *D* indica che la misura è stata presa a seguito di una fase di buio (*dark*)).

Dai valori calcolati durante questo protocollo, il software elabora poi i restanti parametri di interesse, secondo le equazioni descritte nel paragrafo §2.1.4.1.

2.1.5 Acquisizione di immagini

L'acquisizione delle fotografie necessarie per lo svolgimento dell'analisi d'immagine è stata effettuata tramite un apposito ambiente standardizzato, costruito recentemente per lo sviluppo di altri esperimenti. L'ambiente è di forma cubica, di cui 5 facce sono costituite da un materiale multistrato nero a base di legno montate su un supporto in alluminio. Sulla faccia rimanente è presente un supporto per poter installare la macchina fotografica e mantenerla in posizione durante l'acquisizione delle immagini. Il box è illuminato da due file di LED che permettono un'illuminazione omogenea all'interno della struttura, evitando così ombreggiamenti. Il modello di fotocamera utilizzata per scattare le fotografie è LUMIX DMC-TZ57 (Panasonic, Giappone), dotata di un sensore MOS ad alta sensibilità da 16 megapixel.

2.1.6 Procedure sperimentali per la crescita ed il monitoraggio

Gli esperimenti sono stati svolti con delle procedure mantenute costanti, in modo da garantire consistenza tra i risultati dei vari esperimenti.

La microalga *Scenedesmus obliquus* 276.7 è stata inizialmente inoculata, utilizzando come terreno BG11 standard, in una beuta sottoposta ad un'intensità luminosa costante, in modo che potesse mantenersi e riprodursi. Successivamente, in un reattore di vetro a bottiglia viene introdotto un volume di 150 mL, contenente una concentrazione di microalga di 5 milioni di cellule per millilitro. Tale reattore costituisce il pre-inoculo, che viene cresciuto ad un'intensità luminosa costante pari a $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per 72 ore in *batch* in modo da permettere alla microalga di crescere con anidride carbonica. Una conta cellulare tramite camera Burkner viene effettuata al termine di tale periodo in modo da verificare la crescita della microalga. Dal pre-inoculo viene prelevata una quantità che permetta di ottenere, in seguito ad una diluizione con terreno, un volume di 150 mL a concentrazione cellulare uguale a 5 milioni mL^{-1} . Questo volume viene successivamente inoculato nel fotobioreattore a piatto piano con spessore di 1.2. Gli esperimenti sono effettuati su tale apparecchiatura. Il fotobioreattore viene collegato ad un flusso di aria- CO_2 pari a 0.055 L min^{-1} , avente un contenuto di anidride carbonica del 5%. Sono stati svolti esperimenti a tre intensità luminose differenti:

- $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intensità bassa)
- $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intensità media)
- $950 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intensità alta).

Per ogni intensità luminosa sono state svolte due repliche, in modo da poter confrontare la consistenza dei dati e per avere maggiori informazioni per verificare la robustezza del metodo di predizione. Tutti gli esperimenti svolti hanno una durata di 5 giorni in condizioni *batch*, ove il primo giorno viene definito come *giorno 0*. Tutte le procedure analitiche e le analisi di crescita vengono svolte quotidianamente, ad eccezione della valutazione del peso secco, che viene

effettuata solo a fine curva, ovvero al termine dell'esperimento. Le analisi vengono effettuate tramite un prelievo giornaliero di circa 10 mL, effettuato sotto cappa biologica in modo da evitare possibili contaminazioni del reattore.

L'acquisizione delle foto ed i test al fluorimetro vengono svolti ogni giorno per l'intera durata dell'esperimento. I microreattori della piattaforma microfluidica vengono riempiti con il campione prelevato dal fotobioreattore e con sue cinque differenti diluizioni, aventi ognuna una diversa concentrazione di microalga; ogni piattaforma è costituita da 24 pozzetti, quindi ogni diluizione sarà presente in 4 di essi. La posizione delle diluizioni è casuale all'interno della piattaforma e varia per ogni campionamento, in modo da aumentare la robustezza del modello predittivo. Le diluizioni del campione tale quale sono preparate in modo da avere tra loro un preciso rapporto di proporzionalità, che di seguito viene esposto:

1. Tale quale, con la medesima concentrazione del fotobioreattore
2. Diluizione 1, con una concentrazione pari a $5/6$ della concentrazione tale quale
3. Diluizione 2, con una concentrazione pari a $4/5$ della concentrazione della diluizione 1
4. Diluizione 3, con una concentrazione pari a $3/4$ della concentrazione della diluizione 2
5. Diluizione 4, con una concentrazione pari a $2/3$ della concentrazione della diluizione 3
6. Diluizione 5, con una concentrazione pari a $1/2$ della concentrazione della diluizione 4.

Le diluizioni sono state effettuate aggiungendo terreno BG11 standard.

Il posizionamento della piattaforma microfluidica all'interno del box foto avviene manualmente, cercando di mantenere la posizione il più costante possibile, per evitare differenze nei riflessi delle varie foto. In prossimità della piattaforma vengono posti un calibro, che funge da riferimento geometrico all'interno dell'immagine, e il bianco di riferimento. I parametri della macchina fotografica impiegati per l'acquisizione delle immagini sono i seguenti:

- Qualità, alta
- ISO 100
- Apertura del diaframma, 6.3
- Esposizione, $1/50$ s
- Ingrandimento, 3.5x.

2.2 Metodi matematici

I dati ottenuti dallo svolgimento degli esperimenti sono stati analizzati utilizzando dei metodi matematici, con lo scopo di verificare la consistenza dei dati stessi e con lo scopo di predire la concentrazione delle microalghe.

2.2.1 Masking

Le immagini acquisite con la fotocamera hanno una dimensione di 3456×4608 , ovvero contengono circa 16 milioni di pixel. La maggior parte dei pixel sono necessari a rappresentare parti dell'immagine, come la piattaforma microfluidica e la parete del box, che risultano essere totalmente irrilevanti ai fini delle analisi da svolgere. Per ridurre il numero di pixel da analizzare e per ridurre quindi il tempo necessario per la parte computazionale, è stata sviluppata una maschera software. In Figura 2.6 vengono presentate l'immagine iniziale, la maschera software creata e la sua applicazione per ridurre il numero di pixel da analizzare.

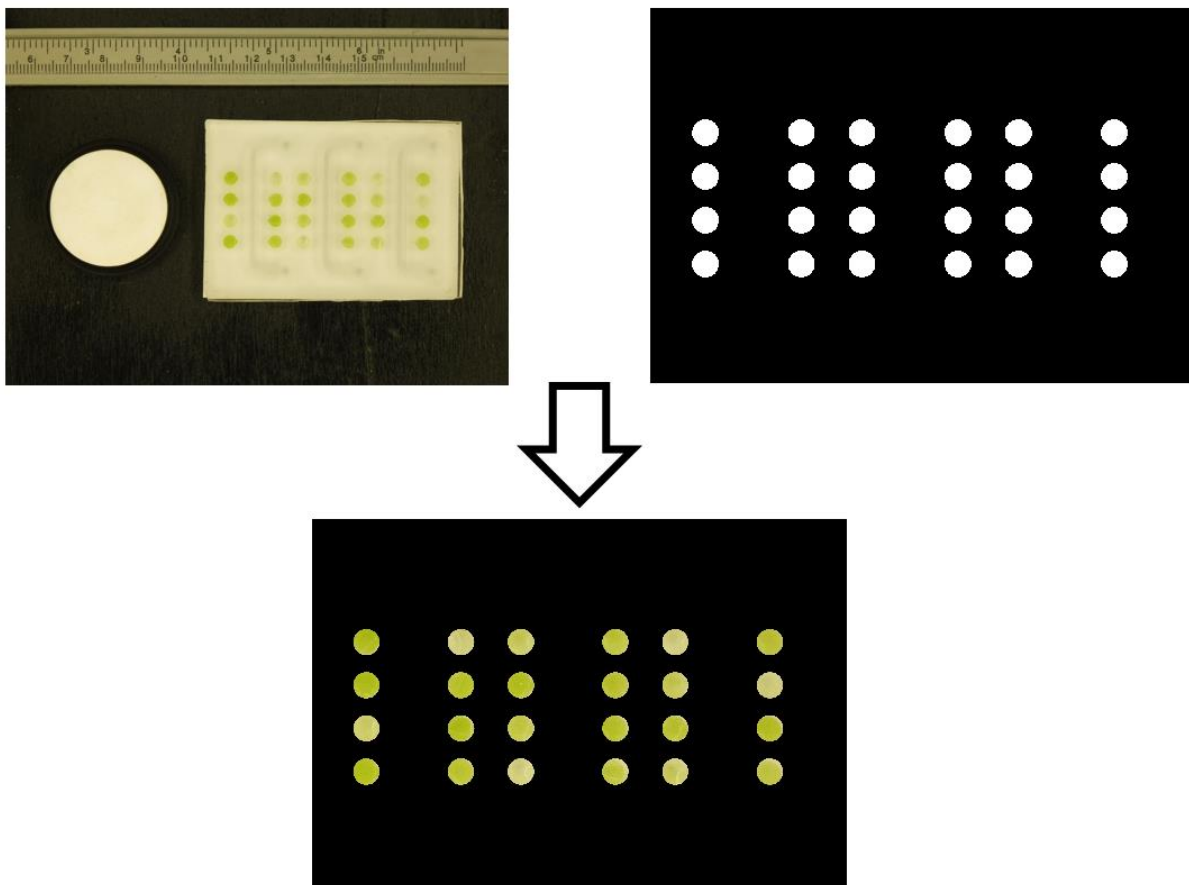


Figura 2.6: esempio di applicazione della maschera software. La maschera viene applicata all'immagine acquisita tramite fotocamera in modo da ridurre il numero totale di pixel da analizzare.

La maschera è costituita da una matrice booleana, che assume valore 1 in corrispondenza dei pixel all'interno del pozzetto, mentre per i restanti pixel assume valore 0. Andando a moltiplicare il valore dei canali RGB di ogni singolo pixel per il corrispondente valore della maschera nella medesima coordinata, si ottiene un'immagine in cui sono rappresentati solamente i pozzetti presenti sulla piattaforma di supporto. La maschera software è stata sviluppata a seguito dell'identificazione manuale della posizione dei pozzetti, andando a

valutare le coordinate dei centri e la lunghezza dei raggi dei microreattori. Questo metodo permette di ridurre il numero di pixel analizzati da 16 milioni a poche centinaia di migliaia.

2.2.2 Analisi delle componenti principali (PCA)

L'analisi delle componenti principali (Jackson, 1980) è uno strumento che permette la riduzione della quantità di dati necessari, mantenendo però l'informazione rilevante, grazie all'individuazione di combinazioni lineari delle variabili originali (componenti principali) che descrivono la maggior variabilità dei dati.

Data una matrice \mathbf{X} composta da m righe ed n colonne, dove ogni riga rappresenta un campione ed ogni colonna rappresenta una variabile, la PCA decompone tale matrice in un numero r di vettori \mathbf{t}_i e \mathbf{p}_i (Jackson, 1980). Si ottiene quindi l'equazione:

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1 \cdot \mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2 \cdot \mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_r \cdot \mathbf{p}_r^T \quad (2.6)$$

dove r è il rango della matrice ed è minore delle dimensioni della matrice \mathbf{X} . Le coppie \mathbf{t}_i e \mathbf{p}_i sono ordinate secondo la quantità di varianza catturata e sono indicate rispettivamente come *scores* e *loadings*. Gli *scores* forniscono informazioni su come sono correlati tra loro i vari campioni, mentre i *loadings* si riferiscono alle relazioni che intercorrono tra le variabili. I modelli PCA vengono solitamente troncati dopo un certo numero di variabili, andando a generare una matrice dei residui \mathbf{E} . Il modello assumerà quindi la forma descritta nell'equazione:

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1 \cdot \mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2 \cdot \mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_h \cdot \mathbf{p}_h^T + \mathbf{E} \quad (2.7)$$

Come indicato da Prats-Montalbán *et al.*, (2011) questo modello è alla base della PCA applicata all'analisi di immagine multivariata.

Le immagini su cui viene applicato il modello sono a colori e ogni pixel presenta quindi i 3 canali di colore RGB. La PCA viene quindi applicata considerando tutti i pixel dell'immagine come righe di una matrice, mentre i canali di colore vanno a costituire le colonne. Per integrare le informazioni ottenute dal colore alle informazioni fornite dalle *texture* dell'immagine è stato applicato un procedimento eseguito da Prats-Montalbán *et al.*, (2011). Come campione della matrice \mathbf{X} non viene considerato solo il pixel posto in posizione (i,j) , ma si considerano anche i pixel che lo circondano. In questo modo il singolo *score* conterrà l'informazione del pixel analizzato e di quelli intorno ad esso. Nelle analisi svolte è stata considerata una matrice 3×3 , andando ad analizzare solo gli 8 pixel adiacenti. I 9 pixel sono stati affiancati, posizionando i vari canali di colori lungo un'altra direzione, ottenendo così una matrice 3 canali \times 9 pixel. I canali vengono successivamente affiancati in modo da creare il singolo *score*, che avrà dimensione 1×27 . Il procedimento effettuato viene rappresentato in Figura 2.7. La matrice \mathbf{X}

ha una dimensione pari a $(i-2 \times j-2)$ pixel \times 27 canali: i pixel presenti sul bordo dell'immagine non vengono calcolati nel modello PCA poiché su un lato non presentano pixel adiacenti.

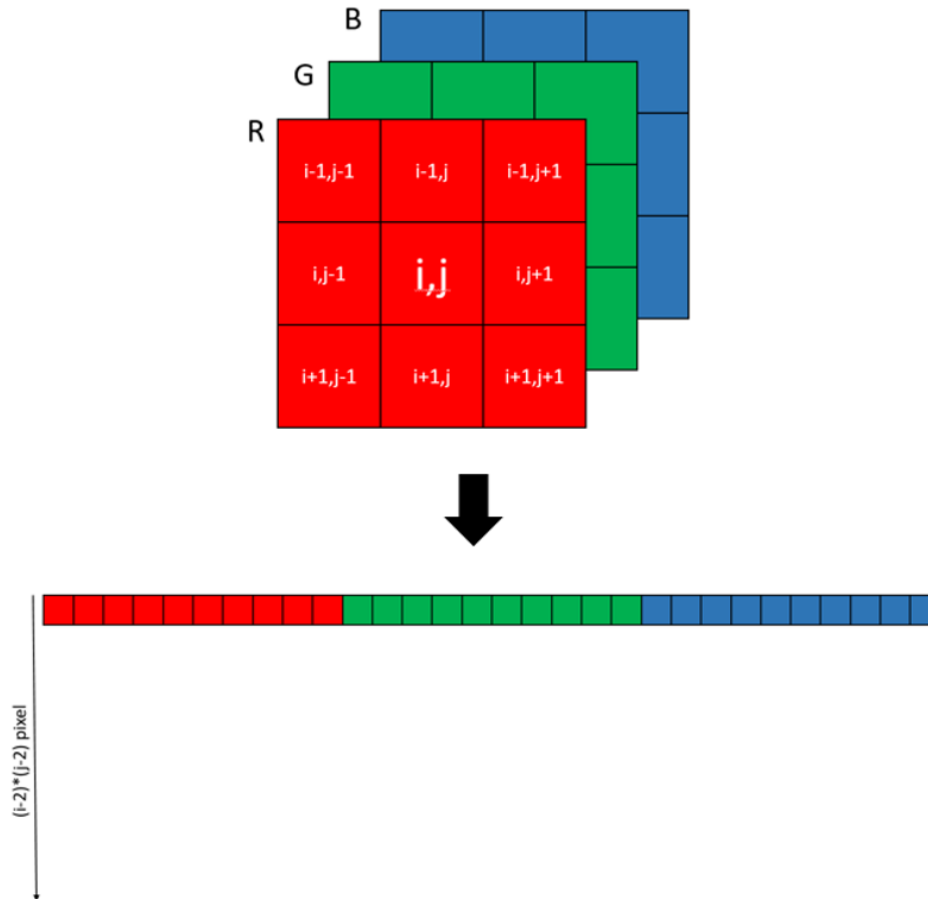


Figura 2.7: procedimento per la realizzazione della matrice utilizzata per l'analisi delle componenti principali.

2.2.3 Multi-Way PCA

Come analisi preliminare, per verificare la consistenza dei dati tra i vari esperimenti, è possibile creare un set di dati che comprenda i valori delle analisi ottenuti da tutti gli esperimenti svolti (Facco, 2014). Unendo i dati di più esperimenti *batch* in un'unica matrice, si va a creare un problema inerente alle dimensioni della matrice; analisi come la PCA lavorano con matrici bidimensionali, ma la matrice formata si presenta con tre dimensioni. La prima dimensione è composta dai vari esperimenti *batch*, la seconda è costituita dall'insieme delle variabili misurate mentre la terza è formata dagli istanti di tempo in cui sono stati svolti i campionamenti.

La tecnica che viene quindi utilizzata viene chiamata *unfolding*, ovvero srotolamento. La matrice, infatti, viene scomposta con differenti metodi andando ad ottenere così una matrice bidimensionale, in modo da far risaltare l'informazione contenuta in essa. I metodi principali di scomposizione della matrice sono *batch-wise unfolding* (BWU) e *variable-wise unfolding* (VWU), (Facco, 2014). La scomposizione di tipo *batch-wise* affianca i vari istanti di tempo orizzontalmente, in modo tale da avere un intero esperimento per riga nella matrice finale \mathbf{X}^{BWU} . Questo metodo consente di svolgere un'analisi temporale dell'esperimento, andando a catturare le informazioni presenti nella dinamica del *batch*. In Figura 2.8 viene rappresentato il metodo di scomposizione della matrice tridimensionale. La matrice tridimensionale viene suddivisa in vari piani verticalmente, dove ogni sezione costituisce la *k-esima* osservazione di tutti i *batch* per ogni variabile.

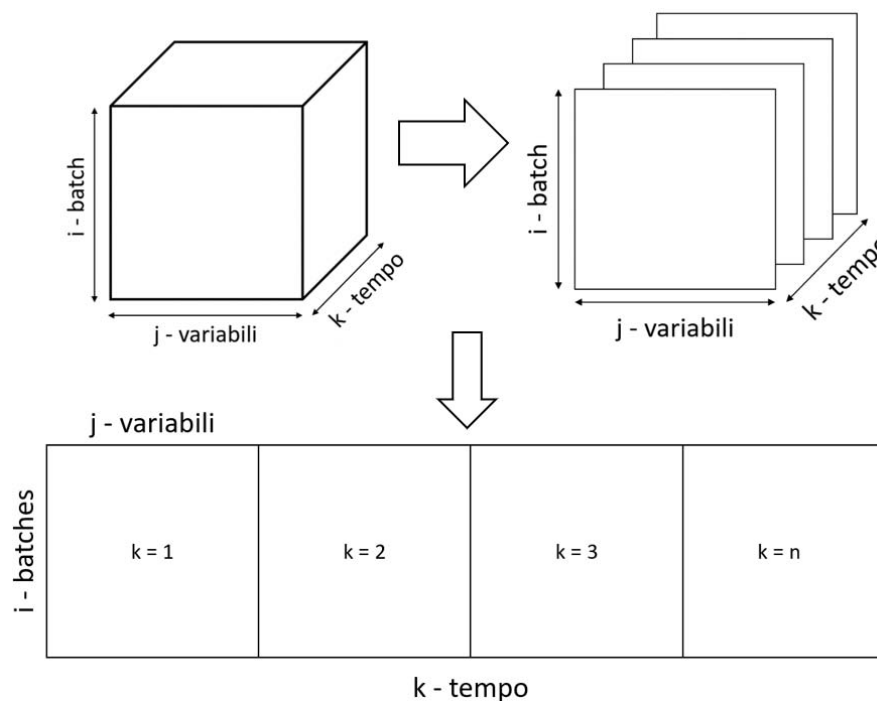


Figura 2.8: procedimento per la scomposizione di una matrice con metodo *batchwise*. La matrice iniziale viene scomposta su piani verticali che rappresentano tutte le misurazioni ad un istante di tempo. Questi piani vengono affiancati orizzontalmente in modo che ogni score della matrice rappresenti interamente un singolo esperimento.

Un problema sorto con questo tipo di analisi ed evidenziato anche da Facco, (2014) è la non sincronizzazione dei campionamenti, dato che le analisi di laboratorio non vengono effettuate allo stesso orario ogni giorno. I dati sono quindi stati interpolati, in modo da fornire il valore della variabile ogni 24 ore e da sincronizzare gli istanti temporali.

La scomposizione di tipo *variable-wise*, invece, preserva la direzione delle variabili, non considerando i dati in riferimento al tempo di campionamento. La matrice tridimensionale viene

scomposta su piani orizzontali, ognuno dei quali rappresenta tutti i campionamenti di un singolo *batch*. I vari esperimenti vengono poi affiancati verticalmente. La costruzione della matrice \mathbf{X}^{VWU} è descritta in Figura 2.9.

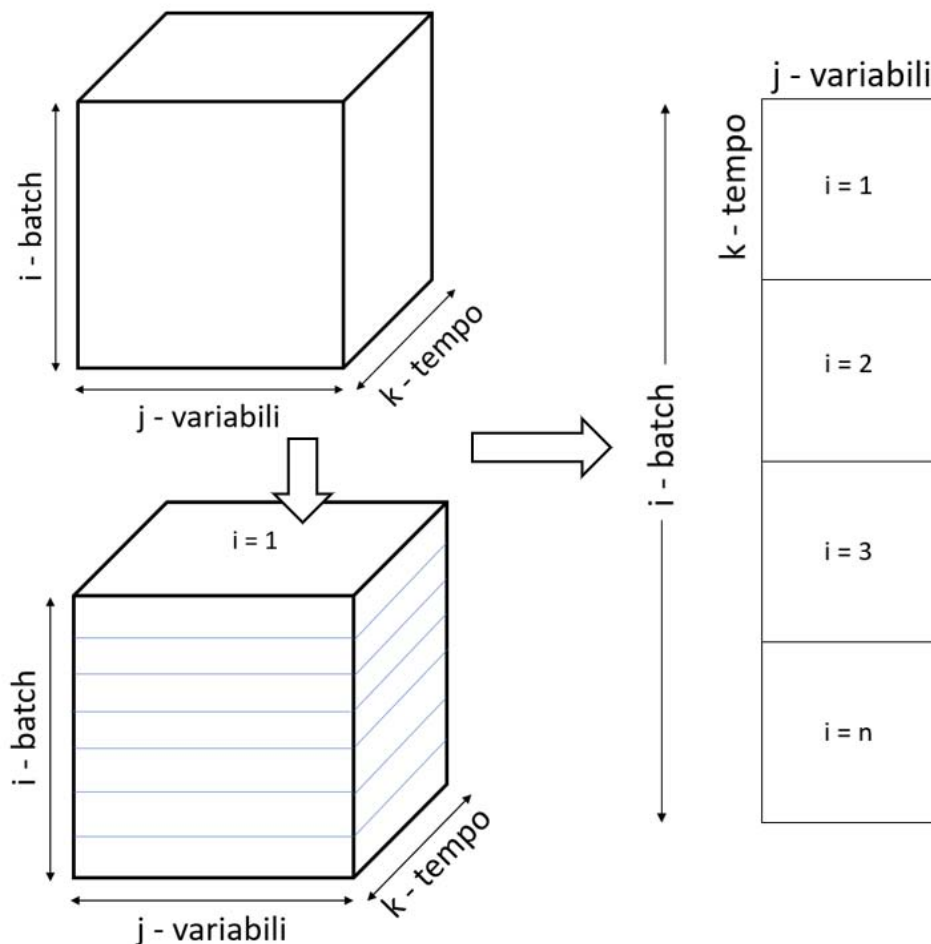


Figura 2.9: *procedimento per la scomposizione di una matrice con metodo variablewise. La matrice iniziale viene scomposta su piani orizzontali che rappresentano un intero esperimento. Questi piani vengono affiancati verticalmente.*

2.2.4 Regressione dei minimi quadrati parziali (PLS)

La regressione dei minimi quadrati parziali è una tecnica statistica multivariata che rapporta due set di dati attraverso un modello lineare (Facco, 2014). Quest'applicazione viene utilizzata per effettuare una predizione della concentrazione della microalga a seguito di una calibrazione. I set di dati utilizzati sono \mathbf{X} , matrice dei predittori o della variabile primaria, e \mathbf{Y} , matrice delle risposte o della variabile secondaria. Il modello generale della PLS svolge una duplice funzione: riduce la dimensione del sistema, andando a vedere le direzioni di maggior variabilità, ed individua gli spazi delle variabili latenti che posseggono la miglior predittività rispetto alla

variabile secondaria e sono più vicine alla direzione di massima variabilità della variabile primaria (Facco, 2014). La matrice \mathbf{X} viene scomposta come rappresentato nell'equazione:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T + \mathbf{E} = \sum_{r=1} \mathbf{t}_r \cdot \mathbf{p}_r^T + \mathbf{E} \quad (2.8)$$

dove \mathbf{T} è la matrice degli *scores*, \mathbf{P} la matrice dei *loadings*, \mathbf{E} la matrice dei residui, \mathbf{t}_r il vettore degli *scores* e \mathbf{p}_r il vettore dei *loadings*. La matrice \mathbf{Y} viene invece scomposta come rappresentato nell'equazione:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U} \cdot \mathbf{Q}^T + \mathbf{F} = \sum_{r=1} \mathbf{u}_r \cdot \mathbf{q}_r^T + \mathbf{F} \quad (2.9)$$

dove \mathbf{U} è la matrice degli *scores*, \mathbf{Q} la matrice dei *loadings*, \mathbf{F} la matrice dei residui, \mathbf{u}_r il vettore degli *scores* e \mathbf{q}_r il vettore dei *loadings*. Le norme dei residui \mathbf{E} ed \mathbf{F} , rispettivamente $\|\mathbf{E}\|$ e $\|\mathbf{F}\|$, devono essere minimizzate. Vi è un'ulteriore relazione, che lega le due matrici degli *scores* tra loro ed è riportata nell'equazione:

$$\mathbf{u}_r = b_r \cdot \mathbf{t}_r \quad (2.10)$$

dove b_r sono i parametri di regressione e vengono descritti dall'equazione:

$$b_r = \frac{\mathbf{u}_r^T \cdot \mathbf{t}_r}{\mathbf{t}_r^T \cdot \mathbf{t}_r} \quad (2.11)$$

Capitolo 3

Analisi Preliminari

In questo capitolo verrà effettuata un'analisi preliminare sui dati raccolti dalla campagna sperimentale, in modo da fornire maggiori informazioni sulla consistenza degli esperimenti. Nella prima parte i dati ottenuti dai *batch* verranno confrontati con i valori di letteratura, mentre nella seconda parte saranno analizzate le fotografie digitali, per verificare la possibilità di testare il nuovo metodo di monitoraggio basato su analisi d'immagine.

3.1 Confronto con i dati di letteratura

Lo svolgimento degli esperimenti alle varie intensità di radiazione luminosa ha permesso di raccogliere diversi dati. In questa fase è di fondamentale importanza confrontare le varie repliche tecniche sia tra di loro, in modo da verificare la consistenza tra gli esperimenti, sia con i dati presenti in letteratura, così da appurare la validità e la correttezza dei test svolti. Per svolgere queste verifiche sono considerati i dati ottenuti dal monitoraggio della crescita, dall'analisi dei pigmenti e dallo svolgimento di test con il fluorimetro. In tabella 3.1 sono riportati gli esperimenti svolti e le relative condizioni.

Tabella 3.1: *elenco degli esperimenti svolti e le relative condizioni iniziali e di luce.*

Nome esperimento	Intensità luminosa ($\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Concentrazione iniziale (milioni cellule/mL)
35 – 1	35	5
35 – 2	35	5
150 – 1	150	5
150 – 2	150	5
950 – 1	950	5
950 - 2	950	5

3.1.1 Monitoraggio della crescita

Per la valutazione della crescita della microalga sono stati calcolati i tassi di crescita e sono state ricavate le curve di crescita. In Figura 3.1 sono riportate le curve di crescita degli esperimenti svolti ed utilizzati per la verifica del metodo di monitoraggio, due per luce. È possibile osservare come le curve di crescita a bassa intensità luminosa ($35 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

siano quasi sovrapposte e rimangano nella parte inferiore del grafico: la concentrazione cellulare rimane bassa perché la velocità di crescita è enormemente limitata dalla luce. Le curve di crescita delle microalghe sottoposte a intensità luminose medie ($150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ed alte ($950 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$) si sviluppano molto verso la parte alta del grafico, mostrando una concentrazione molto elevata. Tali osservazioni possono essere fatte anche osservando il tasso di crescita in Figura 3.2. A basse intensità luminose, il tasso di crescita risulta essere discretamente basso, mentre è molto maggiore per le altre intensità luminose.

Confrontando questi dati con quelli forniti dalla letteratura per la stessa specie e nelle medesime condizioni (Gris *et al.*, 2014), riportati in Figura 3.3, si può notare come le curve di crescita abbiano andamenti simili. Vi sono però delle differenze nei valori di concentrazione cellulare, che si ottengono a seguito della fase esponenziale, e nei valori del tasso di crescita. Le intensità di 150 e $950 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, infatti, crescono maggiormente di quanto atteso e, inoltre, in condizioni di alta intensità luminosa si ottengono valori di crescita maggiori rispetto all'intensità intermedia. Le microalghe cresciute a 150 e a $950 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, negli esperimenti svolti da Gris *et al.*, (2014), arrivano a valori di concentrazione cellulare rispettivamente di 70 e 40 milioni di cellule per millilitro. Negli esperimenti svolti a 150 e a $950 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per questo lavoro di tesi, la concentrazione cellulare raggiunge valori rispettivamente di 85 e 90 milioni di cellule per millilitro, mostrando come le microalghe non presentino fenomeni di fotoinibizione. Ciò può essere dovuto all'adattamento della microalga all'utilizzo, fattore che sposta il suo picco di crescita ad intensità luminose maggiori.

Figura 3.1: curve di crescita degli esperimenti svolti a 35 , 150 e $950 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Figura 3.2: tasso di crescita degli esperimenti svolti alle varie intensità luminose.

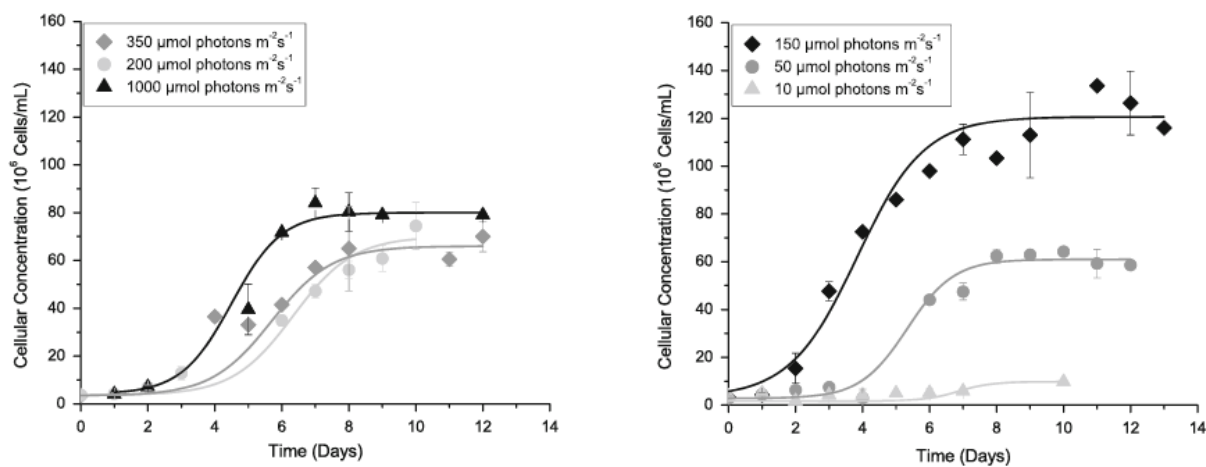


Figura 3.3: curve di crescita ottenute dai test svolti da Gris et al. (2014).

In tabella 3.2 sono riportati i valori ricavati dall'analisi del peso secco. I dati ottenuti tra le repliche biologiche sono consistenti e sono molto simili a quelli presenti in letteratura, ad eccezione del valore dei pesi secchi a 150 μmol fotoni m⁻² s⁻¹, che risulta essere leggermente inferiore. Si può osservare come le microalghe esposte a 950 μmol fotoni m⁻² s⁻¹ producano una grande quantità di biomassa in termini assoluti, ma, se si rapportano questi valori all'intensità di luce fornita, si osserva come la resa delle alghe cresciute a luci maggiori sia molto inferiore.

Tabella 3.2: valori ottenuti dall'analisi dei pesi secchi dei vari esperimenti svolti e concentrazione normalizzata sulla quantità di luce.

Esperimento	Peso secco (g/L)	g/L/ $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
35-1 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	0.72	0.02
35-2 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	0.69	0.019
150-1 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	2.54	0.017
150-2 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	2.50	0.017
950-1 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	4.38	0.005
950-2 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	4.24	0.005

3.1.2 Analisi dei pigmenti

L'analisi dei pigmenti viene effettuata per valutare lo stato di acclimatazione della microalga. Dopo una fase di transizione iniziale, le cellule si adattano all'intensità luminosa fornita, modificando il contenuto di clorofilla e di carotenoidi. Tale fenomeno risulta ben visibile in Figura 3.4, dove è presentato l'andamento del contenuto di clorofilla nel tempo, per le varie condizioni di luce.

Figura 3.4: andamento del contenuto di clorofilla nel tempo dei vari esperimenti svolti.

Le microalghe sottoposte a radiazioni luminose medio/basse tendono a mantenere un maggior contenuto di clorofilla, in modo da massimizzare l'utilizzo della luce, mentre le alghe esposte ad alte intensità luminose diminuiscono la quantità di clorofilla, in modo da ridurre la capacità

di raccolta della luce. Nella parte iniziale degli esperimenti, fino al giorno 2, è presente una fase di transizione dove le microalghe si adattano alla fonte luminosa. L'esperimento 1 svolto a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presenta un punto anomalo al giorno 1, probabilmente dovuto ad un errore nella procedura sperimentale. Il confronto tra i valori ottenuti a fine curva e quelli presenti nel lavoro di Gris *et al.* (2014) mette in risalto la consistenza degli esperimenti. Infatti, gli esperimenti svolti a $950 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentano un valore finale di clorofilla di circa 0.4, gli esperimenti effettuati a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ un valore di circa 0.7, mentre le curve degli esperimenti realizzati a $35 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ hanno un valore di circa 0.85.

I carotenoidi, invece, date le loro proprietà antiossidanti, subiscono il processo opposto. Le cellule sottoposte ad un'alta intensità luminosa tendono, infatti, a produrre una maggior quantità di carotenoidi, in modo da proteggere loro stesse dalla radiazione (Gris *et al.*, 2014). In Figura 3.5 è riportato l'andamento del rapporto tra carotenoidi e clorofilla relativamente agli esperimenti svolti alle varie intensità luminose. Nelle microalghe esposte a 35 e $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, il contenuto di carotenoidi aumenta leggermente, mentre nelle cellule sottoposte a $950 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ il rapporto tende a crescere notevolmente. Tale andamento è confrontabile con quello presente in letteratura, anche se il contenuto di carotenoidi ottenuto negli esperimenti svolti risulta decisamente inferiore.

Figura 3.5: andamento del rapporto tra contenuto di carotenoidi e clorofilla a per i vari esperimenti svolti.

3.1.3 Misure di fluorescenza

I test inerenti alla fluorescenza clorofilliana permettono di ottenere numerose informazioni riguardanti la risposta fotosintetica delle microalghe. I dati vengono forniti dal software Fluorcam7[®] (PSI), che li ottiene mediando il valore dei *pixel* in ogni pozzetto rilevato. Successivamente viene effettuata la media dei dati ottenuti tra i pozzetti contenenti la stessa diluizione. Il calcolo del parametro F_V/F_M è molto importante, dato che permette di valutare lo stress luminoso subito dalla microalga, fornendo indicazioni sul suo stato di salute. In Figura 3.6 sono presentate le curve del valore di F_V/F_M degli esperimenti nei vari giorni, ottenute mediando i valori dei micro-fotobioreattori riempiti con la concentrazione tale e quale. È possibile osservare come il valore del parametro negli esperimenti svolti a bassa e media intensità luminosa sia compreso tra 0.65 e 0.75, anche nei giorni finali del *batch*. Si può concludere che le cellule non presentino stress luminoso, dato che il range ottimale di F_V/F_M per *Scenedesmus obliquus* è tra 0.7 e 0.8. Gli esperimenti svolti a 950 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, contrariamente, mostrano un valore più basso di questo parametro, che diminuisce fortemente dopo il terzo giorno, indicando come le microalghe sottoposte ad un'elevata intensità di luce accumulano una notevole quantità di stress luminoso.

Figura 3.6: curve del parametro F_V/F_M degli esperimenti svolti alle varie intensità luminose.

Lo svolgimento dei test con il fluorimetro ha mostrato come i valori ottenuti dalle misurazioni siano molto rumorosi e con un errore molto alto. L'incertezza sulle misure tende ad aumentare con la concentrazione, quindi più l'esperimento procede, più c'è il rischio di compiere un errore elevato nell'utilizzare i valori ottenuti. In Figura 3.7 sono presentati gli andamenti del parametro

F_0 delle varie diluizioni di tutti gli esperimenti utilizzati al giorno 3 (Figura 3.7a) e di tutti i giorni dell'esperimento 2 (Figura 3.7b), condotto a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. È possibile notare come, con l'aumentare della concentrazione, l'errore cresca in modo drastico, rendendo molto imprecisa la misura. La crescita della concentrazione comporta anche la perdita della linearità nella misura, che viene mantenuta solo per concentrazioni cellulari inferiori a 50 milioni cellule mL^{-1} . Ciò comporta dei rischi nell'utilizzare relazioni lineari per correlare i parametri ottenuti attraverso la fluorescenza della clorofilla con la concentrazione cellulare microalgale, dato che a concentrazioni elevate si perde la linearità, come indicato anche nel lavoro di Monetti (2015), e si potrebbe, quindi, incorrere in errori anche elevati.

(a)

(b)

Figura 3.7: (a) valori di F_0 correlati alla concentrazione cellulare per tutte le diluizioni del giorno 3 di tutti gli esperimenti e (b) valori di F_0 correlati alla concentrazione di tutte le diluizioni per ogni giorno dell'esperimento 2 svolto a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

3.2 Analisi preliminare secondo metodi matematici

L'analisi d'immagine multivariata è stata inizialmente utilizzata per caratterizzare i dati ottenuti dalle fotografie acquisite e per valutare la possibilità di utilizzare metodi predittivi per monitorare la crescita della biomassa microalgale. A tale scopo, i metodi matematici impiegati sono l'analisi delle componenti principali (PCA) e la *multi-way* PCA.

3.2.1 Analisi delle componenti principali

L'analisi delle componenti principali è stata applicata come descritto nel paragrafo §2.2.1, permettendo così l'individuazione di direzioni che mantengano la maggior variabilità possibile. Successivamente, è stata utilizzata per segmentare l'immagine ed ottenere informazioni su come le osservazioni si dispongano sul grafico degli *score*. Ogni osservazione è costituita dai canali RGB del *pixel* analizzato e dai canali degli otto *pixel* adiacenti, in modo da mantenere

l'informazione contenuta nelle *texture*. In Figura 3.8 è presentata l'immagine acquisita il terzo giorno dell'esperimento 2, svolto a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-1} \text{s}^{-1}$, con il successivo *masking* e il relativo grafico degli *score* ottenuto tramite PCA. Il grafico rappresenta la disposizione delle osservazioni lungo le direzioni principali 1 e 2, che rappresentano rispettivamente il 96.39% e l'1.74% di varianza. È possibile notare una separazione nelle varie osservazioni lungo la prima componente principale, ma per comprendere in modo più efficace la loro disposizione sul piano è necessario attuare la segmentazione dell'immagine.

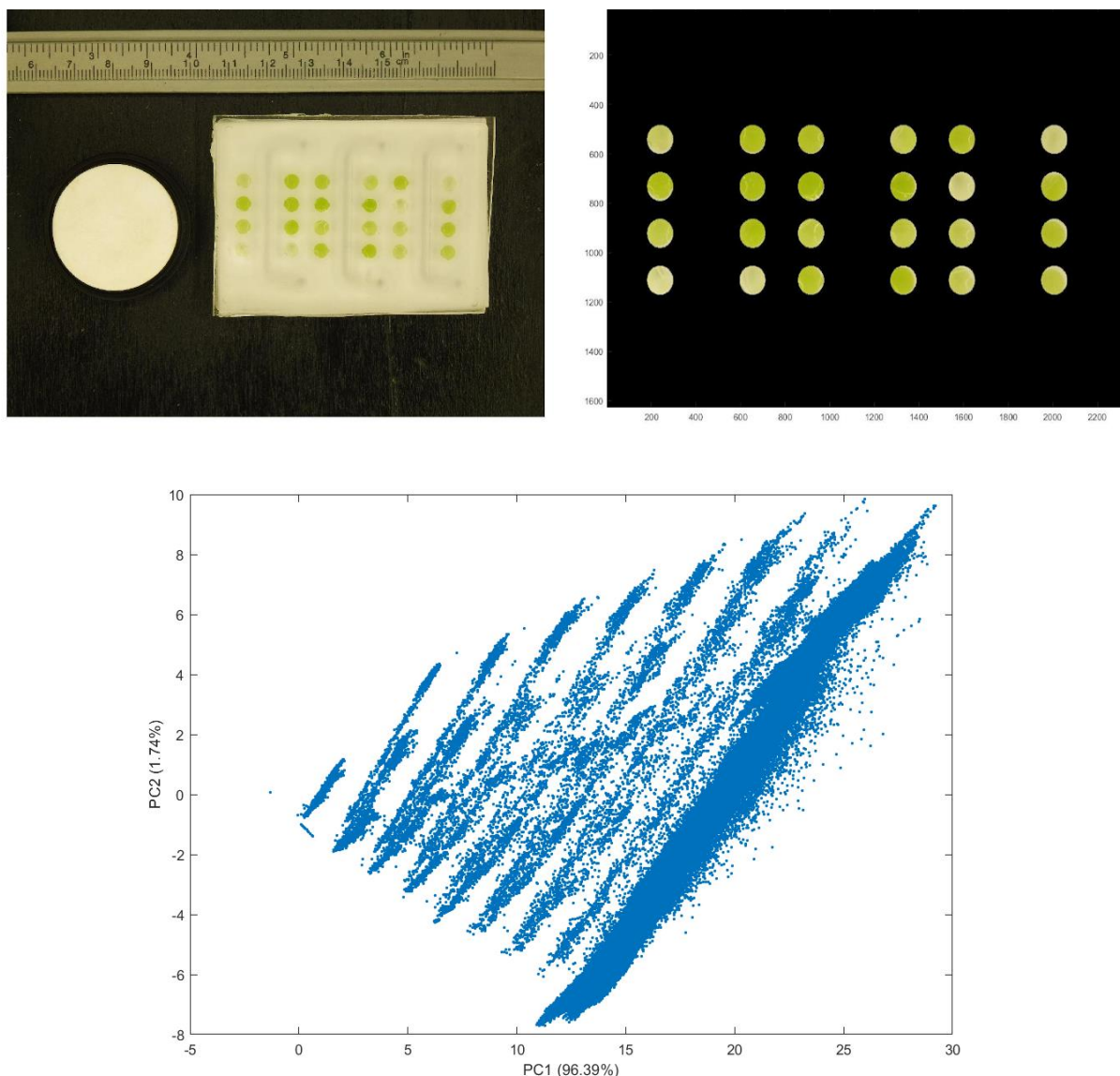


Figura 3.8: applicazione della maschera software all'immagine acquisita il giorno 3 del secondo esperimento svolto a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-1} \text{s}^{-1}$ e grafico degli *score*, riferiti alla componente principale 1 e 2, ottenuto tramite PCA.

In Figura 3.9 sono presentati i *loadings* riferiti alle direzioni principali 1 e 2. In ciascun grafico, le prime nove colonne fanno riferimento al canale del rosso, le successive al canale del verde e le ultime al canale del blu, come descritto in Figura 2.7, presente nel paragrafo §2.2.1. È possibile osservare come tutti i *loadings* della prima componente principale siano maggiori di

zero, dato che indica la loro correlazione, mentre nella seconda componente principale i *loadings* che si riferiscono al canale del blu hanno segno positivo e sono anticorrelati agli altri. La prima direzione principale è determinata specialmente dall'intensità dei tre canali di colore, mentre la seconda è caratterizzata principalmente dai canali del blu, che presentano valori molto elevati per biomasse microalgali poco concentrate e valori ridotti nei *pixel* che si riferiscono a biomasse maggiormente concentrate. In tabella 3.3 sono riportati i valori di alcuni *pixel* di pozzetti ad alta e bassa concentrazione, in modo da poter osservare le differenze nei valori dei canali di colore.

Tabella 3.3: valori dei canali colori di due *pixel* presenti in un pozzetto ad alta concentrazione e di due *pixel* di un m-PBR a bassa concentrazione.

Concentrazione	Rosso	Verde	Blu
76.72 milioni cellule/mL	166	179	14
	176	188	28
12.79 milioni cellule/mL	215	209	149
	218	212	150

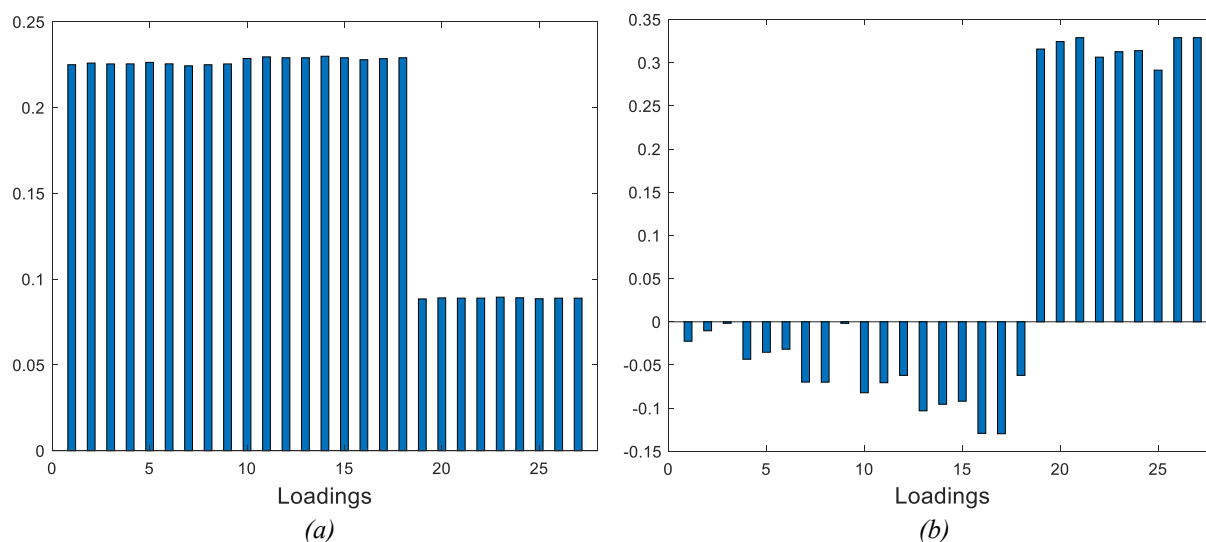


Figura 3.9: grafici dei loadings (a) della prima componente principale e (b) della seconda componente principale, ottenuti tramite PCA.

La segmentazione effettuata sull'immagine ha confermato la suddivisione delle osservazioni a seconda della concentrazione microalgale lungo la seconda direzione principale. In Figura 3.10 sono riportati i risultati della segmentazione dell'immagine acquisita il terzo giorno dell'esperimento 2, svolto a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-1} \text{s}^{-1}$. Nell'immagine sono stati riportati solo i *pixel* che fanno riferimento alle osservazioni selezionate, mentre i restanti *pixel* vengono rappresentati con il colore magenta. In Figura 3.10a è stata evidenziata la selezione nella parte bassa del grafico degli *score* ed i relativi *pixel* che appartengono all'immagine. Il confronto con

la fotografia originale, presentata in Figura 3.8, permette di osservare come la selezione faccia riferimento a biomasse microalgali maggiormente concentrate, che presentano valori del canale blu molto bassi. Nella Figura 3.10b, invece, la selezione delle osservazioni è stata effettuata nella parte superiore del grafico e fa riferimento a *pixel* presenti in pozzetti a bassa concentrazione microalgale, e quindi con valori di blu elevati.

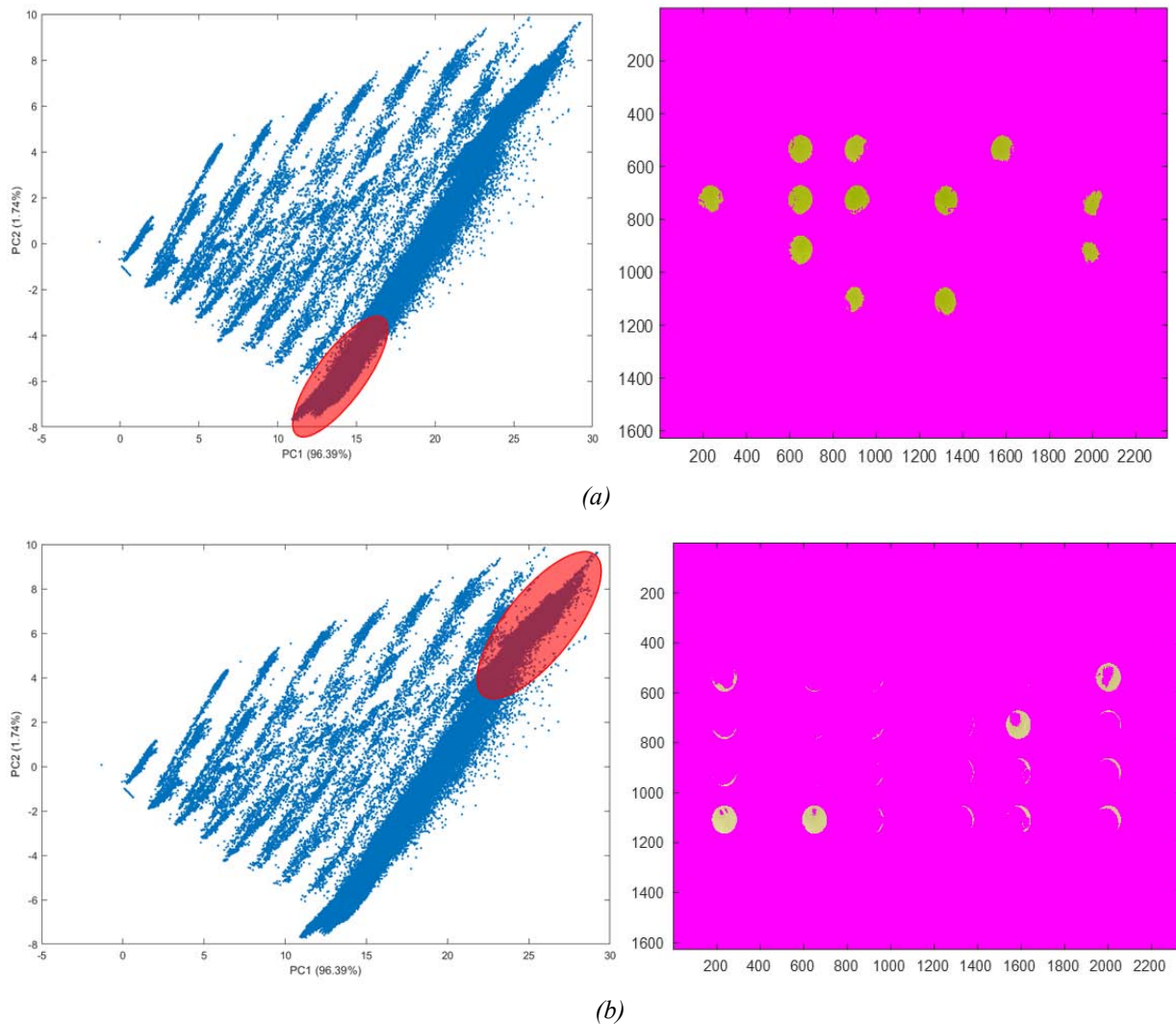


Figura 3.10: risultati ottenuti applicando la segmentazione dell'immagine acquisita il terzo giorno dell'esperimento 2, svolto a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-1} \text{s}^{-1}$. (a) La selezione nella parte inferiore del grafico fa riferimento a pozzetti ad elevata concentrazioni di microalghe, mentre in (b) la selezione nella parte alta del grafico è relazionata alle concentrazioni minori.

L'analisi delle componenti principali e la segmentazione dell'immagine mostrano come le osservazioni ottenute dai *pixel* presenti nei micro-fotobioreattori, in riferimento all'immagine originale utilizzata, si dispongano nella parte destra del grafico degli *score*. Si può inoltre notare come la seconda componente principale permetta di discriminare qualitativamente la concentrazione della microalga, indicando la possibilità di stimare la concentrazione microalgale da analisi d'immagine.

3.2.2 Multiway-PCA

La consistenza tra i vari esperimenti è stata valutata anche tramite *multi-way* PCA. Come descritto nel paragrafo §2.2.3, l'*unfolding* della matrice, ottenuta dal set di dati, è stato eseguito con due metodi distinti, così da poter applicare due analisi differenti: *batch-wise* e *variable-wise*. Il set di dati è composto dalle misure, rilevate ai vari istanti temporali dell'esperimento, delle 10 variabili di seguito elencate:

- Tempo
- pH
- OD (densità ottica)
- Conta cellulare 1
- Conta cellulare 2
- Chl a, contenuto di clorofilla a
- Car/Chl a, rapporto del contenuto di carotenoidi e clorofilla a
- F_V/F_M
- NPQ_{ss} , ovvero il valore di *quenching* non fotochimico allo stato stazionario
- I_0 , intensità luminosa.

Nell'analisi di tipo *batch-wise*, gli istanti temporali sono stati affiancati, in modo da far corrispondere un singolo esperimento ad un'osservazione. Il tempo non viene utilizzato come variabile per questa analisi. Il grafico degli *score* ottenuto è presentato in Figura 3.11, dove è possibile notare la consistenza delle repliche biologiche effettuate rispetto alle variabili utilizzate, considerando tutti i campionamenti che compongono gli esperimenti. Gli esperimenti effettuati alla stessa luce sono raggruppati in punti definiti del piano, ben identificabili e distanziati dagli esperimenti svolti a luce differente.

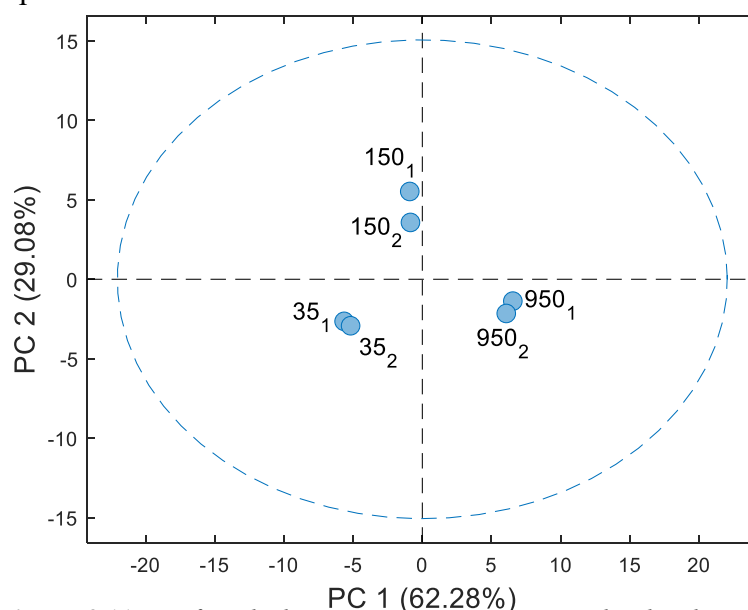


Figura 3.11: grafico degli *score* ottenuto tramite analisi *batch-wise*. Ogni punto corrisponde ad un singolo esperimento nella sua completezza.

Un altro dato emerso da questa analisi è la traiettoria temporale dei *loadings* della prima componente principale, presentata in Figura 3.12. Questo grafico fornisce informazioni sulla variazione generale delle diverse variabili, considerando tutti i *batch* contemporaneamente. È possibile notare come le curve raffiguranti le due conte cellulari, a partire dal secondo giorno, siano completamente sovrapposte, e ciò indica come abbiano lo stesso andamento temporale. La densità ottica presenta un andamento molto simile alle curve delle conte cellulari, dato che vi è una forte correlazione tra queste due variabili. Le uniche variabili con valori che tendono a diminuire nel tempo sono il contenuto di clorofilla a ed il rapporto F_V/F_M , come anche dimostrato nei grafici presenti nel paragrafo §3.1. La curva rappresentante l'intensità luminosa non cambia il proprio valore, poiché l'intensità luminosa viene mantenuta costante durante lo svolgimento dell'esperimento.

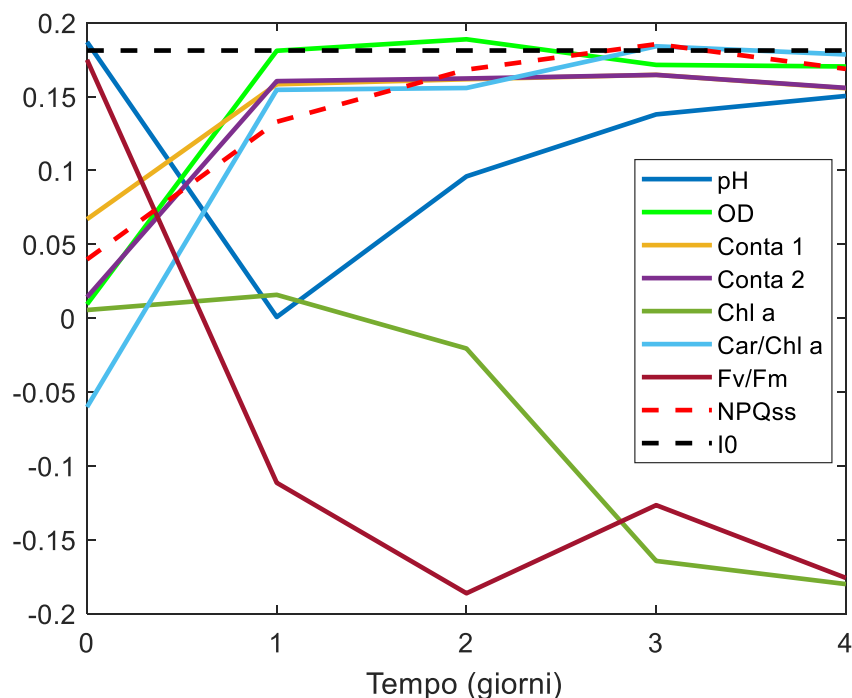


Figura 3.12: grafico dell'andamento dei *loadings* della prima componente principale rispetto ai vari tempi di campionamento, ottenuto tramite analisi *batch-wise*.

L'analisi *variable-wise* ha permesso di svolgere una PCA preservando le variabili, senza considerare l'aspetto temporale. Ciò si può notare in Figura 3.13a, dove sono riportati i *loadings* della prima componente principale. Anche in questo grafico è possibile osservare come le conte cellulari e la densità ottica siano strettamente correlate tra loro; il contenuto di clorofilla e il valore di F_V/F_M , al contrario, sono variabili anticorrelate alle altre. La Figura 3.13b mostra

invece i *loadings* della seconda componente principale, dove le variabili più rilevanti sono il tempo e l'intensità luminosa, in un rapporto di anticorrelazione.

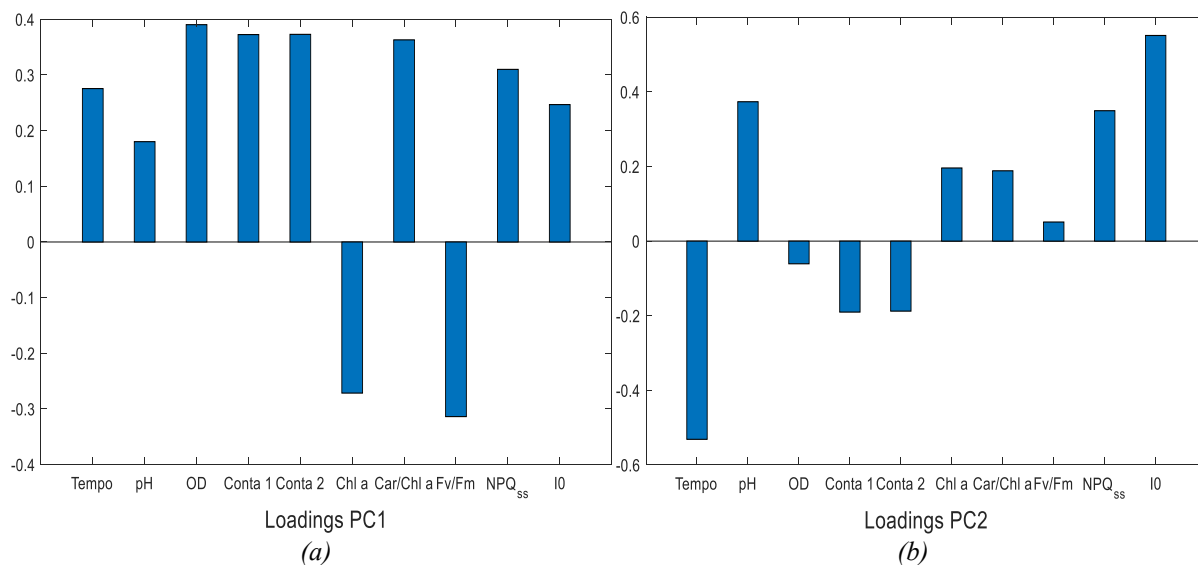


Figura 3.13: grafici dei loadings (a) della prima componente principale e (b) della seconda componente principale, ottenuti tramite analisi variable-wise.

L'analisi *variable-wise* ha permesso di costruire le traiettorie temporali dei singoli *batch*, tramite la valutazione degli *score*, ai vari istanti di campionamento. Le traiettorie ottenute sono presentate in Figura 3.14. Le due componenti principali riportate sono descritte dai *loadings* riportati in Figura 3.13.

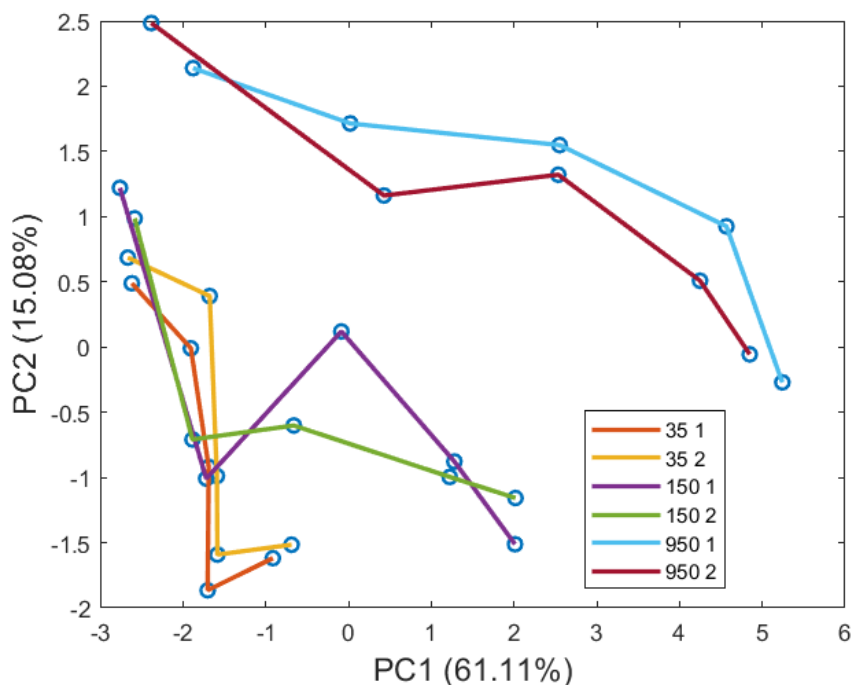


Figura 3.14: grafico raffigurante le traiettorie degli esperimenti lungo le prime due componenti principali, ottenute tramite analisi variable-wise. Le piccole circonferenze indicano i 5 istanti di campionamento che caratterizzano ogni *batch*. Sono state considerate 3 luci (35, 150 e 1000 $\mu\text{mol fotoni m}^{-1} \text{s}^{-1}$), per ognuna delle quali sono stati effettuati due esperimenti.

Si può notare come gli esperimenti svolti a $950 \mu\text{mol fotoni m}^{-1} \text{s}^{-1}$ si sviluppino maggiormente lungo la prima componente principale, dati gli elevati valori di concentrazione cellulare, densità ottica e rapporto Car/Chl a che raggiungono. Inoltre, questi *batch* presentano un brusco calo del rapporto F_V/F_M , variabile anticorrelata alle altre, comportando così un ulteriore sviluppo lungo questa componente. Gli esperimenti svolti a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-1} \text{s}^{-1}$ si sviluppano in modo intermedio lungo tale componente principale, poiché, nonostante raggiungano elevati valori di crescita, mantengono un alto quantitativo di clorofilla e il rapporto F_V/F_M rimane elevato per l'intera durata dell'esperimento. Infine, gli esperimenti svolti a $35 \mu\text{mol fotoni m}^{-1} \text{s}^{-1}$ presentano uno sviluppo minimo lungo la prima componente principale, poiché raggiungono valori di crescita bassi e mantengono contenuti di clorofilla molto elevati. Inoltre, questi *batch* producono uno scarso quantitativo di carotenoidi, dato che non necessitano della loro funzione antiossidante.

Capitolo 4

Risultati

Nella prima parte di questo capitolo sono illustrati i metodi applicati alla regressione, utilizzati per migliorare la capacità predittiva del modello. Nella seconda parte sono presentati i risultati ottenuti con la regressione PLS, suddivisi come predizione su singolo giorno e singola luce, predizione su singola luce e predizione su più intensità luminose. Inoltre, sono riportati i risultati ottenuti dalla PLS applicata solamente ai pozzetti riempiti con la concentrazione tale quale.

4.1 Metodi di regressione

Per migliorare l'efficienza del modello predittivo sono stati valutati diversi metodi per ottenere la matrice dei predittori \mathbf{X} e del vettore delle risposte \mathbf{y} , e sono state svolte delle analisi di sensibilità inerenti al raggio dei pozzetti e il numero di variabili latenti utilizzate dal modello.

4.1.1 Matrice dei predittori

La regressione dei minimi quadrati parziali è stata applicata per ottenere una predizione della concentrazione cellulare della biomassa microalgale. La matrice dei predittori \mathbf{X} è formata dai dati ottenuti dai *pixel* delle immagini digitali, mentre il vettore delle risposte \mathbf{y} è costituito dalle concentrazioni note delle varie diluizioni presenti nei micro-fotobioreattori.

La matrice \mathbf{X} , dove i pozzetti costituiscono le osservazioni (righe), ognuna caratterizzata dai predittori inerenti ai valori dei canali RGB del pozzetto stesso, è stata costruita in due modi differenti. Il primo metodo consiste nel calcolare il valore medio e la varianza dei canali di colore di ogni pozzetto, in modo da ottenere 6 predittori per ciascun mPBR. Nel secondo metodo vengono considerati singolarmente tutti i *pixel* presenti in ogni pozzetto, ciascuno con i rispettivi valori RGB, così da formare una matrice \mathbf{X} dove ogni pozzetto è caratterizzato da 3 canali di colore \times numero di *pixel* predittori. Per aumentare le dimensioni del set di dati e per aumentare la variabilità presente all'interno di ogni singolo pozzetto, sono state introdotte delle permutazioni, che vanno a modificare l'ordine in cui sono disposti i *pixel*, mantenendo però l'ordine dei tre canali di colore. Come rappresentato in Figura 4.1, le P permutazioni vengono successivamente affiancate, in modo da aumentare notevolmente il numero dei predittori totali su cui si esegue la predizione. Successivamente, viene permutato orizzontalmente anche l'ordine delle permutazioni, concatenando verticalmente le matrici N pozzetti \times (M predittori \times P permutazioni) ottenute. Tale metodo permette di ottenere, da una matrice di partenza $N \times M$,

una matrice avente $N \times P$ osservazioni e $M \times P$ predittori, irrobustendo così il modello (Facco *et al.*, 2017).

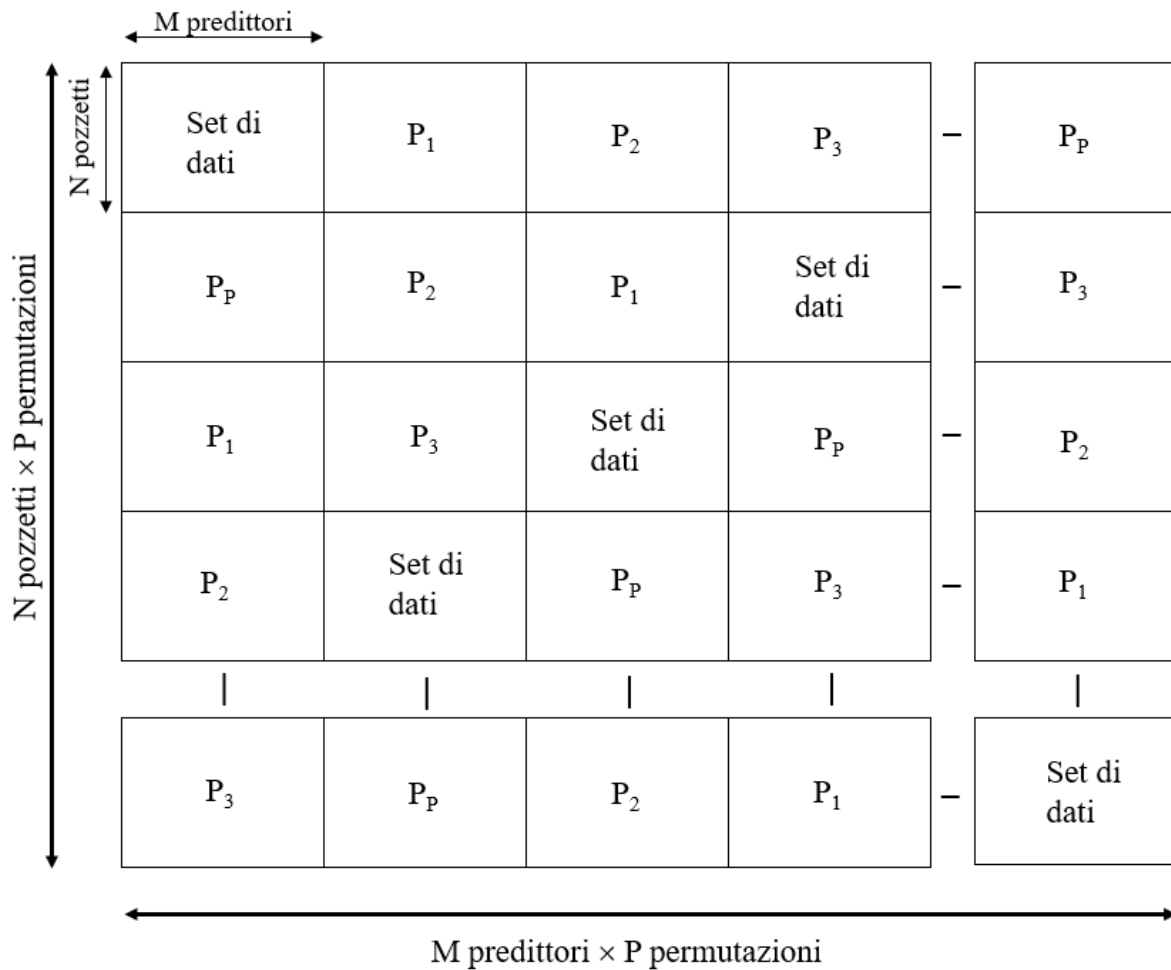


Figura 4.1: struttura della matrice ottenuta dalla permutazione dei singoli pixel di ogni pozzetto e dalla successiva permutazione degli indici delle permutazioni. La sottomatrice Set di dati rappresenta i valori originali ottenuti dall'analisi d'immagine ed è costituita dai pozzetti come osservazioni e dai valori RGB dei singoli pixel come predittori.

4.1.2 Vettore delle risposte

Il vettore delle risposte y è costituito dalle concentrazioni di biomassa microalgale presenti nei vari micro-fotobioreattori. Tale vettore viene costruito in modo che l'indice di ciascun pozzetto corrisponda all'indice dello stesso micro-fotobioreattore all'interno della matrice dei predittori X . È stato osservato come l'andamento temporale del logaritmo della concentrazione cellulare abbia un andamento maggiormente lineare rispetto alla concentrazione stessa, aspetto che suggerisce la possibilità di utilizzare il logaritmo della concentrazione dei pozzetti per costruire il vettore delle risposte y , in modo da facilitare l'individuazione di una direzione su cui applicare la regressione lineare. La differenza tra i due andamenti temporali è riportata in Figura 4.2, che fa riferimento alla curva di crescita dell'esperimento 1 svolto a $35 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. In Figura

4.2a è presentata la curva della concentrazione cellulare ed è possibile notare l'andamento esponenziale della stessa. La Figura 4.2b fa invece riferimento al logaritmo della concentrazione cellulare, che evidenzia un andamento lineare.

(a) (b)

Figura 4.2: andamento temporale (a) della concentrazione cellulare e (b) del logaritmo della concentrazione cellulare, riferiti all'esperimento 1 svolto a $35 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tale andamento è evidente anche negli esperimenti svolti ad intensità luminosa maggiore, fino al giorno 3. Dopo tale campionamento, infatti, la biomassa microalgale esce dalla fase di crescita esponenziale raggiungendo la fase stazionaria e mantenendo, quindi, un profilo di concentrazione costante.

4.1.3 Modello di regressione

Per permettere al modello di regressione di effettuare la predizione con il minor errore possibile, sono state svolte alcune analisi di sensibilità su due fattori: il numero di *pixel* da considerare per ogni pozzetto e il numero di variabili latenti impiegate dal modello. Nell'immagine digitale, la parte esterna di ogni pozzetto presenta numerosi *pixel* identificabili come rumore, che non forniscono nessuna informazione relativa al contenuto di biomassa, ma, anzi, possono peggiorare il risultato della predizione. Quindi, è stata effettuata un'analisi di sensibilità per valutare il raggio ottimale da considerare nei micro-fotobioreattori. Il diametro in *pixel* dei pozzetti, rilevato dal *software*, è di 54 *pixel*, ma la predizione che presenta un errore minore è stata ottenuta utilizzando un diametro di 50 *pixel*, valore che è stato dunque utilizzato per svolgere la totalità delle predizioni. Un'analisi di sensibilità è stata svolta per individuare il numero ottimale di variabili latenti da impiegare, in modo da ottimizzare la percentuale di varianza catturata, sia rispetto alla matrice dei predittori \mathbf{X} , sia rispetto al vettore delle risposte \mathbf{y} . L'analisi è stata effettuata valutando il valore degli scarti quadratici medi di predizione (RMSEP), ottenuto sommando il quadrato degli errori di predizione durante la convalida incrociata. Tale errore è un indicatore del modello predittivo: più risulta essere basso, maggiori

saranno le capacità predittive del modello. Il numero di variabili latenti selezionate, dunque, corrisponde all'ottenimento del minor valore del RMSEP.

Il modello PLS utilizza il set di dati che compone la matrice \mathbf{X} e il vettore \mathbf{y} sia per la fase di calibrazione che quella di predizione. Ogni piattaforma microfluidica è composta da 24 pozzetti, di cui 22 sono utilizzati per calibrare il modello, mentre la predizione viene effettuata sui 2 pozzetti esclusi dalla fase di calibrazione. Le fasi appena descritte vengono ripetute 50 volte, variando in modo casuale ad ogni ciclo i micro-fotobioreattori assegnati alla fase di predizione. In tal modo, si rende più robusto il modello, impedendo a dei valori anomali di compromettere i risultati predittivi, cosa che può accadere specialmente se il numero di osservazioni non è elevato. In tabella 4.1 è riportato un riassunto con i vari modelli utilizzati e le costruzioni impiegate per la matrice \mathbf{X} e il vettore \mathbf{y} .

Tabella 4.1: riassunto dei modelli utilizzati e delle costruzioni della matrice \mathbf{X} e del vettore \mathbf{y} impiegate.

Modello	Costruzione di \mathbf{X}		Costruzione di \mathbf{y}	
Singolo giorno Singola luce	Media e varianza dei valori dei canali RGB dei pozzetti	Tutti i <i>pixel</i> più le loro permutazioni	Concentrazione cellulare	
Tutti i giorni Singola luce	Media e varianza dei valori dei canali RGB dei pozzetti	Tutti i <i>pixel</i> più le loro permutazioni	Concentrazione cellulare	Logaritmo della concentrazione
Tutti i giorni Tutte luci	Media e varianza dei valori dei canali RGB dei pozzetti		Concentrazione cellulare	Logaritmo della concentrazione

4.2 Risultati

I risultati ottenuti dalle regressioni dei minimi quadrati parziali sono suddivisi a seconda del numero di campionamenti che includono: 1) entrambi gli esperimenti svolti alla stessa intensità luminosa in un singolo giorno, 2) entrambi gli esperimenti svolti alla stessa luce considerando l'intero profilo temporale e 3) la totalità dei campionamenti considerando tutte le radiazioni luminose impiegate.

4.2.1 PLS su singola intensità di luce e singolo giorno

La regressione effettuata considera entrambe le repliche degli esperimenti svolti alla stessa intensità luminosa, includendo nell'analisi solo un istante temporale dell'esperimento. In tal modo, per ogni luce, è possibile avere una stima della concentrazione cellulare di ogni singolo giorno, valutata su 48 micro-fotobioreattori. Quest'analisi è stata svolta utilizzando come matrice dei predittori \mathbf{X} sia la media e la varianza dei valori dei canali di colore di ogni singolo pozzetto, che i valori dei singoli *pixel* e le loro permutazioni, come descritto nel paragrafo §4.1.1. Il vettore delle risposte \mathbf{y} , invece, è stato costruito solo utilizzando i valori di concentrazione cellulare. L'analisi di sensibilità inerente al numero di variabili latenti ha fornito

il numero ottimale da utilizzare, che è uguale a tre. L'affidabilità della predizione è stata valutata calcolando il valore medio dell'errore relativo, riferito alle singole predizioni.

In tabella 4.2 sono presentati i risultati ottenuti dalla PLS, utilizzando come matrice \mathbf{X} la media e la varianza dei canali di colore per ogni pozzetto. È possibile osservare come le predizioni effettuate sugli esperimenti svolti a $35 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentino un errore più alto rispetto a quelle eseguite ad intensità medio-alte. Nelle immagini digitali, a basse concentrazioni il tono del colore varia in modo molto esiguo e il modello fatica a stimare con precisione tali microfotobioreattori. Inoltre, dato che la crescita è fortemente limitata dalla luce, la concentrazione si arresta a valori bassi e, quindi, vi è un minor intervallo di concentrazione tra le diluizioni, cosa che rende meno identificabili i pozzetti. Il giorno 0 degli esperimenti svolti a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presenta un errore di stima molto basso, dato che tutti i pozzetti sono stati riempiti con la stessa concentrazione di microalga. Gli errori ottenuti dalla predizione del giorno 1 degli esperimenti svolti a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a $950 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ risultano essere molto elevati. Infatti, le microalghie sono in fase di acclimatazione e, quindi, il loro contenuto di clorofilla risulta essere variabile, come evidenziato in Figura 3.4, e la concentrazione è difficilmente stimabile.

Tabella 4.2: errore relativo medio delle predizioni svolte tramite PLS, in riferimento ai campionamenti di un singolo giorno e di una singola luce. La matrice \mathbf{X} è costruita con il valore medio e la varianza dei canali di colore di ogni pozzetto, mentre il vettore \mathbf{y} fa riferimento alla concentrazione cellulare. Il numero di variabili latenti è uguale a 3.

Intensità di luce ($\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Giorno	Errore relativo medio
35	0	16%
	1	20%
	2	25%
	3	33%
	4	17%
150	0	0.09%
	1	46%
	2	11%
	3	17%
	4	13%
1000	0	14%
	1	47%
	2	10%
	3	23%
	4	12%

La diversa costruzione della matrice dei predittori \mathbf{X} , formata da tutti i *pixel* di ogni pozzetto e dalla permutazione della loro posizione, ha permesso di ridurre notevolmente l'errore di predizione, come evidenziato in tabella 4.3. È possibile osservare come l'errore relativo medio si riduca nella quasi totalità delle predizioni, evidenziate dal carattere grassetto. In presenza di

basse concentrazioni e di fenomeni di acclimatazione, la PLS conduce ugualmente ad un errore elevato, ma che non supera mai il 30%. Inoltre, ad alte concentrazioni, ovvero nei giorni conclusivi degli esperimenti svolti a 150 e 950 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, si ottengono errori molto bassi e confrontabili con l'errore di misura dello strumento utilizzato per la conta cellulare.

Lo svolgimento dei test predittivi sul singolo giorno si sono dimostrati di grande importanza, poiché hanno permesso di comprendere le criticità del modello predittivo, ovvero le basse concentrazioni e la fase di acclimatazione della biomassa microalgale. I modelli predittivi impiegati per la stima della concentrazione cellulare, comprendenti tutti i campionamenti riferiti ad una singola intensità luminosa, vengono effettuati, quindi, solamente sui giorni 2, 3 e 4.

Tabella 4.3 errore relativo medio delle predizioni svolte tramite PLS, in riferimento ai campionamenti di un singolo giorno e di una singola luce. La matrice X è costruita, per ogni pozzetto, con i valori di ogni pixel e le permutazioni della loro posizione, mentre il vettore y fa riferimento alla concentrazione cellulare. Il numero di variabili latenti è uguale a 3. Le predizioni che presentano un errore minore rispetto alla precedente costruzione della matrice X sono riportati in grassetto.

Intensità di luce ($\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Giorno	Errore relativo medio
35	0	14.2%
	1	21%
	2	20.4%
	3	23.4%
	4	8.8%
150	0	0.07%
	1	24%
	2	8.7%
	3	11.2%
	4	7%
1000	0	7.9%
	1	29.4%
	2	7.38%
	3	13.4%
	4	10.3%

4.2.2 PLS su singola intensità di luce

La regressione dei minimi quadrati considera i campionamenti dei giorni 2, 3 e 4 effettuati su entrambi gli esperimenti svolti ad un'intensità luminosa. In tal modo si introduce un aspetto dinamico al modello, che deve stimare la concentrazione cellulare di giorni differenti, così da caratterizzare l'intera curva di crescita. I primi due giorni vengono esclusi dal modello predittivo poiché i fenomeni di acclimatazione tendono a peggiorare notevolmente la stima della concentrazione. La matrice dei predittori X è stata costruita sia con i valori medi e la varianza dei canali di colore di ogni singolo pozzetto, sia con i valori di tutti i *pixel* e le

permutazioni della loro posizione all'interno del pozzetto stesso, ed è formata da 144 osservazioni, di cui 132 servono a calibrare il modello e 12 sono utilizzate nella fase di predizione. Data l'introduzione della dinamica nel modello, sono stati aggiunti, come predittori, i valori di alcuni parametri ottenuti dai test con il fluorimetro, così da favorire la corretta caratterizzazione della biomassa microalgale. I parametri introdotti sono di seguito riportati e fanno riferimento al protocollo descritto nel paragrafo §2.1.4.2:

- F_v/F_m
- F_m
- NPQ_{L1} , valore di NPQ ottenuto all'impulso luminoso 1
- NPQ_{L2} , valore di NPQ ottenuto all'impulso luminoso 2
- NPQ_{L3} , valore di NPQ ottenuto all'impulso luminoso 3
- NPQ_{L4} , valore di NPQ ottenuto all'impulso luminoso 4
- NPQ_{Lss} , valore di NPQ ottenuto allo stato stazionario.

Per il vettore delle risposte y è stata impiegata sia la concentrazione cellulare, sia il logaritmo naturale della concentrazione. Lo svolgimento dell'analisi di sensibilità ha fornito il numero ottimale di variabili latenti, che risulta uguale a 4. La valutazione della stima della concentrazione è stata effettuata calcolando l'errore relativo medio.

In tabella 4.4 sono riportati gli errori ottenuti da PLS applicata ai *batch* svolti ad una singola luce, utilizzando come matrice X il valore medio e la varianza dei canali di colore di ogni pozzetto e come vettore y sia la concentrazione cellulare che il logaritmo della concentrazione. È possibile notare come l'introduzione del logaritmo della concentrazione e dei parametri ottenuti dai test svolti con il fluorimetro PAM permetta di ridurre l'errore ottenuto alle basse ed alte intensità luminose, mentre per gli esperimenti svolti a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ l'errore rimane tra il 16-17%. Nonostante le modifiche apportate alla matrice dei predittori e al vettore delle risposte, l'errore riferito agli esperimenti effettuati a 35 e $950 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ risulta essere particolarmente elevato.

Tabella 4.4: errore relativo medio delle predizioni svolte tramite PLS, in riferimento al modello comprendente i giorni 2, 3 e 4 degli esperimenti svolti ad un'intensità luminosa. Sono presentati i risultati ottenuti dalla sola analisi d'immagine e dall'analisi d'immagine con l'aggiunta di 7 parametri derivanti dai test con fluorimetro. La matrice X è ottenuta con la media e la varianza dei valori dei canali di colore di ciascun pozzetto, mentre il vettore y è costruito sia con la concentrazione cellulare sia con il logaritmo della concentrazione. Il numero di variabili latenti è uguale a 3. La configurazione che fornisce l'errore più basso per ciascuna luce è evidenziata con il carattere grassetto.

Intensità luminosa ($\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Errore relativo medio			
	PLS con concentrazione		PLS con $\ln(\text{concentrazione})$	
	Analisi Imm.	An. Imm. + PAM	Analisi Imm.	An. Imm. + PAM
35	27.9%	25.7%	33.7%	25.0%
150	17.0%	16.9%	16.0%	16.4%
950	27.7%	28.4%	33.2%	22.0%

La matrice dei predittori X è stata ottenuta anche utilizzando i valori dei canali di colore di ciascun *pixel* contenuto nei pozzetti e dalle permutazioni della loro posizione. In questo modello, il vettore delle risposte è stato ottenuto solamente con il valore della concentrazione cellulare. I risultati ottenuti sono presentati in tabella 4.5, dove è possibile notare come l'introduzione dei parametri relativi alla fluorescenza clorofilliana tendano a peggiorare la capacità predittiva del modello. L'utilizzo di tutti i *pixel* e delle permutazioni permette di ottenere, relativamente agli esperimenti svolti a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, un errore di 13.3%, mentre per la bassa ed alta intensità luminosa non si notano miglioramenti.

Tabella 4.5: errore relativo medio delle predizioni svolte tramite PLS, in riferimento al modello comprendente i giorni 2, 3 e 4 degli esperimenti svolti ad un'intensità luminosa. Sono presentati i risultati ottenuti dalla sola analisi d'immagine e dall'analisi d'immagine con l'aggiunta di 7 parametri derivanti dai test con fluorimetro. La matrice X è costruita, per ogni pozzetto, con i valori di ogni *pixel* e le permutazioni della loro posizione, mentre il vettore y è costruito con la concentrazione cellulare dei micro-fotobioreattori. Il numero di variabili latenti è uguale a 3.

Intensità luminosa ($\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Errore relativo medio	
	PLS con concentrazione	
	Analisi Imm.	An. Imm. + PAM
35	25.6%	24.9%
150	13.3%	16.3%
950	23.8%	28.4%

Infine, in tabella 4.6 sono riportati gli errori ottenuti utilizzando solamente i parametri dei test svolti con il fluorimetro. Si può notare come l'errore che si commette senza l'utilizzo dell'analisi d'immagine risulta maggiore, specialmente per l'intensità luminosa pari a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Tabella 4.6: errore relativo medio delle predizioni svolte tramite PLS, in riferimento al modello comprendente i giorni 2, 3 e 4 degli esperimenti svolti ad un'intensità luminosa. La matrice X è costruita solamente con i 7 parametri ottenuti dai test inerenti alla fluorescenza clorofilliana. Il numero di variabili latenti è uguale a 3.

Intensità luminosa ($\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Errore relativo medio
35	27.5%
150	42%
950	29.6%

4.2.3 PLS su più intensità luminose

La regressione dei minimi quadrati parziali è stata applicata sui campionamenti effettuati durante i giorni 2, 3 e 4 di entrambi gli esperimenti svolti alle intensità luminose di 35, 150 e 950 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, in modo da introdurre, oltre alla dinamica derivante dalla presenza di più giorni, l'aspetto dell'individuazione della radiazione luminosa. Il modello, infatti, per stimare correttamente la concentrazione microalgale, deve risultare efficace nel riconoscere micro-fotobioreattori che hanno subito processi di acclimatazione differenti. Tale modello permetterebbe di caratterizzare l'intera curva di crescita di microalghe cresciute a differenti intensità luminose. L'introduzione di parametri relativi alla fluorescenza clorofilliana risulta, quindi, molto importante, poiché fornisce ulteriori informazioni inerenti all'acclimatazione. I parametri introdotti nella matrice dei predittori \mathbf{X} , ottenuti attraverso i test con il fluorimetro, sono di seguito riportati e fanno riferimento al protocollo descritto nel paragrafo §2.1.4.2:

- F_v/F_m
- F_m
- NPQ_{L1} , valore di NPQ ottenuto all'impulso luminoso 1
- NPQ_{L2} , valore di NPQ ottenuto all'impulso luminoso 2
- NPQ_{L3} , valore di NPQ ottenuto all'impulso luminoso 3
- NPQ_{L4} , valore di NPQ ottenuto all'impulso luminoso 4
- NPQ_{Lss} , valore di NPQ ottenuto allo stato stazionario.

I primi due giorni vengono esclusi dal modello predittivo poiché la fase di transizione nell'acclimatazione delle microalghe peggiora notevolmente la stima della concentrazione.

La matrice dei predittori \mathbf{X} è stata ottenuta sia con i valori medi dei canali di colore di ogni singolo pozzetto, sia con i valori di tutti i *pixel* e le permutazioni della loro posizione all'interno del pozzetto stesso, ed ha un totale di 432 osservazioni, di cui 396 servono a calibrare il modello, mentre le restanti 36 sono utilizzate in fase di predizione. Il vettore delle risposte \mathbf{y} è stato costruito sia con la concentrazione cellulare, sia con il logaritmo naturale della concentrazione. Lo svolgimento dell'analisi di sensibilità ha fornito il numero ottimale di variabili latenti, che risulta uguale a 6. La valutazione della stima della concentrazione è stata effettuata calcolando l'errore relativo medio e l'errore assoluto medio.

In tabella 4.7 sono presentati i risultati ottenuti svolgendo la regressione PLS su tutti i campionamenti eseguiti nei giorni 2, 3 e 4 alle intensità luminose di 35, 150 e 950 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilizzando come matrice \mathbf{X} i valori medi dei canali di colore di ogni pozzetto e come vettore \mathbf{y} la concentrazione cellulare. Si può notare come l'introduzione dei parametri ottenuti dallo svolgimento dei test con il fluorimetro apporti un miglioramento nella predizione, riducendo sia l'errore relativo medio che l'errore assoluto medio.

Tabella 4.7: *errore relativo medio ed errore assoluto medio delle predizioni svolte tramite PLS, in riferimento al modello comprendente i giorni 2, 3 e 4 degli esperimenti svolti a tutte le intensità luminose. Sono presentati i risultati ottenuti dalla sola analisi d'immagine e dall'analisi d'immagine con l'aggiunta di 7 parametri derivanti dai test con fluorimetro. La matrice X è ottenuta con la media e la varianza dei valori dei canali di colore di ciascun pozzetto, mentre il vettore y è costruito con la concentrazione cellulare. Il numero di variabili latenti è uguale a 6.*

Intensità luminosa ($\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Con parametri PAM		Senza parametri PAM	
	Errore relativo medio	Errore assoluto medio (mln cellule/mL)	Errore relativo medio	Errore assoluto medio (mln cellule/mL)
Tutte le luci	29%	6.7	31.5%	7.6

La maggior capacità predittiva del modello è evidenziata anche in Figura 4.3, dove sono riportati i grafici degli errori relativi di ogni singola osservazione (36 usate nella fase di predizione che viene ripetuta 50 volte), con e senza i valori ottenuti dal fluorimetro. È possibile osservare come, in Figura 4.3a, dove avviene l'introduzione dei dati del fluorimetro, vi sia un maggior numero di osservazioni con errore relativo inferiore al 20% e un minor numero di pozzetti che vengono identificati con errori molto alti. È possibile affermare, quindi, che l'utilizzo dei dati inerenti alla fluorescenza clorofilliana portino a migliorare la capacità predittiva del modello.

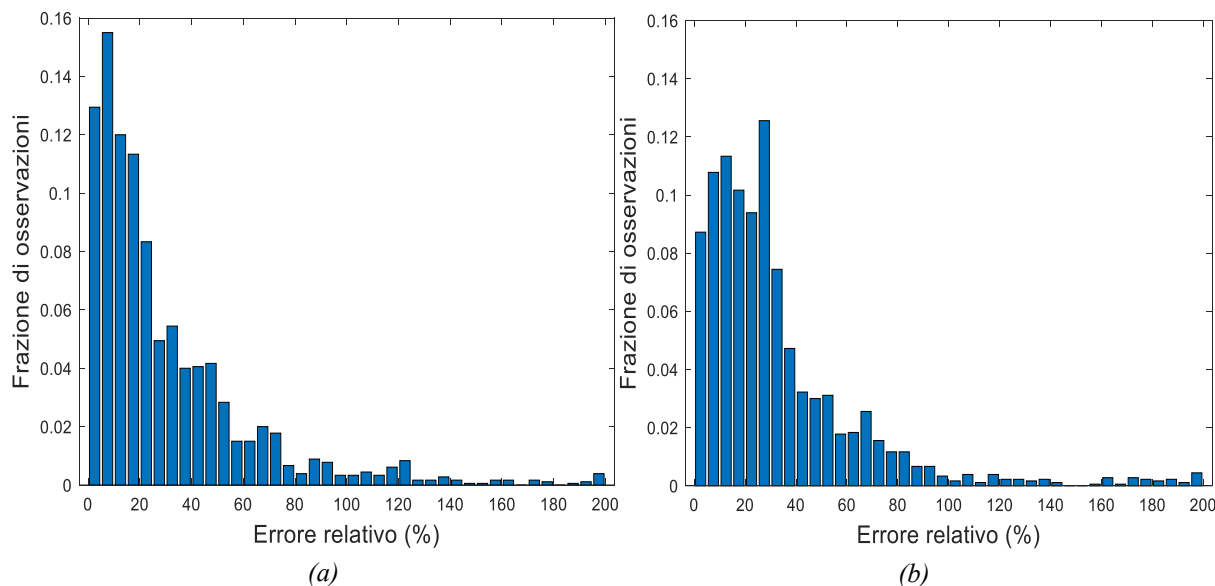


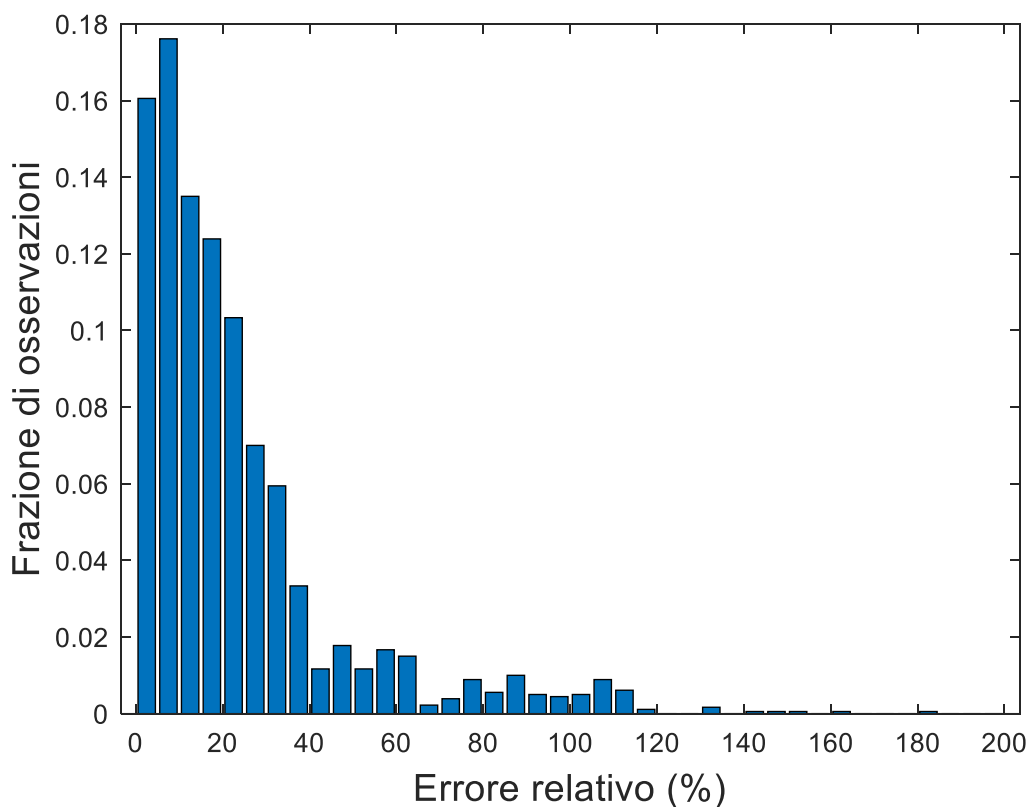
Figura 4.3: *frazione di osservazioni aventi un determinato errore relativo di predizione. PLS svolta comprendendo i campionamenti dei giorni 2, 3 e 4 di tutte le luci, utilizzando come matrice X la media dei canali di colore di ogni pozzetto (a) introducendo i parametri ottenuti dai test al fluorimetro e (b) non utilizzando i dati forniti dal fluorimetro.*

Allo scopo di ridurre l'errore di stima del modello, il vettore delle risposte y è stato successivamente ottenuto calcolando il logaritmo della concentrazione. In tal modo, è stato possibile ridurre notevolmente l'errore, come presentato in tabella 4.8.

Tabella 4.8: *errore relativo medio ed errore assoluto medio delle predizioni svolte tramite PLS, in riferimento al modello comprendente i giorni 2, 3 e 4 degli esperimenti svolti a tutte le intensità luminose. La matrice X è ottenuta con la media e la varianza dei valori dei canali di colore di ciascun pozzetto ed aggiungendo, come predittori, i valori dei 7 parametri ottenuti dal fluorimetro. Il vettore y è costruito con la concentrazione cellulare. Il numero di variabili latenti è uguale a 6.*

Intensità luminosa ($\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Errore relativo medio	Errore assoluto medio (mln cellule/mL)
Tutte le luci	22.5%	6.2

È possibile osservare come l'errore relativo medio sia diminuito dal 30% al 22.5%, permettendo di ottenere una stima più precisa della concentrazione. Il miglioramento della capacità predittiva risulta evidente anche in Figura 4.4, dove sono presentati i grafici dell'errore relativo medio e dell'errore assoluto medio. In Figura 4.4a, dove viene riportato l'errore relativo medio, è possibile osservare come la concentrazione del 60% dei pozzetti venga stimata con un errore inferiore al 20%, mentre senza l'utilizzo del logaritmo della concentrazione la percentuale era di circa il 50%, come visibile in Figura 4.3a. Inoltre, si è notevolmente ridotto il numero di pozzetti con una concentrazione cellulare stimata con un errore superiore al 100%. In Figura 4.4b è riportato l'errore assoluto di predizione ed è possibile osservare come la concentrazione del 78% dei pozzetti sia stimata con un errore assoluto inferiore ai 10 milioni di cellule mL^{-1} .



(a)

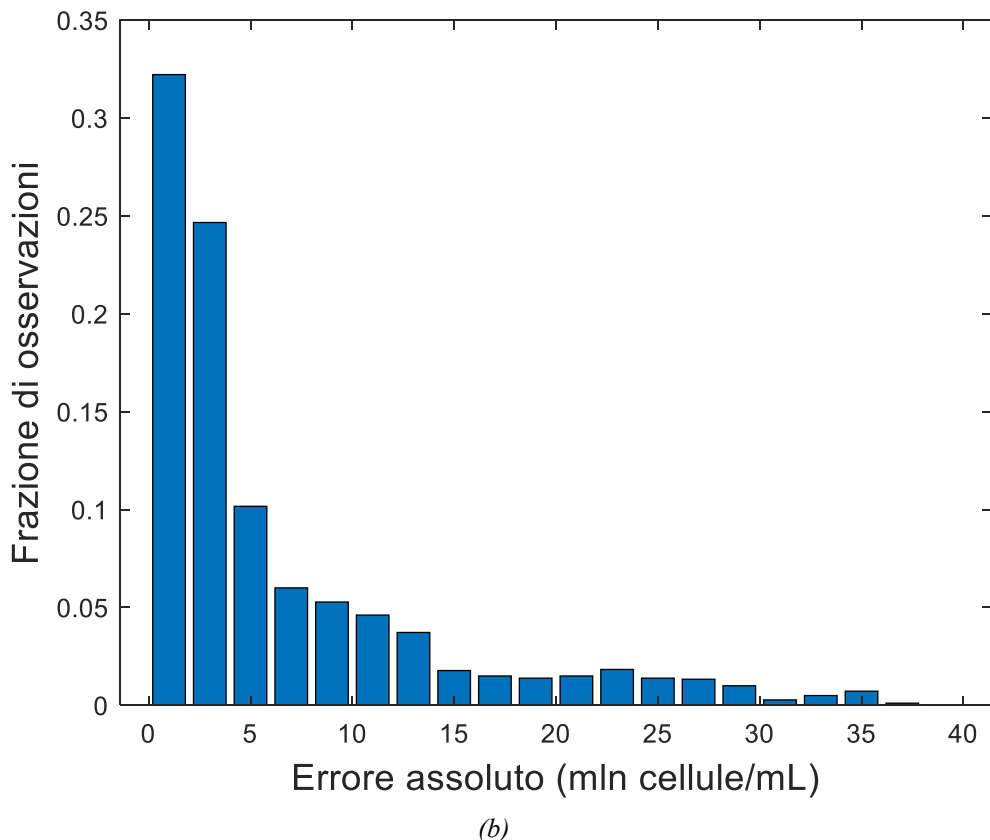


Figura 4.4: (a) errore relativo medio ed (b) errore assoluto medio delle predizioni svolte sui giorni 2, 3 e 4 di tutte le intensità luminose utilizzando la media dei valori del canale di colore di ogni pozzetto, i valori dei 7 parametri ottenuti con il fluorimetro e il logaritmo della concentrazione.

La costruzione della matrice dei predittori \mathbf{X} , ottenuta impiegando i valori RGB di tutti i pixel e le permutazioni della loro posizione all'interno del pozzetto, non è stata utilizzata nello svolgimento delle regressioni PLS che includono tutte le intensità luminose, poiché l'errore relativo medio di stima risulta essere molto più elevato. L'errore ottenuto da tale matrice dei predittori, infatti, è uguale a 29.4%, utilizzando il logaritmo della concentrazione nel vettore delle risposte, mentre risulta essere uguale a 32.5% se viene utilizzata la concentrazione cellulare.

In tabella 4.9 sono riportati i risultati delle regressioni PLS che utilizzano come predittori solamente i dati ottenuti tramite il fluorimetro. È possibile osservare come, con entrambe le costruzioni del vettore delle risposte, l'errore, sia relativo che assoluto, sia elevato e molto superiore rispetto a quello ottenuto impiegando anche l'analisi d'immagine.

Tabella 4.9: *errore relativo medio ed errore assoluto medio delle predizioni svolte tramite PLS, in riferimento al modello comprendente i giorni 2, 3 e 4 degli esperimenti svolti a tutte le intensità luminose. La matrice X è ottenuta utilizzando i valori dei 7 parametri ottenuti dal fluorimetro. Il vettore y è costruito sia con la concentrazione cellulare che con il logaritmo della concentrazione. Il numero di variabili latenti è uguale a 6.*

Intensità luminosa ($\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	PLS con concentrazione		PLS con $\ln(\text{concentrazione})$	
	Errore relativo medio	Errore assoluto medio (mln cellule/mL)	Errore relativo medio	Errore assoluto medio (mln cellule/mL)
Tutte le luci	43.6%	10.8%	34.2%	11.1

In conclusione, è possibile affermare che l'analisi d'immagine permette di ottenere una stima più precisa della concentrazione cellulare in micro-fotobioreattori rispetto al fluorimetro. La combinazione tra fluorimetro ed analisi d'immagine permette di ottenere i risultati migliori, anche se l'errore relativo medio risulta essere comunque elevato. Le criticità maggiori si riscontrano nei pozzetti a bassa concentrazione, dove essa viene stimata anche con errori relativi superiori al 100%.

4.2.4 PLS sulle concentrazioni iniziali

La regressione PLS è stata applicata sui campionamenti effettuati durante i giorni 2, 3 e 4 di entrambi gli esperimenti svolti alle intensità luminose di 35, 150 e 950 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, ma considerando solo i micro-fotobioreattori riempiti con la concentrazione tale quale, ovvero con la medesima concentrazione del fotobioreattore soggetto al campionamento. In tal modo, si ottiene un modello che non comprende i giorni iniziali degli esperimenti, soggetti alla fase di acclimatazione delle microalghe, e non comprende i pozzetti con le diluizioni, che presentano valori di concentrazioni più bassi e la cui stima risulta particolarmente complessa. Le diluizioni non vengono scartate, ma vengono inserite nella matrice dei predittori X , secondo la costruzione presentata in Figura 4.5.

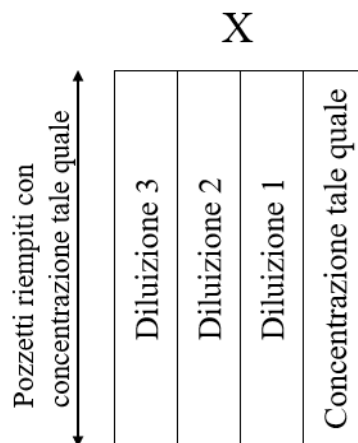


Figura 4.5: *costruzione della matrice dei predittori X , utilizzando i valori medi dei canali RGB dei pixel di un pozzetto e di quelli delle sue diluizioni.*

Ogni micro-fotobioreattore, contenente la concentrazione tale quale, è caratterizzato dalla media e dalla varianza dei valori dei canali RGB dei *pixel* dello stesso e dalla media e varianza dei valori dei canali di colore dei *pixel* presenti nei pozzetti riempiti con le diluizioni 1, 2 e 3 (ottenute come descritto nel paragrafo §2.1.6). Ciò consente di creare un percorso temporale per ogni osservazione, che viene identificata non solo dai dati del pozzetto da stimare, ma anche dalle sue diluizioni.

Alla matrice dei predittori sono introdotti anche ulteriori parametri, ottenuti attraverso test con il fluorimetro, che sono di seguito riportati e fanno riferimento al protocollo descritto nel paragrafo §2.1.4.2:

- F_v/F_m
- F_m
- NPQ_{L1} , valore di NPQ ottenuto all'impulso luminoso 1
- NPQ_{L2} , valore di NPQ ottenuto all'impulso luminoso 2
- NPQ_{L3} , valore di NPQ ottenuto all'impulso luminoso 3
- NPQ_{L4} , valore di NPQ ottenuto all'impulso luminoso 4
- NPQ_{Lss} , valore di NPQ ottenuto allo stato stazionario.

Il vettore delle risposte y è stato costruito sia con il valore della concentrazione cellulare che con il valore del logaritmo della concentrazione. Il numero di variabili latenti ottimale è uguale a 6.

In tabella 4.10 sono riportati i risultati ottenuti, ed è possibile osservare come tale modello permetta di raggiungere un errore relativo medio ridotto, rispetto alle regressioni presentate nel paragrafo §4.2.3. L'errore assoluto medio, invece, risulta essere leggermente maggiore e ciò può essere spiegato con l'esclusione dalla regressione dei micro-fotobioreattori a bassa concentrazione. Nonostante l'errore relativo sia basso, ad elevate concentrazioni l'errore assoluto può assumere valori importanti.

Tabella 4.10: *errore relativo medio ed errore assoluto medio delle predizioni svolte tramite PLS, in riferimento al modello comprendente i giorni 2, 3 e 4 degli esperimenti svolti a tutte le intensità luminose. La matrice X è ottenuta con la media e la varianza dei valori dei canali RGB del pozzetto e di 3 sue diluizioni. Il vettore y è costruito sia con la concentrazione cellulare che con il logaritmo della concentrazione. Il numero di variabili latenti è uguale a 6.*

Intensità luminosa ($\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	PLS con concentrazione		PLS con $\ln(\text{concentrazione})$	
	Errore relativo medio	Errore assoluto medio (mln cellule/mL)	Errore relativo medio	Errore assoluto medio (mln cellule/mL)
Tutte le luci	19.4%	7.64	13.7%	7.27

Il miglioramento apportato da tale modello è evidente anche in Figura 4.6, dove sono presentate le frazioni di pozzetti stimati con un determinato errore relativo ed assoluto. In Figura 4.6a è

riportato l'errore relativo dei campionamenti ed è possibile notare come quasi l'80% dei pozzetti venga stimato con un errore inferiore al 20%. Inoltre, non sono presenti osservazioni che vengono stimate con errori superiori al 100%, dato che non sono presenti pozzetti microfotobioreattori aventi concentrazioni molto basse. In Figura 4.6b è presentato l'errore assoluto delle osservazioni, il quale è inferiore ai 10 milioni di cellule mL^{-1} per circa l'80% dei pozzetti.

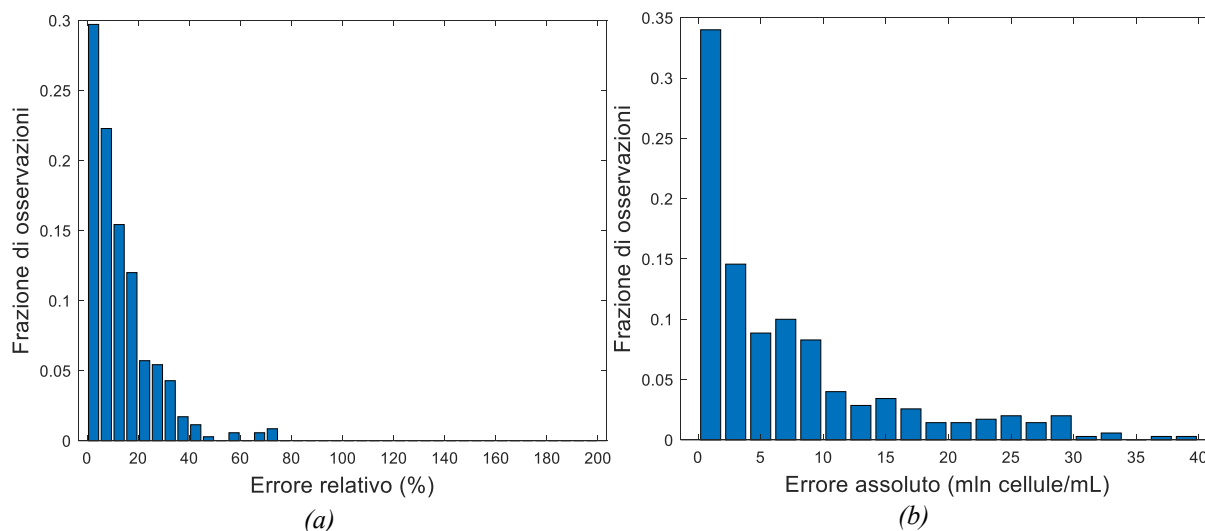


Figura 4.6: (a) errore relativo medio ed (b) errore assoluto medio delle predizioni svolte sui pozzetti riempiti con concentrazione tale quale dei giorni 2, 3 e 4 di tutte le intensità luminose. La matrice \mathbf{X} è costruita con la media e la varianza dei valori del canale di colore di ogni pozzetto, i valori dei 7 parametri ottenuti con il fluorimetro e le diluizioni 1, 2 e 3 sono aggiunte ai predittori. Il vettore \mathbf{y} è ottenuto con il logaritmo della concentrazione.

4.3 Commenti finali

L'applicazione della regressione PLS sui campionamenti effettuati allo stesso istante temporale degli esperimenti svolti alla stessa intensità luminosa ha permesso di evidenziare gli aspetti critici sulle stime della concentrazione dei pozzetti, ovvero le basse concentrazioni e la fase di acclimatazione della microalga. Gli errori relativi medi ottenuti da questo modello, escludendo il giorno 0 ed 1, che presentano fenomeni di acclimatazione, sono molto bassi per la media ed alta intensità luminosa e variano dal 7 al 13%, errore di poco superiore a quello strumentale della camera Burkler. Le stime svolte a $35 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentano, invece, un errore maggiore, causato dalla minor concentrazione dei pozzetti. La configurazione migliore consiste nell'utilizzo della matrice \mathbf{X} costruita con tutti i *pixel* dei pozzetti e le permutazioni della loro posizione.

La regressione PLS effettuata su una singola intensità di luce è stata svolta escludendo i giorni 0 e 1, a causa dei fenomeni di acclimatazione evidenziati nelle stime sul singolo giorno. L'introduzione dei dati ottenuti dal fluorimetro e l'utilizzo del logaritmo della concentrazione, che presenta un andamento lineare rispetto al tempo, sono risultati molto importanti in questo

modello, poiché hanno permesso di ridurre l'errore di stima. Gli errori relativi medi, ottenuti utilizzando i parametri della fluorescenza clorofilliana, la media e la varianza dei valori dei canali di colore come predittori e il logaritmo della concentrazione, sono del 25% per l'intensità luminosa pari a $35 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, del 16% alla luce di $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e del 22% per l'intensità di luce di $950 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Le stime svolte sul modello comprendenti tutte le intensità luminose su cui sono stati effettuati gli esperimenti hanno evidenziato come l'analisi d'immagine consenta di ottenere un errore relativo medio di 31.5%, riducendo così l'errore relativo medio che si commette con l'utilizzo della sola fluorescenza clorofilliana, pari a 43.6%. Il modello più efficace risulta essere la combinazione della due tecniche, che, affiancate all'utilizzo del logaritmo della concentrazione, permette di ottenere un errore relativo medio pari a 22.5%. La matrice **X** utilizzata per ricavare questi errori è costruita con la media e la varianza dei valori dei canali di colore di ogni pozzetto. La regressione PLS effettuata solamente sui pozzetti aventi concentrazione tale quale consente di rimuovere le osservazioni aventi concentrazione molto bassa e di aumentare, quindi, la capacità predittiva del modello. L'utilizzo delle diluzioni escluse come predittori dei relativi pozzetti, come mostrato in Figura 4.5, e l'aggiunta dei parametri della fluorescenza clorofilliana permettono di ottenere un errore relativo medio di 19.4%. L'impiego, in tale modello, del logaritmo della concentrazione consente di ridurre ulteriormente l'errore relativo medio che risulta pari a 13.7%, ed è confrontabile con quello strumentale della camera Burker.

Per ottenere tale risultato, però, è stata effettuata la rimozione delle osservazioni che presentano le maggiori criticità per il modello, ovvero la difficoltà di stimare le basse concentrazioni e la fase di acclimatazione delle microalghe.

Conclusioni e sviluppi futuri

Il lavoro di Tesi si è proposto di testare e verificare un metodo alternativo per il monitoraggio *online* della crescita di biomassa microalgale. Lo sviluppo di tale metodo potrebbe rendere possibile l'utilizzo di micro-fotobioreattori, così da velocizzare e rendere più economica l'acquisizione di dati.

Inizialmente sono stati effettuati degli esperimenti *batch* monitorati quotidianamente attraverso diverse tecniche analitiche, così da permettere la formazione di un set di dati. Successivamente, sono stati svolti delle analisi preliminari, per verificare la consistenza dei dati ottenuti e per valutare la possibilità di applicare l'analisi d'immagine multivariata per il monitoraggio delle microalghe. Infine, sono state applicate tecniche di regressione PLS per stimare la concentrazione microalgale contenuta in micro-fotobioreattori.

Il confronto dei dati ottenuti con quelli presenti in letteratura ha confermato la consistenza dei test svolti, evidenziando come i diversi parametri impiegati ed analizzati hanno fornito delle curve simili a quelle presenti nel lavoro di Gris *et al.* (2014).

L'applicazione di tecniche di analisi d'immagine multivariata ha permesso di osservare una direzione principale, lungo la quale si dispongono i *pixel* rappresentanti concentrazioni microalgali differenti, così da confermare la fattibilità dell'utilizzo di metodi di regressione lineare.

L'utilizzo della regressione dei minimi quadrati parziali, applicata ad un singolo giorno di una singola intensità luminosa, ha permesso di identificare in modo molto efficace la concentrazione dei pozzetti contenenti microalghe già acclimatate, anche senza l'utilizzo di dati relativi alla fluorescenza clorofilliana. Molto importante si è rivelato il diverso metodo di costruzione della matrice **X**, ottenuta tramite permutazione dei *pixel*. Tali risultati hanno evidenziato la criticità della fase di acclimatazione della microalga, che impedisce la corretta stima della concentrazione.

La regressione applicata a tutti i campionamenti effettuati ad una singola intensità luminosa ha riscontrato problemi maggiori. Nonostante la rimozione dei giorni 0 e 1 (acclimatazione della microalga) e l'introduzione dei dati ottenuti tramite il fluorimetro, l'errore relativo medio di predizione risulta essere elevato: 25% per la bassa intensità luminosa e 22% per l'alta intensità luminosa, mentre per la luce pari a $150 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ si ottiene un errore del 16%. Gli errori riscontrati sono comunque inferiori a quelli ottenuti dalla regressione svolta solamente con i dati della fluorescenza clorofilliana, indicando così i miglioramenti che questo metodo può apportare al monitoraggio *online* delle microalghe.

Il modello di regressione applicato a tutte le intensità luminose presenta un errore piuttosto elevato. La configurazione migliore si basa sulla media e varianza dei valori dei canali RGB

dei *pixel* contenuti in un pozzetto come predittori e con il logaritmo della concentrazione all'interno del vettore delle risposte. Questa configurazione consente di ottenere un errore relativo medio uguale a 22.5%. Le criticità maggiori sono dovute alla stima di pozzetti a basse concentrazioni, che il modello fatica a caratterizzare in modo efficace. Tale errore, seppur elevato, risulta essere notevolmente inferiore a quello ottenuto con i soli dati forniti dalla fluorescenza clorofilliana.

La stima dei pozzetti contenenti la concentrazione tale quale, ovvero la medesima concentrazione del fotobioreattore soggetto al campionamento, risulta, invece, maggiormente accurata, specialmente nella configurazione che include i valori dei pozzetti, contenenti le diluizioni, come predittori. Tale modello consente di ottenere un errore relativo medio uguale a 13.7%.

L'analisi di immagine multivariata si è dimostrata essere un metodo di monitoraggio più preciso della fluorescenza clorofilliana, ma, nonostante gli errori ottenuti siano inferiori, l'errore relativo medio risulta decisamente elevato. Se si considera un modello complesso, come quello basato su più intensità luminose, la sola analisi d'immagine non fornisce una stima abbastanza precisa, con un errore del 31.5%. Il metodo di monitoraggio più robusto è l'affiancamento delle due tecniche.

Gli aspetti più critici di tale metodo si sono rivelati le basse concentrazioni, difficilmente stimabili in modo accurato, e la presenza di fenomeni di acclimatazione delle microalghe, i quali riducono notevolmente, specialmente nelle fasi iniziali del *batch*, le performance del modello. Ciò nonostante, le stime ottenute con tale metodo risultano essere migliori di quelle ottenute con la sola fluorescenza clorofilliana. Pertanto, sarebbe utile testare gli stessi modelli su campioni già acclimatati alle intensità luminose, ovvero sia disporre di microalghe in reattori in continuo in stato stazionario e che, quindi, presentano caratteristiche costanti. Inoltre, il modello andrebbe poi testato direttamente su micro-fotobioreattori, così da valutarne la precisione delle stime su un sistema di crescita basato su scala microscopica. Infine, il sistema di *masking* è manuale e talvolta risulta essere leggermente impreciso. Sarebbe molto utile lo sviluppo di un *software* che riconosca automaticamente la piattaforma microfluidica e applichi la maschera autonomamente.

Riferimenti Bibliografici

- Allen Olson, J. (1989). Provitamin A Function of Carotenoids: The Conversion of β -Carotene into Vitamin A. *The Journal of Nutrition*, **119**, 105–108.
- Castaldello, C., E. Sforza, E. Cimetta, T. Morosinotto e F. Bezzo (2019). Microfluidic Platform for Microalgae Cultivation under Non-limiting CO₂ Conditions. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **58**, 18036–18045.
- Chisti, Y. (2013). Constraints to commercialization of algal fuels. *Journal of Biotechnology*, **167**, 201–214.
- De Farias Silva, C. E., B. Gris e A. Bertucco (2016). Simulation of microalgal growth in a continuous photobioreactor with sedimentation and partial biomass recycling. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **33**, 773–781.
- Duysens, L. N. M. (1964). Photosynthesis. In: *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 1–104.
- Dyerberg, J. H.O. Bang, E. Stoffersen, S. Moncada e J.R. Vane (1978). Eicosapentaenoic Acid and Prevention of Thrombosis and Artherosclerosis?. *The Lancet*, **312**, 117–119.
- Facco, P. (2014). *Development of Multivariate Statistical Techniques for Quality Monitoring in the Batch Manufacturing of High Value Added Products*. Tesi di dottorato in Ingegneria Chimica, Università di Padova.
- Facco, P., A. C. Santomaso e M. Barolo (2017). Artificial vision system for particle size characterization from bulk materials. *Chemical Engineering Science*, **164**, 246–257.
- Fuentes, J. L., I. Garbayo, M. Cuaresma, Z. Montero, M. Gonzalez-Del-Valle e C. Vilchez (2016). Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. *Marine Drugs*, **14**, 100.
- Gris, B., T. Morosinotto, G.M. Giacometti, A. Bertucco e E. Sforza (2014). Cultivation of *Scenedesmus obliquus* in photobioreactors: Effects of light intensities and light-dark cycles on growth, productivity, and biochemical composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **172**, 2377–2389.
- Guesnet, P. e J.-M. Alessandri (2011). Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) – Implications for dietary recommendations. *Biochimie*, **93**, 7–12.

- Jackson, J. E. (1980). Principal Components and Factor Analysis: Part I—Principal Components. *Journal of Quality Technology*, **12**, 201–213.
- Khan, M. I., J. H. Shin e J. D. Kim (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, **17**, 1–21.
- Kuncová-Kallio, J. e P. J. Kallio (2006). PDMS and Its Suitability for Analytical Microfluidic Devices. Presentato a: *2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, New York (U.S.A), 2486–2489.
- Mata, T. M., A. A. Martins e N. S. Caetano (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**, 217–232.
- McDonald, J. C. e G. M. Whitesides (2002). Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Accounts of Chemical Research*, **35**, 491–499.
- Milledge, J. J. (2011). Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **10**, 31–41.
- Monetti, F. (2015). *Sviluppo di micro-fotobioreattori per la crescita di microalghe*. Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica, DII, Università di Padova.
- Murchie, E. H. e T. Lawson (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 3983–3998.
- Pastore, M. (2016). *Dalla fotosintesi alla depurazione: sfruttamento degli scambi gassosi in una popolazione mista di alghe e batteri per un'efficiente rimozione degli inquinanti*. Tesi di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali, Dipartimento di Biologia, Università di Padova.
- Perin, G., E. Cimetta, F. Monetti, T. Morosinotto e F. Bezzo (2016). Novel micro-photobioreactor design and monitoring method for assessing microalgae response to light intensity. *Algal Research*, **19**, 69–76.
- Prats-Montalbán, J. M., A. de Juan e A. Ferrer (2011). Multivariate image analysis: A review with applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **107**, 1–23.
- Priyadarshani, I. e B. Rath (2012). Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *Algal Biomass Utilization*, **3**, 89–100.
- Photon Systems Instruments (2012). FluorCam Instruction manual. Photon Systems Instruments, Drasov, Repubblica Ceca.

- Rippka, R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman e R. Y. Stanier (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, **111**, 1–61.
- Sforza, E. (2019). *Comunicazione personale*.
- Soprana, M. (2017). *Caratterizzazione in Linea della Distribuzione Granulometrica di Miscele Mediante Analisi Multivariata di Immagine*. Tesi di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica, DII, Università di Padova.
- Spolaore, P., C. Joannis-Cassan, E. Duran e A. Isambet (2006). Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101**, 87–96.
- Tomba, E. (2009). *Tecniche di analisi multivariata di immagine per il monitoraggio della qualità di membrane a base di nanofibre polimeriche*. Tesi di Laurea in Ingegneria Chimica per lo Sviluppo Sostenibile, DIPIC, Università di Padova.
- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, **144**, 307–313.
- Zeiler, K. G., D.A. Heacox, S.T. Toon, K.L. Kadam e L.M. Brown (1995). The use of microalgae for assimilation and utilization of carbon dioxide from fossil fuel-fired power plant flue gas. *Energy Conversion and Management*, **36**, 707–712.

Ringraziamenti

Giunto alla conclusione del mio percorso universitario, mi sento in dovere di ringraziare chi mi ha supportato e sopportato in questi lunghi e impegnativi, ma meravigliosi anni.

Vorrei ringraziare innanzitutto il Professor Bezzo, che mi ha proposto questo lavoro di tesi interessante e stimolante ed è sempre stato preciso e disponibile per l'intera durata del progetto. Ringrazio, inoltre, il Professor Pierantonio Facco e la Professoressa Eleonora Sforza, per i consigli e gli utili spunti che mi hanno fornito durante lo svolgimento della tesi.

Un ringraziamento particolare va a Christopher Castaldello, per la pazienza dimostrata e il supporto che è riuscito a fornirmi, anche dalla Francia. Grazie anche ai dottorandi ed agli altri tesisti del CAPE-Lab e del Laboratorio Microalghe, con i quali ho trascorso il mio ultimo periodo all'interno dell'Università.

Un ringraziamento speciale a mia mamma Piera ed a mio papà Giuliano, che mi hanno quotidianamente supportato e sopportato più di tutti. Grazie anche a tutti i miei parenti, che sono sempre riusciti a trasmettermi il loro entusiasmo durante il mio percorso di studi.

Grazie a Maria Cecilia per il supporto che mi ha dato in questi mesi, per avermi spronato a dare il meglio e per essere stata sempre vicina a me.

Grazie a tutti i coinquilini, sia presenti che passati, e grazie a tutti i miei amici.

Questi anni di studio sarebbero stati molto più duri e faticosi senza la vostra presenza.