



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTÀ DI INGEGNERIA**

**DIPARTIMENTO DI PRINCIPI E IMPIANTI DI INGEGNERIA CHIMICA "I. SORGATO"**

**TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN  
INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI INDUSTRIALI**

**EFFETTO DELL'INTENSITÀ DI LUCE SULLA  
CRESCITA DI MICROALGHE:  
ANALISI SPERIMENTALE E IDENTIFICAZIONE  
DI MODELLI PREDITTIVI**

*Relatore: Prof. Fabrizio Bezzo*

*Correlatori: Prof. Alberto Bertucco*

*Dott.ssa Eleonora Sforza*

*Laureanda: KATIA ADAMI*

ANNO ACCADEMICO 2011-2012



# Riassunto

L'obiettivo del lavoro di Tesi è l'analisi dell'effetto dell'intensità di luce sulla velocità di crescita di una specie di microalghe (*Nannochloropsis salina*) sia attraverso dei test di laboratorio sia attraverso l'identificazione di un modello predittivo. Per quel che riguarda la fase sperimentale, si è valutato come colture di *Nannochloropsis salina* modificano la propria velocità di crescita se sottoposte a fonti di luce continua o pulsata a diversa intensità. Si è verificato che negli esperimenti a luce continua la velocità di crescita aumenta all'aumentare dell'intensità di luce fino ad un livello di fotoinibizione, oltre il quale la crescita è fortemente rallentata. Tuttavia, in condizioni di luce pulsata si è verificato che le microalghe possono resistere e crescere anche se l'intensità di luce è superiore a quella critica di fotoinibizione.

L'attività di modellazione è rappresentata dall'analisi critica e l'implementazione di alcuni modelli derivati dalla recente letteratura scientifica sull'argomento. In particolare, i dati sperimentali ottenuti dalle prove con luce continua sono stati utilizzati per l'identificazione dei parametri chiave nella descrizione della relazione tra crescita e luce. I modelli sono in grado di rappresentare solo parzialmente i dati sperimentali; lo studio, infatti, dimostra che sono presenti dei fenomeni inibitori che i modelli sinora apparsi in letteratura non sono in grado di descrivere adeguatamente.



# Indice

<b>INTRODUZIONE</b> .....	8
<b>CAPITOLO 1 - Produzione di biodiesel da microalghe</b> .....	1
1.1 IL BIODIESEL .....	3
1.1.1 Emissioni di gas serra e successivo sviluppo di biocarburanti .....	3
1.1.2 Biodiesel da microalghe.....	6
1.2 DESCRIZIONE GENERALE DELLE MICROALGHE .....	9
1.2.1 Microalghe .....	9
1.2.2 Crescita delle microalghe.....	10
1.2.3 La luce come variabile operativa .....	12
1.2.3.1 Fotoacclimatazione .....	17
1.2.3.2 Fotoinibizione .....	19
1.3 SISTEMI PER LA PRODUZIONE DI MICROALGHE SU LARGA SCALA .....	20
1.4 MODELLI DINAMICI RAPPRESENTATIVI DEI SISTEMI MICROALGALI .....	24
1.5 OBIETTIVO TESI.....	25
<b>CAPITOLO 2 - Analisi sperimentale</b> .....	27
2.1 OBIETTIVO DELL'ANALISI SPERIMENTALE.....	27
2.2 MATERIALI E METODI.....	27
2.2.1 Specie algale e mezzo di coltura .....	28
2.2.2 Apparecchiature .....	30
2.2.2.1 Il reattore .....	30
2.2.2.2 La lampada .....	33
2.2.3 Procedure e strumenti per analizzare le microalghe .....	33
2.2.3.1 Misura della crescita delle colture microalgali .....	34
2.2.3.2 Misura del peso secco .....	35
2.2.3.3 Estrazione dei pigmenti con solvente .....	35
2.2.3.4 Misura della fluorescenza in vivo .....	37
2.3 SVOLGIMENTO PROVE SPERIMENTALI .....	39
2.4 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	43
2.4.1 Irraggiamento continuo: variazione dell'intensità di luce.....	44

2.4.1.1	Curva di crescita .....	44
2.4.1.2	Efficienza fotosintetica .....	47
2.4.1.3	Concentrazione di pigmenti .....	48
2.4.2	Irraggiamento pulsato: variazione dell'intensità di luce impostata, della frequenza e del ciclo luce-buio.....	50
2.4.2.1	Curva di crescita .....	51
2.4.2.2	Efficienza fotosintetica .....	54
2.4.2.3	Concentrazione di pigmenti .....	54
<b>CAPITOLO 3</b>	<b>- La cinetica di crescita .....</b>	<b>57</b>
3.1	IL MODELLO A .....	57
3.1.1	Distribuzione della luce .....	57
3.1.2	Cinetica di crescita .....	60
3.2	IL MODELLO B (QUINN ET AL., 2011) .....	61
3.2.1	Distribuzione della luce .....	62
3.2.1.1	Approfondimento sull'uso della legge di Lambert-Beer .....	62
3.2.2	Velocità di fotosintesi .....	63
3.2.3	Velocità di respirazione .....	65
3.2.4	Velocità di crescita .....	65
3.2.5	Dipendenza dalla temperatura .....	66
3.2.6	Dipendenza dall'azoto .....	67
3.3	IL MODELLO C (BERNARD, 2011) .....	70
3.3.1	Interazione tra crescita e nutrienti .....	71
3.3.2	Interazione tra crescita e luce .....	72
3.3.3	Velocità di assorbimento dell'azoto .....	76
3.3.4	Respirazione cellulare .....	77
3.3.5	Distribuzione spaziale della luce .....	77
3.3.6	Velocità di crescita media .....	78
3.4	CONFRONTO MODELLI .....	79
<b>CAPITOLO 4</b>	<b>- Identificazione dei modelli di crescita .....</b>	<b>85</b>
4.1	IMPLEMENTAZIONE DEI MODELLI .....	85
4.2	STIMA DEI PARAMETRI.....	86
4.3	DEFINIZIONE DEI DATI SPERIMENTALI E DEI PARAMETRI.....	86
4.3.1	Dati sperimentali .....	87

4.3.2 Parametri .....	87
4.3.2.1 Modello A .....	87
4.3.2.2 Modello B .....	88
4.3.2.3 Modello C .....	91
4.4 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	93
4.4.1 Modello A .....	93
4.4.1.1 Stima separata .....	93
4.4.1.2 Stima contemporanea .....	95
4.4.1.3 Confronto tra stima separata e stima contemporanea del modello A .....	96
4.4.2 Modello B .....	98
4.4.2.1 Stima separata .....	99
4.4.2.2 Stima contemporanea .....	101
4.4.2.3 Confronto tra stima separata e stima contemporanea del modello B .....	102
4.4.3 Modello C .....	103
4.4.3.1 Stima separata .....	104
4.4.3.2 Stima contemporanea .....	106
4.4.3.3 Confronto tra stima separata e stima contemporanea del modello C .....	108
4.4.3.4 Stima inibizione .....	109
4.5 CONFRONTO TRA I MODELLI.....	110
<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>111</b>
<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI .....</b>	<b>113</b>
<b>APPENDICE</b>	





# Introduzione

L'attività svolta nel lavoro di Tesi è parte di un progetto di ricerca sviluppato all'interno del Dipartimento di Principi ed Impianti di Ingegneria Chimica dell'Università di Padova; tale progetto ha come finalità la realizzazione di un fotobioreattore per la coltivazione di microalghe nell'ottica di una produzione industriale di olio combustibile di tipo vegetale (che poi potrebbe essere convertito in biodiesel per autotrazione). L'analisi dell'effetto dell'intensità di luce sulla crescita di microalghe è uno studio essenziale nella progettazione di un fotobioreattore; infatti, la luce è una tra le più influenti variabili operative, poiché essa rappresenta proprio l'energia utilizzata per la fotosintesi e quindi per la crescita di microalghe autotrofe.

I processi industriali per la coltivazione di microalghe destinate alla produzione di oli combustibili si trovano ancora in una fase embrionale. Analogamente, non sembrano essere disponibili modelli predittivi che possano essere usati per simulare e ottimizzare il processo di produzione su piccola o grande scala. Lo sviluppo di modelli dinamici rappresentativi della crescita delle colture è un'attività relativamente recente, basti pensare che i primi modelli sono stati presentati solo alla fine degli anni ottanta. Data l'importanza della luce come variabile operativa, i modelli devono essere in grado di rappresentare come essa influisce nella crescita delle microalghe.

L'obiettivo della Tesi si sviluppa perciò in due attività correlate: effettuare un'analisi sperimentale per valutare come varia la crescita di una coltura in funzione dell'intensità di luce (se luce continua) e della durata dell'impulso (se luce pulsata); successivamente studiare i più completi e recenti modelli dinamici rappresentativi della crescita delle microalghe e stimarne alcuni parametri dipendenti dall'intensità di luce; tale attività si basa sui dati ottenuti dall'analisi sperimentale. Il raggiungimento dell'obiettivo comporta la caratterizzazione attraverso un modello a principi primi della crescita delle microalghe in funzione dell'intensità di luce nel fotobioreattore del laboratorio.

La Tesi è strutturata come descritto nel seguito.

Nel primo Capitolo si introduce la produzione di olio da microalghe, si descrivono i microrganismi oggetto del lavoro e l'effetto della luce sul loro metabolismo; inoltre, si illustra brevemente il processo generale di produzione di biodiesel.

Nel secondo Capitolo si descrive l'attività di analisi sperimentale effettuata sulla specie *Nannochloropsis salina*; in particolare vengono definiti gli strumenti e le procedure utilizzate per misurare le caratteristiche delle microalghe, le apparecchiature utilizzate

per le prove sperimentali e come sono stati condotti gli esperimenti. Al termine vengono presentati i risultati e la relativa discussione.

Nel terzo Capitolo si delineano i tre modelli studiati ed implementati nel simulatore di processo gPROMS<sup>®</sup> per la rappresentazione della cinetica di crescita; per ognuno di essi vengono analizzate le equazioni costitutive discutendo criticamente, alla fine, quali siano le principali differenze in termini di fenomeni riprodotti.

Nel quarto Capitolo si analizzano i parametri costitutivi dei modelli e si effettua la stima di quelli che influiscono maggiormente nella relazione tra luce e crescita; vengono poi riportati i risultati ottenuti dalla simulazione basata sui parametri stimati e si effettua una discussione sulla capacità dei modelli di rappresentare i dati sperimentali.

Un'analisi conclusiva sui risultati ottenuti e sulle prospettive future conclude il lavoro.

# Capitolo 1

## Produzione di biodiesel da microalghe

Nel Capitolo si discute la produzione mondiale odierna di biocarburanti con un approfondimento dell'utilizzo di microalghe come materia prima; in seguito ad una definizione di queste, e ad una descrizione relativamente alla crescita e al ruolo della luce, si delineano le tipologie di sistemi di coltivazione su larga scala e i modelli dinamici rappresentativi della crescita microalgale; infine viene definito l'obiettivo della Tesi.

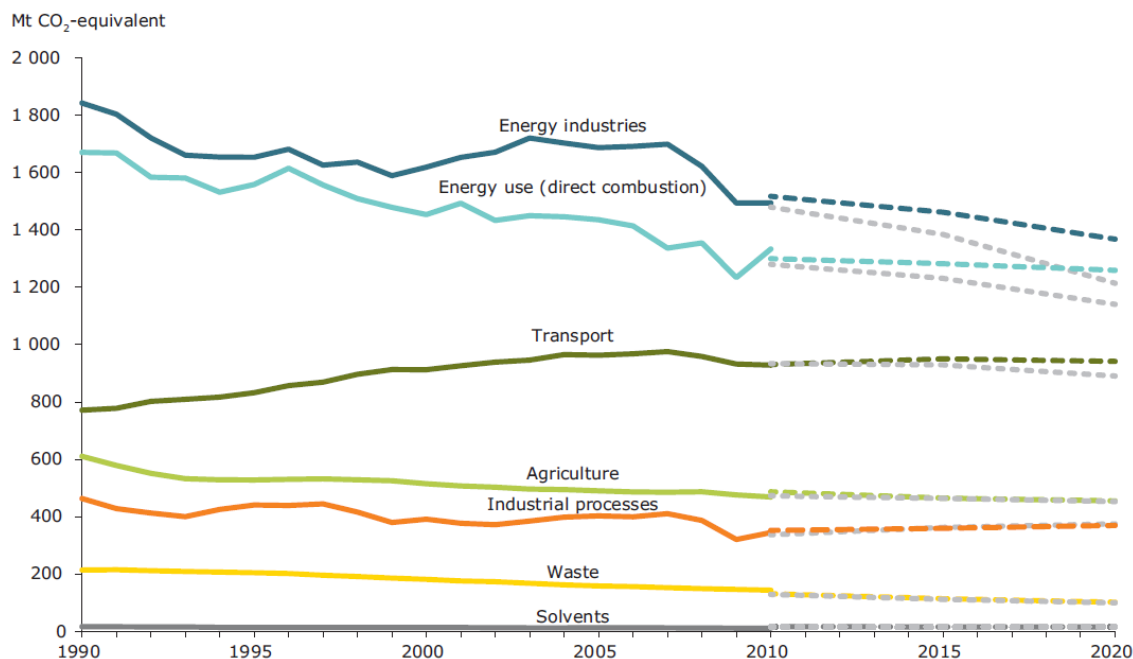
### 1.1 Il Biodiesel

#### 1.1.1 Emissioni di gas serra e successivo sviluppo di biocarburanti

Una fra le maggiori cause dei problemi ambientali odierni che interessano l'intero pianeta è la produzione dei gas serra (solitamente abbreviati in GHG). Secondo la definizione presente nel glossario dell'IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*) (<http://www.ipcc.ch/>) i gas serra sono definiti come “gas presenti in atmosfera, di origine naturale o antropica, trasparenti alla radiazione solare in entrata sulla Terra ma capaci di trattenere, in maniera consistente, la radiazione infrarossa emessa dalla superficie terrestre, dall'atmosfera e dalle nuvole”; questo processo è la causa principale del riscaldamento globale. I principali gas serra nell'atmosfera terrestre sono il vapore acqueo, l'anidride carbonica, il metano e il biossido di azoto. Oltre a questi gas di origine sia naturale sia antropica, esiste un'ampia gamma di gas di origine esclusivamente antropica, come gli alocarburi (tra i quali i più conosciuti sono i clorofluorocarburi), e molte altre molecole contenenti cloro e fluoro le cui emissioni sono regolamentate dal Protocollo di Montreal. Dai dati dell'ESRL (*Earth System Research Laboratory*) (<http://www.esrl.noaa.gov/>), è evidente che dall'inizio della rivoluzione industriale l'utilizzo di combustibili fossili ha contribuito all'aumento della concentrazione dell'anidride carbonica in atmosfera da 280 ppm a 390 ppm; la maggior parte delle emissioni di anidride carbonica provengono dalla combustione di carbone, petrolio e gas naturale.

Secondo i dati dell'EEA (*European Environment Agency*) (<http://www.eea.europa>).

eu/publications/eea\_report\_2009\_9) le fonti antropogeniche maggiormente responsabili dell'emissione dei gas serra nell'Unione Europea sono i settori della fornitura/utilizzo di energia, dei trasporti e l'agricoltura; nella Figura 1.1 vengono rappresentate le emissioni in termini di CO<sub>2</sub> equivalente.



**Figura 1.1.** Andamento e proiezione delle emissioni dei gas serra in termini di CO<sub>2</sub> equivalente per diversi settori; dati forniti dall'European Environment Agency ([http://www.eea.europa.eu/publications/eea\\_report\\_2009\\_9](http://www.eea.europa.eu/publications/eea_report_2009_9)).

Il problema delle emissioni di GHG aumenta notevolmente se si considera la crescita di nuovi paesi emergenti come India e Cina, con conseguente aumento del consumo di fonti fossili per la produzione di energia.

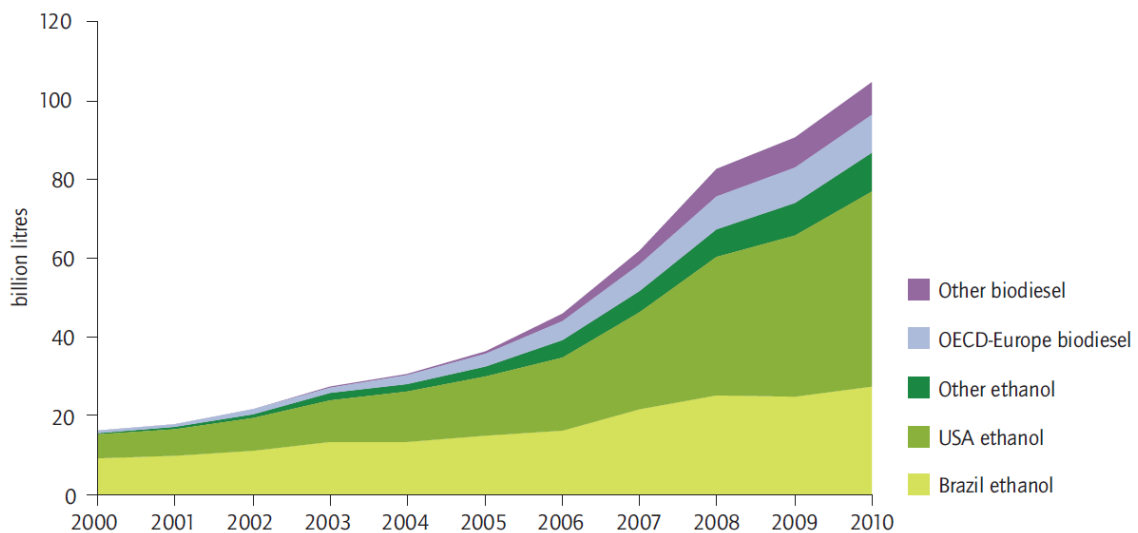
I gas serra non causano solamente il riscaldamento globale, ma hanno anche un forte impatto sull'ambiente e sulla vita umana; secondo il lavoro di Ormerod *et al.* (2002), gli oceani assorbono circa un terzo dell'anidride carbonica emessa ogni anno dalle attività umane e, all'aumentare della sua quantità in atmosfera, anche la quantità sciolta aumenta, rendendo il pH dell'acqua sempre più acido. Questa diminuzione del pH potrebbe causare un rapido danneggiamento delle barriere coralline e una perdita di biodiversità nell'ecosistema marino, con gravi implicazioni per la vita negli oceani e di conseguenza sulla terra.

Il riscaldamento globale è un processo che influisce negativamente su diversi aspetti della vita umana e dell'ambiente. Per contrastarlo, è necessario agire su più fronti; una delle possibili soluzioni consiste nell'individuazione di fonti di energia pulita e rinnovabili. Tale via permetterebbe anche di diminuire il problema della riduzione delle

riserve del petrolio e le crescenti difficoltà nella sua estrazione e trasformazione. Trovare fonti di energia pulita e rinnovabile è una delle maggiori sfide per il genere umano; ciò può avere ripercussioni nel medio-lungo termine sullo sviluppo economico, sulla stabilità globale, sulla prosperità e qualità della vita umana. Dai lavori di Dewful *et al.* (2006) e Gilbert e Perl (2008), è evidente che finora sono state studiate e implementate nella pratica diverse opzioni con più o meno successo; esempi sono l'energia solare (sia termica sia fotovoltaica), l'energia idroelettrica, l'energia geotermica, l'energia eolica e i biocarburanti; l'alternativa più promettente per sostituire i combustibili fossili nell'autotrazione è l'utilizzo di biocarburanti.

La produzione di biocarburanti potrebbe offrire nuove opportunità di diversificazione del reddito, promuovere l'occupazione nelle aree rurali, sviluppare a lungo termine una completa sostituzione dei combustibili fossili e ridurre le emissioni dei gas serra. I biocarburanti più comuni sono il biodiesel e il bioetanolo; essi possono sostituire rispettivamente diesel e benzina nei veicoli con modifiche motoristiche piccole o nulle. Tali carburanti vengono prodotti principalmente da biomassa o da fonti di energia rinnovabile e, confrontandoli con i combustibili fossili, producono emissioni inferiori a parità di potenza generata. Per queste ragioni tali carburanti sono considerati come una valida alternativa, almeno finché altre opzioni più difficili da realizzare, come ad esempio l'idrogeno, non saranno disponibili.

Benché i biocarburanti siano in generale più costosi dei combustibili fossili, nella Figura 1.2 è evidente come la loro produzione continui ad aumentare in tutti i paesi del mondo, anche per effetto degli incentivi statali.



**Figura 1.2.** Produzione globale di biocarburanti. Risultati presentati in IEA 2010 ([http://www.iea.org/papers/2011/biofuels\\_roadmap.pdf](http://www.iea.org/papers/2011/biofuels_roadmap.pdf)).

La produzione dei biocarburanti presenta però delle limitazioni; ad esempio, nella produzione del biodiesel, il mercato potenziale richiede una quantità di materia prima largamente superiore a quella disponibile. Infatti, secondo la RFA (*Renewable Fuel Agency*, 2008), le piantagioni intensive e l'aumento delle terre coltivate potrebbe portare ad una competizione per i terreni destinati ad uso agricolo e ad una perdita di biodiversità dovuta all'aumento della deforestazione e allo sfruttamento di aree di importanza ecologica. Un altro aspetto da considerare è la competizione che si potrebbe creare nell'approvvigionamento della materia prima, considerandola parte comune in diversi processi di trasformazione.

La concorrenza per l'olio vegetale rappresenta una delle cause principali del costo elevato del biodiesel. Una delle soluzioni per ridurre tale costo consiste perciò nel limitarne l'utilizzo e sfruttare maggiormente materie prime di basso costo come, ad esempio, olio non edibile, olio per friggere esausto, lubrificanti e grassi. Il problema è che la quantità disponibile di tali materiali risulta comunque insufficiente per soddisfare la domanda di biodiesel.

La necessità di risolvere tali ostacoli ha portato alla nascita di una seconda generazione di biocarburanti; l'obiettivo è di utilizzare materie prime caratterizzate da una maggiore resa per ettaro in modo da ridurre le terre coltivate e garantire lo stesso livello di performance dei combustibili esistenti. La produzione di carburanti di seconda generazione sfrutta, ad esempio, la conversione di materiale lignocellulosico in etanolo (attraverso processi di idrolisi e fermentazione) o in diesel (attraverso gassificazione o pirolisi), oppure e la coltivazione delle microalghe per la produzione di olio vegetale. Lo sfruttamento di tale materia prima è di grande interesse, ma si trova ancora in una fase embrionale; lo sviluppo ed il perfezionamento dei processi tecnologici necessita di investimenti consistenti in ricerca e sviluppo e l'adozione di politiche e strategie corrette per regolare e supportare tutte le fasi della produzione, dalla coltivazione delle materie prime alla distribuzione e al consumo finale.

Tra le diverse possibilità di materie prime testate su impianti pilota o impianti industriali, una delle più interessanti risulta essere proprio quella delle microalghe, considerando anche il fatto che la loro coltivazione non è direttamente collegata al consumo umano e che la loro produzione richiede poco spazio.

### ***1.1.2 Biodiesel da microalghe***

Secondo il lavoro di Chisti (2007) le microalghe sono caratterizzate da una resa fotosintetica superiore rispetto a quella delle piante terrestri e ciò comporta un elevato potenziale di produzione di biomassa (si stimano diverse decine di tonnellate per ettaro ogni anno); inoltre, dopo la deprivazione di azoto o l'imposizione di altre condizioni

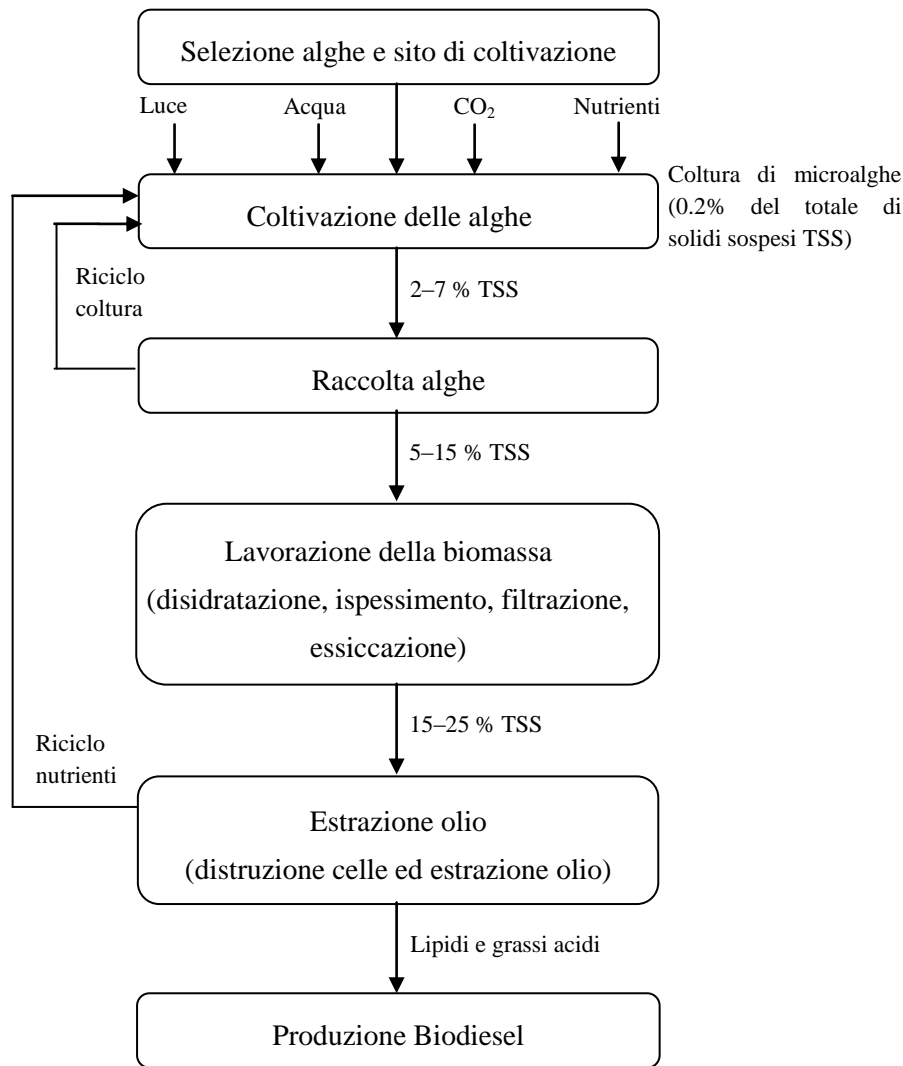
stressanti, questa biomassa può raggiungere un contenuto di lipidi molto elevato, con valori che possono superare il 60% in peso secco (Metting, 1996).

Dagli studi di Benemann (1997) emerge che un ulteriore aspetto vantaggioso nella coltivazione di microalghe consiste nella loro capacità di fissare anidride carbonica in modo controllato; in tal modo esse possono contribuire a mitigare l'anidride carbonica prodotta come sostanza di scarto in attività industriali. Con la stessa logica, le microalghe possono essere usate per consumare fosforo e azoto inorganici contenuti in scarichi urbani o industriali limitando in tal modo dispendiosi trattamenti di bonifica (Li *et al.*, 2008).

I vantaggi appena elencati permettono di collocare le microalghe in una buona posizione per quanto riguarda la produzione di energia rinnovabile su grande scala. In contrasto con tali aspetti positivi, si ha che finora le microalghe sono state usate solo per applicazioni biotecnologiche; ad oggi, i settori principali in cui vengono utilizzate le microalghe sono processi di produzione di vitamine, proteine, cosmetici e cibo (Spolaore *et al.*, 2006a).

Le microalghe crescono in una vasta gamma di sistemi di coltivazione definiti MCP (*Microalgae Culture Processes*), dai semplici fotobioreattori aperti (*open ponds*) ai fotobioreattori chiusi caratterizzati da un'elevata e sofisticata tecnologia. Per ora la microalghe vengono ancora coltivate in piccola scala: ciò è dimostrato dai dati ottenuti da Fyfe (2011) secondo cui la produzione di biomassa da microalghe è circa 10000 tonnellate annuali in peso secco, rispetto ai 105 milioni di metri cubi di biocarburante (biodiesel e bioetanolo) prodotti del mondo nel 2010.

Benché le microalghe possano sembrare abbastanza simili alle altre materie prime utilizzate per produrre il biodiesel, essi sono microrganismi che vivono essenzialmente in ambienti liquidi e necessitano di tecnologie specifiche di coltivazione e raccolta; inoltre richiedono particolari tecniche di processo che dovrebbero essere ottimizzate per produrre biodiesel in modo efficiente. Tutti i processi esistenti per la coltivazione di microalghe includono un'unità di produzione in cui crescono le alghe, uno stadio di separazione delle cellule dalla soluzione liquida, un'unità di estrazione dei lipidi e, infine, la produzione di biodiesel utilizzando i lipidi estratti; il processo appena descritto è rappresentato nel diagramma di flusso di Figura 1.3.



**Figura 1.3.** Diagramma di flusso rappresentativo del processo di produzione di biodiesel utilizzando microalghe come materia prima.

Il biodiesel è una miscela di esteri alchilici di acidi grassi ottenuta da una reazione di transesterificazione (Bozbas, 2008); tale reazione avviene tra piccole molecole di alcoli (di solito metanolo) e oli vegetali e grassi animali, in presenza di un catalizzatore (di solito NaOH). Le materie prime grasse sono composte per il 90-98% in peso di trigliceridi con piccole quantità di mono e digliceridi, mentre il resto è costituito da acidi grassi liberi (1-5%) e quantità residue di fosfolipidi, fosfatidi e altre sostanze; la reazione viene presentata in Figura 1.4.



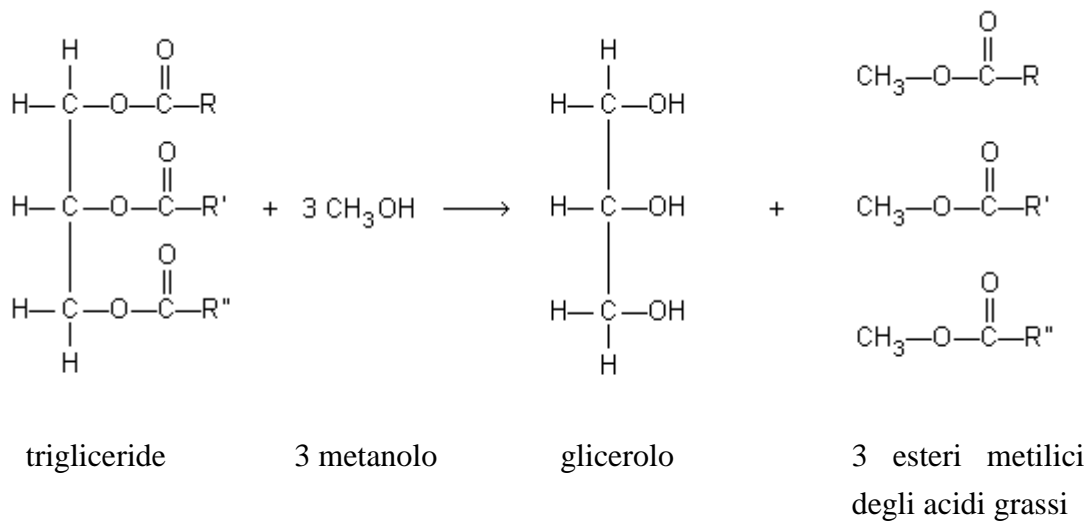


Figura 1.4. Reazione di transesterificazione di trigliceridi.

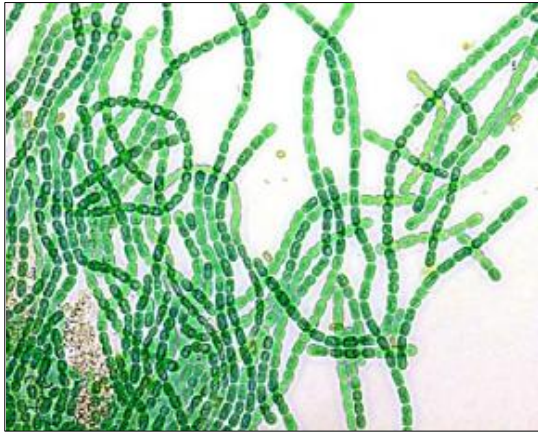
## 1.2 Descrizione generale delle microalghe

### 1.2.1 Microalghe

Le microalghe sono microorganismi fotosintetici procarioti o eucarioti, che presentano un'ampia distribuzione ambientale ed elevata adattabilità. Inoltre, sono capaci di crescere rapidamente grazie alla loro struttura unicellulare o multicellulare semplice; essi possono vivere singolarmente o in colonie e, in funzione della specie a cui appartengono, le loro dimensioni possono variare da pochi a 100 micrometri. Esempi di microorganismi procarioti sono i cianobatteri (*Cyanophyceae*), mentre microalghe eucarioti sono per esempio le alghe verdi (*Chlorophyta*) e le diatomee (*Bacillariophyta*); immagini rappresentative dei microrganismi appena definiti sono riportate nella Figura 1.5.

Una descrizione più dettagliata dei microrganismi è stata effettuata da Richmond (2004): si stima che esistano più di 50000 specie ma solo 30000 siano state studiate ed analizzate.

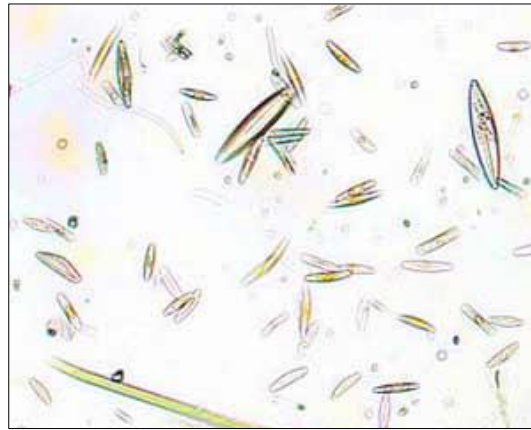
Le microalghe sono presenti in tutti gli ecosistemi esistenti ma gli ambienti di elezione sono i corpi d'acqua, sia dolce sia di mare, dove costituiscono il fitoplancton. Con fitoplancton si intende l'insieme degli organismi autotrofi fotosintetizzanti presenti nel plancton, ovvero quegli organismi in grado di sintetizzare sostanza organica a partire dalle sostanze inorganiche disciolte utilizzando la radiazione solare come fonte di energia; esso si trova alla base della catena alimentare nella maggioranza degli ecosistemi acquatici.



(a)



(b)



(c)

**Figura 1.5.** Esempi di microalghe: (a) cianobatteri (*Cyanophyceae*) (<http://www.iris-sostenibilita.net/iris/homepage/images/cyanobacteria.jpg>), (b) alghe verdi (*Chlorophyta*) (<http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/Chlorophyta/Leptosira/index.html>) e (c) diatomee (*Bacillariophyta*) ([http://www.lifetovel.it/natura/scheda.asp\\_tipo=2&id=12&ambiente=3.html](http://www.lifetovel.it/natura/scheda.asp_tipo=2&id=12&ambiente=3.html)).

### 1.2.2 Crescita delle microalghe

La crescita delle microalghe in un reattore batch in cui i nutrienti sono presenti in quantità sufficienti e le condizioni climatiche sono adeguate presenta un andamento caratteristico; esso è rappresentato nella Figura 1.6.

La curva caratteristica della crescita delle microalghe evidenzia quattro fasi:

1. **Fase di latenza** (*lag*): fase di adattamento delle microalghe al mezzo di coltura (sintesi di proteine, ATP, enzimi); la velocità di crescita è zero.
2. **Fase esponenziale**: fase in cui i microrganismi crescono alla velocità massima; il numero di microalghe raddoppia ad intervalli regolari di tempo. La velocità di

crescita è costante e dipende dalla disponibilità di nutrienti, dalla temperatura e dalla luce.

3. Fase stazionaria: fase in cui la scarsità di nutrienti e l'accumulo di metaboliti tossici rallentano la crescita fino ad azzerarla; la velocità di crescita è nulla ed il numero di organismi costante.
4. Fase di declino: fase in cui il numero di cellule vitali decresce essendo sospesa sia la fase di divisione sia quella metabolica. Essa, in genere, avviene in seguito ad un'eccessiva concentrazione algale, all'esaurimento di nutrienti nel mezzo di coltura e all'instaurarsi di condizioni avverse alla crescita (temperature non idonee, presenza di sostanze tossiche, illuminazione inadeguata).



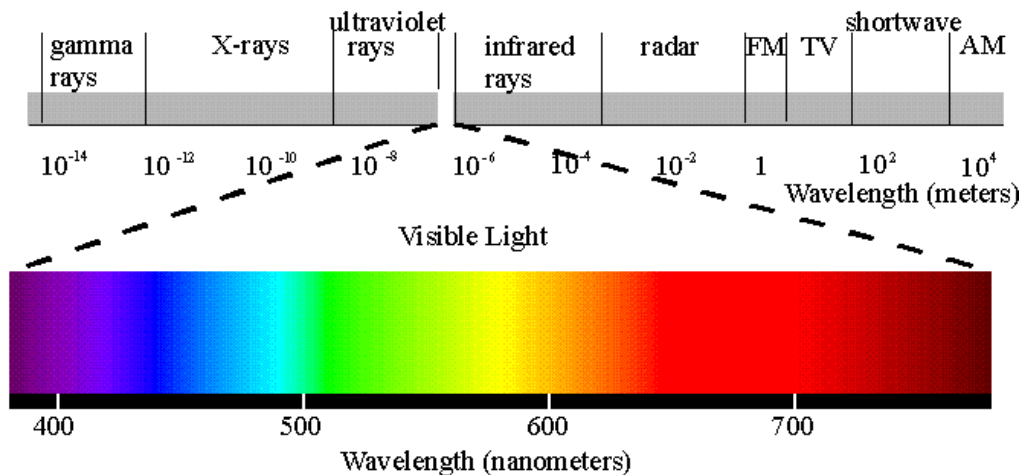
**Figura 1.6.** Rappresentazione schematica della curva di crescita delle microalghe in un reattore batch.

La crescita delle microalghe dipende da diverse variabili:

- fattori abiotici: luce (intensità e lunghezza d'onda), temperatura, concentrazione dei nutrienti, ossigeno, anidride carbonica, pH, salinità e sostanze tossiche;
- fattori biotici: patogeni (batteri, funghi, virus) e altre alghe in competizione;
- variabili operative: mixing, rapporto tra portata volumetrica e volume del reattore (*dilution rate*), profondità del reattore rispetto alla superficie in cui incide la luce, frequenza di raccolta.

### 1.2.3 La luce come variabile operativa

L'energia utilizzata dalle microalghe per la fotosintesi è la luce; questa, come evidenziato nella Figura 1.7, è una porzione dello spettro elettromagnetico; i diversi tipi di radiazione differiscono per la lunghezza d'onda e di conseguenza per la quantità di energia associata ad ogni singolo fotone.

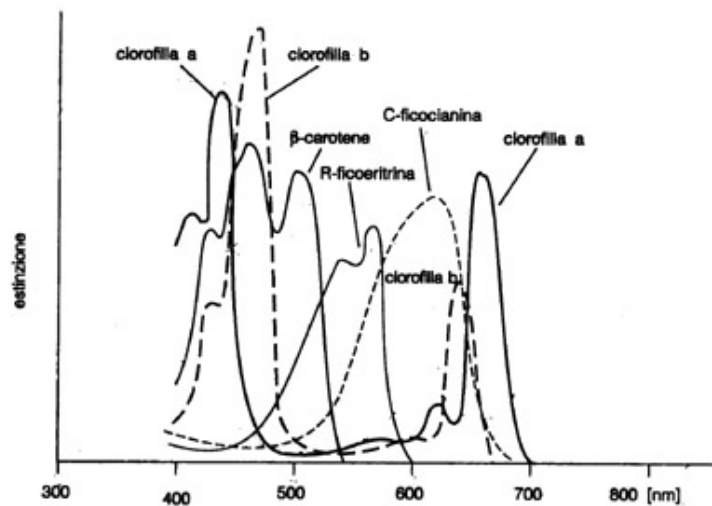


**Figura 1.7.** Spettro elettromagnetico in cui viene evidenziata la porzione corrispondente alla luce visibile ([http://masco62.virtuale.org/1%20metodi\\_optici\\_di\\_analisi%20INTRODUZIONE.htm](http://masco62.virtuale.org/1%20metodi_optici_di_analisi%20INTRODUZIONE.htm)).

L'irradianza o intensità di luce è definita come il flusso di fotoni e viene espressa in [ $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ], dove E (Einstein) corrisponde a una mole di fotoni; per calcoli effettuati su larga scala l'irradianza invece è solitamente definita in termini di [ $\text{W/m}^2$ ]. La fotosintesi utilizza solo i fotoni appartenenti ad un intervallo di lunghezze d'onda detto PAR, corrispondente alle lunghezze d'onda comprese tra 400 nm e 700 nm.

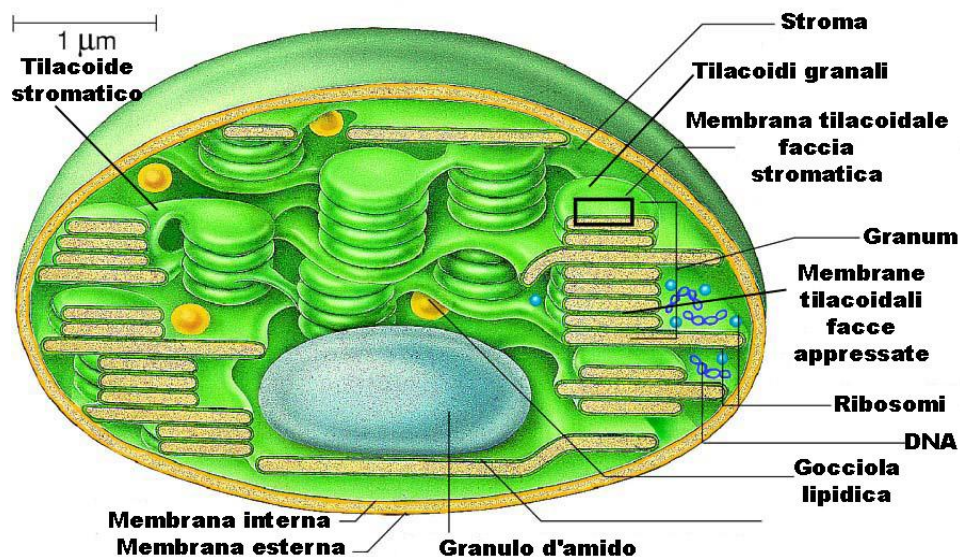
Secondo la definizione di Smith (1997), la fotosintesi è l'insieme delle reazioni anaboliche durante le quali le piante verdi producono sostanze organiche (principalmente carboidrati) a partire dall'anidride carbonica e dall'acqua, in presenza di luce. Questa serie di reazioni chimiche rientra nei processi anabolici (sintesi) dei carboidrati ed è del tutto opposta ai processi inversi di catabolisi (ossidazione).

L'assorbimento dei fotoni avviene tramite i pigmenti fotosintetici che trasferiscono l'energia assorbita nei centri di reazione dove avviene la fotosintesi; i fotoni devono possedere un'energia sufficiente per eccitare un elettrone della molecola di pigmento e in questo modo iniziare la separazione di cariche. Secondo il lavoro di Masojidek *et al.* (2004) i pigmenti presenti maggiormente nelle microalghe sono le clorofille, le ficobiline e i carotenoidi; gli spettri di assorbimento sono riportati in Figura 1.8.



**Figura 1.8.** Spettri di assorbimento dei principali pigmenti contenuti nelle microalghe: clorofille, ficobiline e carotenoidi (<http://www.acquariofili.com/article17.html>).

Il processo fotosintetico si svolge in organuli detti cloroplasti (Figura 1.9); essi si presentano generalmente come dischi piatti del diametro di 2-10 micrometri e spessi circa 1 micrometro.

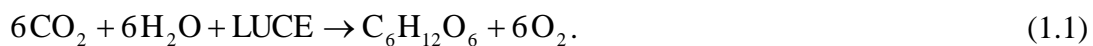


**Figura 1.9.** Sezione di un cloroplasto ([http://www.biologia.unige.it/corsi/Fisiologia\\_vegetale/images/fotosintesi/cloroplasti/cloroplasto.jpg](http://www.biologia.unige.it/corsi/Fisiologia_vegetale/images/fotosintesi/cloroplasti/cloroplasto.jpg))

Il cloroplasto è delimitato da due membrane separate da uno spazio intermembrana: la membrana esterna è permeabile per la maggior parte delle molecole, mentre quella interna è decisamente più selettiva ed è attraversata da proteine di trasporto specifiche.

All'interno del cloroplasto è presente un fluido detto stroma: esso contiene molti enzimi coinvolti nel metabolismo dell'organulo, granuli di amido, il DNA circolare e i ribosomi. In particolare, all'interno dei cloroplasti si trova il sistema di membrane che forma i grani (*granum*), ovvero pile di sacchetti appiattiti (tilacoidi) collegate da lamelle. All'interno di queste membrane sono presenti delle molecole di clorofilla, aggregate a formare i cosiddetti fotosistemi. Si possono distinguere il fotosistema I (PS I) e il fotosistema II (PS II). I fotosistemi sono un insieme di molecole di pigmenti disposti in modo da circondare una molecola di clorofilla speciale detta "a trappola". L'energia del fotone viene quindi passata di molecola in molecola fino al raggiungimento della clorofilla appena definita. Nel fotosistema I la molecola trappola viene eccitata da una lunghezza d'onda di 700 nm, mentre nel fotosistema II da una lunghezza d'onda pari a 680 nm.

L'equazione generale della fotosintesi è la seguente:



Il processo avviene per tappe riunibili in due fasi:

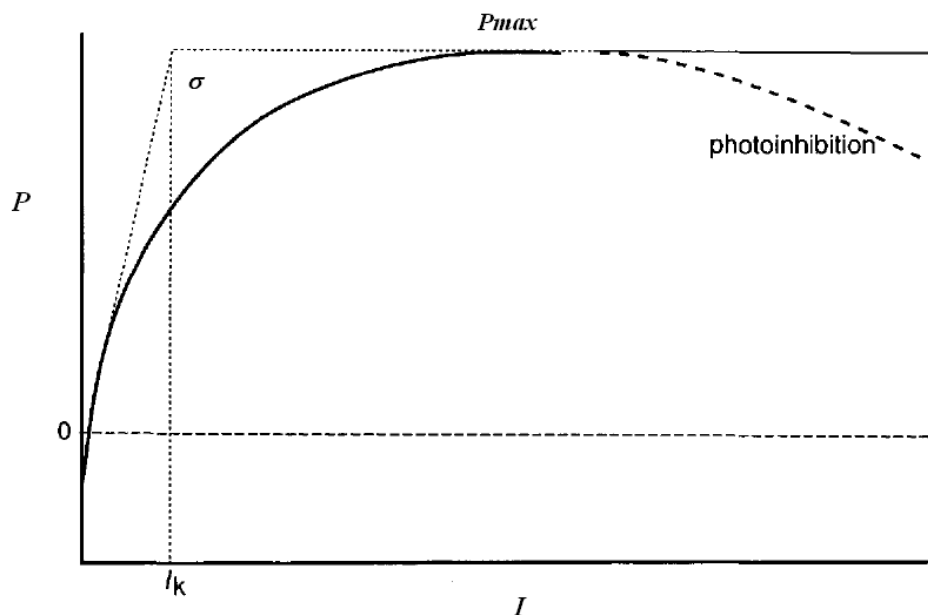
1. FASE LUMINOSA, dipendente dalla luce. Tale fase è dominata dalla clorofilla *a*, le cui molecole assorbono selettivamente luce attraverso una serie di altri pigmenti coadiuvanti. L'energia catturata dalle molecole di clorofilla consente la promozione di elettroni da orbitali atomici a energia minore ad orbitali ad energia maggiore; questi vengono subito sostituiti mediante scissione di molecole d'acqua (che, da  $\text{H}_2\text{O}$ , si scinde in due protoni, due elettroni ed un ossigeno grazie alla fotolisi). Gli elettroni liberati dalla clorofilla del fotosistema II vengono immessi in una catena di trasporto costituita dal citocromo B6f, durante la quale perdono energia, passando ad un livello energetico inferiore; l'energia persa viene utilizzata per pompare protoni dallo stroma all'interno dello spazio del tilacoide, creando un gradiente protonico. Infine gli elettroni giungono al fotosistema I che, a sua volta, ha perso altri elettroni per effetto della luce; gli elettroni persi dal fotosistema I vengono trasferiti alla ferredossina, che riduce  $\text{NADP}^+$  in NADPH. Tramite la proteina di membrana ATP-sintetasi (situata sulla membrana del tilacoide) gli ioni  $\text{H}^+$  liberatisi dall'idrolisi dell'acqua passano dallo spazio del tilacoide allo stroma, cioè verso gradiente, sintetizzando ATP a partire da ADP e gruppi liberi di fosfato.
2. FASE BUIA, indipendente dalla luce. In tale fase avviene la fissazione del carbonio (detto ciclo di Calvin); tale processo comporta l'organizzazione della  $\text{CO}_2$ , ossia la sua incorporazione in composti organici e la riduzione del

composto ottenuto grazie all'ATP ricavato dalla fase luminosa. In questo ciclo è presente un composto organico fisso, il ribulosio-bifosfato, che viene trasformato durante la reazione fino a tornare al suo stato iniziale. Le 12 molecole di ribulosio bifosfato presenti nel ciclo di Calvin reagiscono con l'acqua e l'anidride carbonica subendo una serie di trasformazioni ad opera dell'enzima rubisco; alla fine del processo, oltre alle 12 RuBP nuovamente sintetizzate, si originano 2 molecole di gliceraldeide 3-fosfato, che vengono espulse dal ciclo come prodotto netto della fissazione. L'ATP e il NADPH consumate durante il ciclo di Calvin vengono prelevate da quelle prodotte durante la fase luminosa, e, una volta ossidate, tornano a far parte del pool disponibile per la riduzione.

Le due molecole di gliceraldeide 3-fosfato formatesi durante il ciclo di Calvin vengono utilizzate per sintetizzare glucosio (in un processo inverso alla glicolisi) o per formare lipidi quali acidi grassi oppure amminoacidi (con l'aggiunta di un gruppo amminico nella struttura).

I prodotti finali della fotosintesi, quindi, svolgono un ruolo di fondamentale importanza nei processi dell'anabolismo degli organismi autotrofi.

Per descrivere il comportamento delle alghe in risposta all'intensità di luce  $I$  [ $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ] si introduce la curva  $P/I$ ; essa rappresenta la variazione della velocità di fotosintesi  $P$  [tempo $^{-1}$ ] in funzione dell'irradianza alla quale è sottoposta la coltura. Un esempio dell'andamento di tale curva è visibile nella Figura 1.10, nella quale si possono individuare le tre regioni caratteristiche.



**Figura 1.10.** Variazione di velocità di fotosintesi  $P$  in funzione dell'intensità di luce  $I$  alla quale è sottoposta la coltura (Richmond A., 2004).

1. LUCE LIMITANTE: regione in cui la velocità di fotosintesi aumenta in modo direttamente proporzionale all'aumentare dell'intensità di luce.

In tali condizioni la velocità di assorbimento dei fotoni determina la velocità di trasporto degli elettroni dall'acqua all'anidride carbonica; per questo motivo tale regione è definita "luce limitante".

La pendenza iniziale nella curva  $P/I$  è definita da  $\sigma$  [ $\text{m}^2 \mu\text{E}^{-1}$ ], che è un parametro caratteristico della cultura in determinate condizioni ambientali; tale valore può essere normalizzato sulla massa di clorofilla in modo tale da avere dati rappresentativi della quantità di anidride carbonica fissata per unità di clorofilla su unità di fotoni irradiati. Quando la pendenza iniziale è misurata per una foglia o per una coltura densa in cui viene assorbita tutta la radiazione fotosinteticamente attiva, il valore risultante può essere considerato una misura diretta della resa quantica della fotosintesi. Solitamente nelle colture di fitoplancton naturali e nei reattori sottili in cui vengono coltivate le microalghe viene assorbita solo una frazione della luce incidente perciò la pendenza iniziale non può essere identificata con la resa quantica della fotosintesi ma risulta comunque proporzionale.

2. LUCE SATURANTE: regione in cui la fotosintesi è indipendente dall'intensità di luce.

Il passaggio dalla regione "luce limitante" alla "luce saturante" è caratterizzato da una diminuzione dell'efficienza fotosintetica e di conseguenza la relazione tra intensità di luce e velocità di fotosintesi non è più lineare; in particolare la velocità di fotosintesi raggiunge un valore massimo  $P_{\max}$  [ $\text{tempo}^{-1}$ ] indipendente dall'intensità di luce.

In tali condizioni la velocità di assorbimento dei fotoni supera la velocità di trasporto degli elettroni dall'acqua all'anidride carbonica.

Un parametro che definisce il passaggio tra quest'ultime regioni è l'intensità di saturazione  $I_k$  [ $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ] e viene definita nel seguente modo:

$$I_k = \frac{P_{\max}}{\sigma}. \quad (1.2)$$

Quando l'intensità di luce è superiore a  $I_k$  la velocità di assorbimento dei fotoni è superiore alla velocità di trasporto degli elettroni, mentre quando l'intensità di luce è inferiore a  $I_k$  si verifica la condizione opposta.

3. LUCE INIBENTE: regione in cui la fotosintesi diminuisce all'aumentare dell'intensità di luce.

Tale situazione viene raggiunta quando la coltura risulta stressata.



Un importante aspetto da tenere in considerazione è la correlazione che esiste tra diminuzione di produttività e i processi di fotoacclimatazione e fotoinibizione.

### 1.2.3.1 Fotoacclimatazione

Le microalghe sono continuamente sottoposte a rapidi cambiamenti ambientali qualitativi e quantitativi, di conseguenza devono presentare un'elevata capacità di adattamento. La scala temporale caratteristica dei cambiamenti varia dai secondi ai giorni e di conseguenza sono stati proposti meccanismi di tipo diverso: se la scala del cambiamento risulta di secondi o minuti si crea uno stato transitorio in cui un meccanismo non fotochimico regola la quantità di fotoni destinati al PSII; se il cambiamento è caratterizzato da una scala temporale maggiore e presenta una variazione dell'intensità o della qualità della luce, l'adattamento prevede modifiche strutturali e biochimiche ed il processo viene detto fotoacclimatazione.

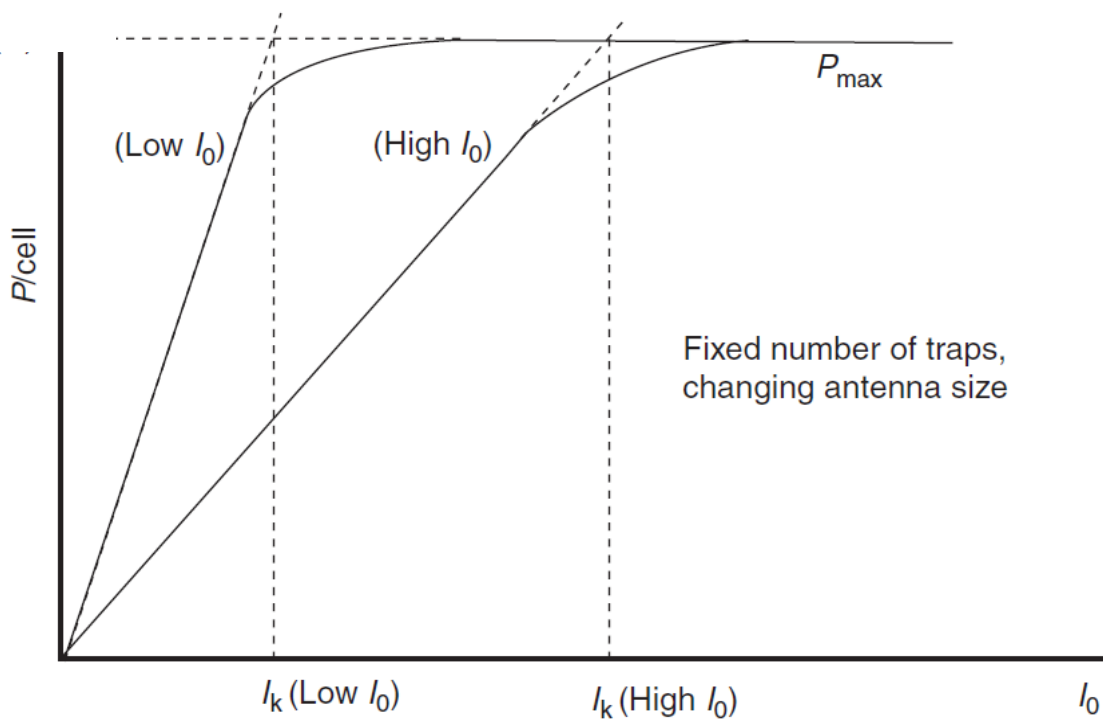
Secondo Dubinsky *et al.* (1995) è evidente che la fotoacclimatazione che si instaura in seguito alla diminuzione di intensità di luce consiste in un aumento della clorofilla *a* e di altri pigmenti; l'aumento dei pigmenti comporta la diminuzione della sezione ottica di assorbimento della luce di ogni pigmento perciò raddoppiare la quantità di clorofilla non corrisponde a raddoppiare l'assorbimento di luce. Per quanto riguarda, invece, le cellule fotoacclimate ad un'elevata intensità di luce, esse presentano un contenuto di carotenoidi superiore rispetto alla clorofilla *a*; essi permettono di proteggere i centri di reazione da un'eccessiva eccitazione. Per esempio è stato scoperto che, in condizioni di stress, alcuni carotenoidi come il  $\beta$ -carotene in *Dunaliella salina* e astaxantina in *Haematococcus pluvialis* creano dei globuli esternamente al cloroplasto che non trasferiscono energia ai centri di reazione come gli altri pigmenti bensì fungono da schermo. Dato che i carotenoidi assorbono energia senza trasferirla ai centri di reazione, si ha che le cellule fotoacclimate ad un'elevata intensità di luce presentano una resa quantica inferiore.

Il tempo necessario alla fotoacclimatazione varia da ore a giorni a seconda della specie. La rapida diminuzione del contenuto di clorofilla, dopo la transizione da bassa irradianza ad alta irradianza, non è dovuta alla distruzione dei pigmenti ma alla loro diluizione durante la divisione cellulare; al contrario, l'adattamento da intensità di luce elevata ad intensità di luce bassa è più lento perché la fotoacclimatazione prevede un aumento della concentrazione dei pigmenti e ciò è in contrasto con quello che normalmente avverrebbe, perché le cellule per crescere si dividono e portano ad una diluizione dei pigmenti.

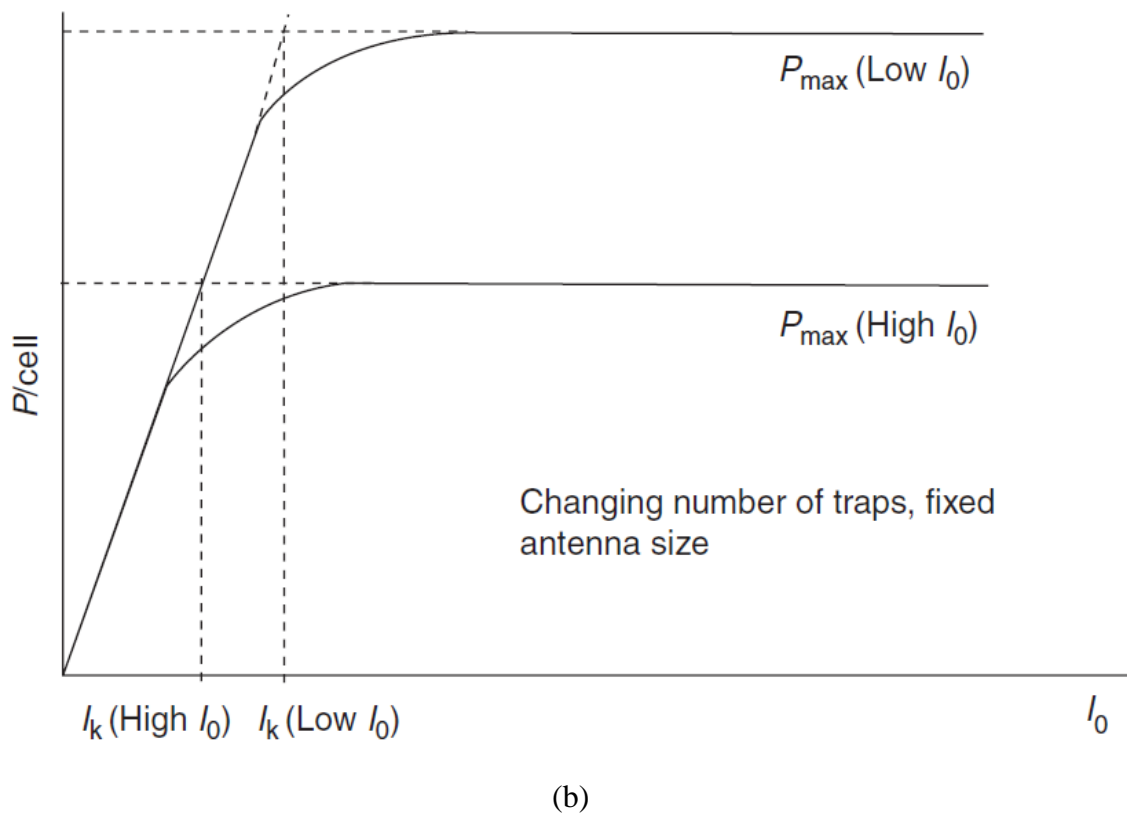
Gli studi di Prezelin e Sweeney (1979), Falkowski e Owens (1980), Perry *et al.* (1981) e Ley e Mauzerall (1982) hanno constatato che il fitoplancton può rispondere alla diminuzione di intensità di luce in due modi, con un aumento o della dimensione o del

numero di unità fotosintetiche (PSU) all'interno della cellula. In particolare, Prezeil e Sweeney (1979), hanno suggerito che le due diverse tecniche di adattamento si possono distinguere osservando la curva  $P/I$  caratteristica della coltura; un'ipotesi simile è stata sviluppata anche per le microalghe (Ramus, 1981):

- Un aumento della dimensione delle unità fotosintetiche compensa la diminuzione di luce permettendo l'affluenza dello stesso numero di fotoni ai centri di reazione. In questo caso, come si può vedere dalla Figura 1.11a, la velocità di fotosintesi massima rimane uguale anche a intensità di luce bassa; la quantità di luce necessaria a saturare la fotosintesi risulta minore e di conseguenza le unità fotosintetiche diventano più efficienti.
- Un aumento del numero delle unità fotosintetiche comporta una maggiore velocità massima di fotosintesi; inoltre la quantità di luce necessaria a saturare la fotosintesi risulta maggiore; il comportamento è rappresentato in Figura 1.10b.



(a)

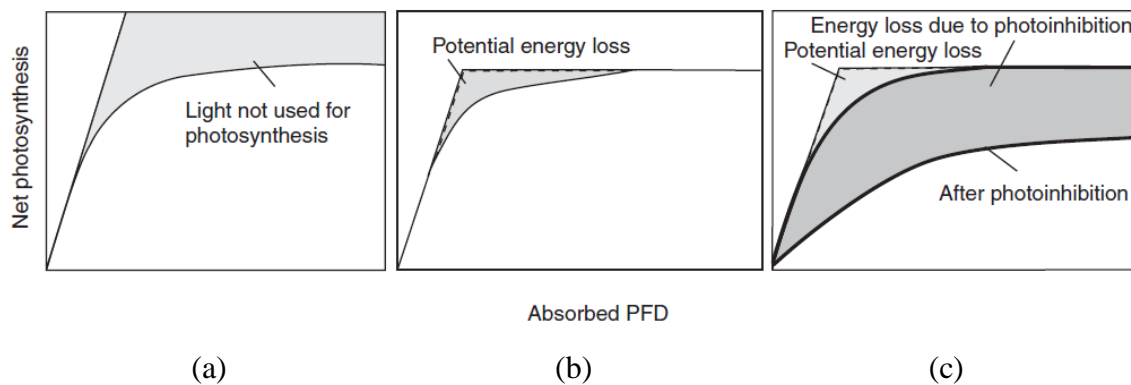


**Figura 1.11.** Curva  $P/I$  rappresentativa della fotoacclimatazione in seguito alla diminuzione dell'intensità di luce; nel caso (a) si ha un aumento della dimensione dei centri fotosintetici mentre, nella (b), si ha un aumento del numero dei centri fotosintetici coltura (Richmond A., 2004).

Entrambi i meccanismi di adattamento sono stati individuati in diverse specie di microalga; per esempio *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyte) e *Nannochloropsis* (Eustigmatophyte) si adattano ad un'intensità di luce inferiore aumentando il numero di PSU (Falkowski e Owens, 1980 e Fisher *et al.* 1998), mentre *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyte) e *Glenodimium* (Dinoflagellate) si adattano ad un'intensità di luce inferiore aumentando la dimensione delle PSU (Meyers e Graham, 1971; Prezelin, 1976; Neale e Melis, 1986).

### 1.2.3.2 Fotoinibizione

Secondo la definizione di Long *et al.* (1994), la fotoinibizione è un processo che prevede il danneggiamento ai PSII; come conseguenza si ha la diminuzione di resa quantica di fotosintesi, la riduzione della convessità della curva  $P/I$  e, nel caso di un'esposizione prolungata a luce eccessiva, la diminuzione della velocità di fotosintesi massima. Nella Figura 1.12 è possibile vedere come la fotoinibizione comporta una modifica alla curva  $P/I$ .



**Figura 1.12.** Modifiche della curva P/I in seguito a fotoinibizione coltura (Richmond A., 2004).

La parte grigia nella Figura 1.12a rappresenta la quantità di luce assorbita che non è utilizzata per la fotosintesi. La linea tratteggiata di Figura 1.12b rappresenta una curva teorica in cui la fotosintesi avviene con la massima resa quantica finché la coltura non è sottoposta ad un'irradianza pari a quella di saturazione. La regione grigia compresa tra la curva tratteggiata e quella continua, rappresenta l'energia assorbita che potrebbe essere utilizzata per la fotosintesi; nella realtà, essa viene persa per le caratteristiche intrinseche ed i processi di regolazione dell'apparato fotosintetico. In Figura 1.12c, si possono individuare due curve (linee continue) che delimitano una regione in grigio scuro; le curve rappresentano la risposta della fotosintesi all'aumentare della luce per una coltura in condizioni normali e una fotoinibita, mentre la regione rappresenta l'energia assorbita dalla coltura che non viene utilizzata per la fotosintesi per il danneggiamento del PSII dovuto alla sovraccitazione. Tale situazione accade quando il sistema è sottoposto ad una luce di intensità eccessiva (dieci volte superiore alla normale intensità di luce che permette la crescita) o ad una combinazione di intensità elevata ed altri stress (per esempio temperatura bassa).

### 1.3 Sistemi per la produzione di microalghe su larga scala

Le microalghe possono essere coltivate in sistemi che si distinguono in due categorie principali: sistemi aperti e sistemi chiusi; in entrambi i casi la materia entra ed esce in modo continuo dal sistema ma i sistemi aperti sono a contatto diretto con l'atmosfera, mentre i sistemi chiusi sono costituiti da apparecchiature che isolano la coltura dall'ambiente esterno. La scelta di come effettuare la coltivazione dipende da diversi fattori: il terreno di coltura, la quantità d'acqua, le sostanze nutritive, la temperatura e il prodotto finale che si vuole ottenere. Esempi di sistema aperto e sistema chiuso sono riportati in Figura 1.13.



**Figura 1.13.** Esempi di sistema di coltivazione: (a) sistema aperto (*raceway ponds*, [http://algae-energy.co.uk/biofuel\\_production/cultivation/](http://algae-energy.co.uk/biofuel_production/cultivation/)) e (b) sistema chiuso (*fotobioreattore tubolare*, <http://chlorelle.wordpress.com/>).

- **SISTEMI APERTI:** la coltivazione di alghe in stagni aperti è stata ampiamente studiata; essi possono essere classificati in acque naturali (laghi, lagune, stagni) o laghetti artificiali. I sistemi più comunemente usati sono grandi vasche poco profonde, stagni circolari (*circular ponds*) e stagni a canaline (*raceway ponds*). Uno dei principali vantaggi dei sistemi aperti è che sono più facili da costruire e gestire rispetto alla maggior parte dei sistemi chiusi con conseguenti costi di produzione e operativi bassi; tuttavia, fra gli svantaggi c'è il difficoltoso utilizzo della luce da parte delle cellule, perdite per evaporazione e l'esigenza di grandi superfici di terreno. Un altro importante svantaggio è che la produzione di microalghe in sistemi aperti è limitata a organismi che possono crescere in condizioni non controllate, data la presenza di predatori ed altri eterotrofi; inoltre, a causa dei sistemi di agitazione inefficienti, la velocità di trasferimento di massa è lenta e ciò risulta in una bassa produttività di biomassa. Negli stagni a canaletta le microalghe, l'acqua e le sostanze nutritive circolano intorno ad una pista e, attraverso un meccanismo di pale, i microrganismi sono tenute in sospensione; solitamente gli stagni sono bassi in modo che la luce possa penetrare nell'acqua ed essere efficientemente assorbita dalle microalghe. Gli stagni funzionano in continuo; le sostanze nutrienti e l'anidride carbonica vengono costantemente alimentati da un'estremità, mentre dall'altra viene prelevata la soluzione contenente le microalghe da sottoporre a trattamento. Il più grande vantaggio degli stagni aperti è la loro semplicità.
- **SISTEMI CHIUSI:** tali sistemi sono solitamente definiti fotobioreattori e sono costituiti da geometrie di vario tipo: a pannelli orizzontali (*flat plate*), verticali oppure tubolari; essi presentano un grado di complessità decisamente maggiore

rispetto ai sistemi aperti, ma consentono uno stretto controllo dei parametri chimico-fisici e biologici della coltura e una migliore resa produttiva.

Le maggiori criticità sono da imputare alle escursioni termiche che richiedono sistemi di raffreddamento (ombreggiamento, spruzzi con acqua nebulizzata ecc.) e al rischio di accumulo dell'ossigeno prodotto per fotosintesi. Questi problemi limitano le dimensioni dei fotobioreattori, che attualmente sono costituiti principalmente da serpentine di lunghezza non elevata e volumi limitati. Gli elevati costi di mantenimento di questi tipi di coltura ne limitano l'uso alle sole colture massive di elevata purezza, necessarie o per l'estrazione di biomolecole di alto valore commerciale o per inoculi di colture in sistemi aperti.

Una comparazione fra sistemi chiusi ed aperti viene rappresentata nella Tabella 1.1; il confronto non è semplice perché la valutazione dipende da diversi fattori; dal lavoro di Richmond (2004) si evince che i parametri comunemente usati per valutare la produttività in una singola unità sono tre:

1. produttività volumetrica: produttività per unità di volume del reattore;
2. produttività superficiale: produttività per unità di superficie di terreno occupata dal reattore;
3. produttività per superficie illuminata: produttività per unità di superficie illuminata del reattore.

Nel confronto si ha che benché i sistemi chiusi non offrano vantaggi in termini di produttività superficiale, essi presentano una produttività volumetrica e una concentrazione cellulare maggiori rispetto ai sistemi aperti (rispettivamente otto volte e sedici volte superiore).

**Tabella 1.1.** *Confronto tra open pond e fotobioreattori (Pulz, 2001).*

	<b>Sistemi chiusi (PBRs)</b>	<b>Sistemi aperti (ponds)</b>
Controllo della contaminazione	Facile	Difficile
Rischio di contaminazione	Ridotto	Alto
Sterilità	Realizzabile	Nessuna
Controllo di processo	Facile	Difficile
Controllo delle specie	Facile	Difficile
Mescolamento	Uniforme	Molto basso
Modalità di funzionamento	Batch o semi-continuo	Batch o semi-continuo
Spazio richiesto	Dipende dalla produttività	PBRs ~ ponds
Rapporto area/volume	Alto (20-200 m <sup>-1</sup> )	Bassa (5-10 m <sup>-1</sup> )
Concentrazione di cellule	Alta	Bassa
Investimento	Alto	Basso
Costi operativi	Alti	Bassi
Costi capitali	3-10 volte superiore rispetto ai ponds	PBRs > ponds
Efficienza di utilizzo della luce	Alta	Basso
Controllo temperatura	Temperatura più uniforme rispetto ai sistemi aperti	Difficile
Produttività	3-5 volte superiore rispetto ai ponds	Bassa
Perdite d'acqua	Dipende dal sistema di raffreddamento	PBRs ~ ponds
Stress idrodinamico subito dalle microalghe	Basso-alto	Molto basso
Evaporazione del medium di crescita	Bassa	Alta
Controllo trasferimento gas	Alto	Basso
Perdite anidride carbonica	Dipendono dal pH, dall'alcalinità, etc.	PBRs ~ ponds
Inibizione da ossigeno	Problemi maggiori nei PBRs rispetto ai ponds	PBRs > ponds
Concentrazione di biomassa	3-5 volte superiore rispetto ai ponds	PBRs > ponds
Scale-up	Difficile	Difficile

## 1.4 Modelli dinamici rappresentativi dei sistemi microalgali

Nei precedenti paragrafi sono stati elencati numerosi vantaggi nell'uso delle microalghe come materia prima nella produzione di biocarburanti; per questo l'interesse verso di esse è in continuo aumento e, nel tempo, sono stati proposti diversi tentativi per modellare la produttività, l'economia, gli impatti ambientali lungo l'intero ciclo di vita e la crescita delle microalghe in impianti industriali.

I modelli vengono creati con l'obiettivo di rappresentare matematicamente il comportamento fisico del sistema, permettendo di accelerare le fasi di sviluppo e progettazione di un nuovo processo e di ottimizzare l'esercizio degli impianti. Le funzioni più importanti sono le seguenti:

- simulazione di processo, in cui si valuta il comportamento delle variabili in un sistema modificando parametri, condizioni iniziali o parti del processo stesso; la simulazione di processo è inoltre funzionale allo *scale-up* dell'impianto industriale, attività di importanza critica nello sviluppo di nuovi processi;
- ottimizzazione, in cui si definiscono in modo ottimale layout dell'impianto e condizioni operative per l'ottenimento di un obiettivo (economico o produttivo) predefinito;
- definizione del sistema di controllo: sono scelti i parametri fisici/chimici che devono essere regolati per un adeguato funzionamento dell'impianto e le strategie per il controllo degli stessi.

Nel corso degli anni sono stati sviluppati modelli dinamici rappresentativi dei sistemi microalgali in tre settori distinti: oceanografia, ecologia e biotecnologia. Il primo modello rappresentativo della dinamica del fitoplancton è stato proposto da Riley (1946); in esso si considera sia l'effetto della luce sia la deprivazione di nutrienti. Successivamente sono stati presentati numerosi modelli cinetici che tengono in considerazione la relazione tra l'effetto della luce e la fotosintesi, partendo da semplici espressioni fino a formulazioni più complesse che coinvolgono anche la fotoinibizione. Parallelamente allo sviluppo di modelli rappresentativi della dipendenza della coltura della luce, è stato introdotto da Droop (1968) un modello per la crescita e l'assorbimento di nutrienti, successivamente riformulato da Burmaster (1979). In seguito sono stati sviluppati modelli che considerano contemporaneamente sia la limitazione di luce sia la limitazione di nutrienti; tali modelli risultano però molto più complessi dei precedenti considerando che in tal caso si presenta l'interazione non lineare tra fotosintesi e nutrienti.

Il primo modello dinamico rappresentativo delle colture microalgali è stato proposto da Sukenik *et al.* (1987) per un fotobioreattore aperto (*raceway pond*); la limitazione dalla luce è stata introdotta successivamente nel lavoro di Huismass e Weissing (1994)



definendo i concetti fondamentali per comprendere il comportamento dinamico di sistemi fotolimitati. Per un approfondimento riguardo i modelli che assumono la luce come fattore limitante alla crescita delle microalghe, si fa riferimento a Turazza (2010); in tale studio sono stati raccolti i principali modelli cinetici e le relative caratteristiche, distinguendoli tra modelli capaci di rappresentare o meno l'accumulo di lipidi in seguito alla deprivazione di azoto (non si considera la produzione di lipidi per stress radiativo). In letteratura esistono numerosi modelli riguardanti fotobioreattori in stato stazionario, ma scarseggiano modelli in grado di prevedere evoluzioni transitorie della biomassa, con relative caratteristiche fotosintetiche ed ottiche. Inoltre, per evitare qualsiasi riduzione di crescita, la maggior parte di questi si basano su colture fotoinibite all'equilibrio, dove i nutrienti sono in eccesso; tali modelli sono perciò incapaci di descrivere le condizioni di limitazione da substrato che sono direttamente correlate alla riduzione della crescita e all'accumulo dei lipidi. Esempi di modelli che superano tali limiti sono i modelli B e C descritti nel Capitolo 3; essi, infatti, tengono in considerazione la maggior parte dei fattori dai quali dipende la crescita delle microalghe (luce e nutrienti) e riescono a rappresentare l'andamento della coltura anche in condizioni transitorie. Gli articoli da cui sono stati ricavati contengono, inoltre, riferimenti per la modellazione dell'accumulo di lipidi.

## 1.5 Obiettivo tesi

L'obiettivo di questa Tesi è direttamente correlato ad un progetto di ricerca avente come finalità la progettazione di un fotobioreattore per la produzione massiva di microalghe nell'ottica di una produzione industriale di biodiesel.

L'obiettivo si sviluppa in due aspetti:

- Comprendere e partecipare all'attività di ricerca in laboratorio della specie *Nannochloropsis Salina*; in particolare studiare come varia la crescita delle microalghe in funzione dell'intensità di luce e della frequenza di pulsazioni a cui è sottoposta la coltura.
- Studiare modelli dinamici rappresentativi della crescita delle microalghe e stimarne alcuni parametri dipendenti dall'intensità di luce attraverso un confronto tra i dati sperimentali ottenuti in laboratorio e l'attività descritta nel punto precedente.

Il raggiungimento dell'obiettivo comporta la caratterizzazione della crescita delle microalghe in funzione dell'intensità di luce nel fotobioreattore del laboratorio, permettendo lo *scale-up* nella progettazione del fotobioreattore pilota.



# Capitolo 2

## Analisi sperimentale

Nel seguente capitolo si presenta l'analisi sperimentale effettuata su *Nannochloropsis salina*. Inizialmente si descrivono la specie algale e gli strumenti utilizzati per misurare le diverse caratteristiche delle microalghe (per esempio il contenuto di pigmenti e l'efficienza fotosintetica), in seguito si descrivono le apparecchiature sperimentali e le prove svolte per valutare come varia la crescita delle microalghe in funzione della luce in un reattore semi-batch.

### 2.1 Obiettivo dell'analisi sperimentale

L'analisi sperimentale<sup>1</sup> ha come obiettivo studiare come varia la crescita delle colture di *Nannochloropsis salina* in funzione della luce in un reattore semi-batch; le prove sperimentali sono svolte in modo da comprendere un duplice aspetto:

- 1 come varia il comportamento delle microalghe imponendo una luce fissa e modificandone l'intensità;
- 2 come varia il comportamento delle microalghe imponendo una luce pulsata e modificandone il rapporto luce-buio e la frequenza di pulsazione.

Tali prove sperimentali permettono di ricavare la curva di crescita e le caratteristiche dell'alga in condizioni di intensità di luce costante (continua o pulsata) supponendo che i nutrienti non siano limitanti.

### 2.2 Materiali e metodi

Il seguente paragrafo riassume come viene svolta l'analisi sperimentale descrivendo più elementi:

- la materia prima soggetta a sperimentazione, ovvero le microalghe ed il mezzo di coltura (*medium*) in cui sono esse sono disperse (§2.2.1);

<sup>1</sup> L'analisi sperimentale presentata nel Capitolo 2 tratta una parte degli argomenti di un ampio progetto di ricerca per la tesi di dottorato della Dottoressa Eleonora Sforza; i dati presentati sono stati ottenuti da un gruppo di tesisti in un intervallo di tempo superiore rispetto al periodo di tirocinio di questa tesi, ma vengono comunque riportati per contestualizzare i risultati conseguiti ed effettuare delle considerazioni generali; ciò accade in quanto le analisi sono caratterizzate da tempi prolungati perché, per ottenere risultati significativi, è necessario aspettare i tempi specifici delle microalghe e del loro ciclo di vita.

- le apparecchiature con le quali si effettuano le sperimentazioni, ovvero i reattori e la lampada (§2.2.2);
- le procedure e gli strumenti necessari per valutare la concentrazione, l'efficienza fotosintetica e le concentrazioni di pigmenti delle microalghe analizzate (§2.2.3).

### 2.2.1 Specie algale e mezzo di coltura

La specie algale studiata è *Nannochloropsis salina*, un'alga marina di piccole dimensioni (diametro 2-4µm), di forma sferica, non flagellata; la classificazione è definita in Tabella 2.1.

La specie *Nannochloropsis salina* è di particolare interesse perché risultati sperimentali hanno dimostrato la sua capacità di accumulare, in condizioni di stress, acidi grassi poliinsaturi per valori superiori al 70% (Hoffman *et al.*, 2010).

**Tabella 2.1.** *Classificazione della specie algale utilizzata nell'analisi sperimentale (Hibberd, 1981).*

Dominio	Eukaryota
Regno	Chromista
Sottoregno	Harosa (Heterokonta)
Phylum	Ochrophyta (Phaeista – Limmista)
Classe	Eustigmatophyceae
Ordine	Eustigmatales
Famiglia	Monodopsidaceae
Genere	<i>Nannochloropsis</i>
Specie	Salina

Negli esperimenti svolti in laboratorio si utilizza, in particolare, il ceppo 40.85 proveniente dal “SAG - Culture Collection of Algae” di Goettingen (Germania).

Il mezzo di coltura rappresenta il substrato nel quale è possibile far crescere i microrganismi; nel caso della coltivazione di microalghe viene utilizzato un terreno “sintetico”; essendo esso preparato ad hoc per le esigenze dell'esperimento alla quale si vuole sottoporre la coltura, è composto da un numero definito di sostanze a concentrazione nota. Lo scopo dell'analisi è di studiare come varia la crescita delle microalghe al variare dell'intensità di luce. Per ottenere risultati confrontabili, è necessario avere condizioni iniziali uguali; ciò significa che si devono mantenere le stesse concentrazioni dei vari componenti che costituiscono il mezzo ed il preinoculo. In particolare è stato utilizzato un mezzo di coltura con composizione proposta originariamente da Guillard e Ryther (1962) e rappresentata in Tabella 2.2:

**Tabella 2.2.** Componenti costitutivi di 1L di mezzo di coltura iniziale (Guillard e Ryther, 1962)

Componente	Quantità
Sale marino ( <i>sea salt</i> )	22 g
Guillard's (F/2) Marine Water Enrichment Solution (SIGMA)	20 mL
NaNO <sub>3</sub>	1.5 g
Tampone Tris-HCl (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> · HCl)	40 mM (4.84 g)
Acqua	960 mL

La preparazione del mezzo di coltura prevede di solubilizzare nell'acqua il sale marino, il nitrato e la sostanza tampone; al termine del mescolamento si utilizza una soluzione di HCl per aggiustare il pH a 8 e, per garantire la sterilità, il mezzo viene autoclavato a 121°C per 20 minuti. Dopo la sterilizzazione viene aggiunto sotto cappa a flusso laminare (per mantenere la sterilità) l'F/2, precedentemente sterilizzato per filtrazione; questo infatti è un concentrato di sostanze nutritive importanti con tracce di metalli e vitamine, perciò le elevate temperature che si raggiungono nell'autoclavare porterebbero alla sua degradazione; la concentrazione dei componenti dell'F/2 in 1 L di terreno è indicata in Tabella 2.3.

**Tabella 2.3.** Concentrazione dei costituenti di Guillard's (F/2) Marine Water Enrichment Solution (SIGMA) in 1 L di terreno.

Componente	Concentrazione [g/L]
NaNO <sub>3</sub>	$7.50 \cdot 10^{-2}$
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	$5.65 \cdot 10^{-3}$
Na <sub>2</sub> EDTA	$4.16 \cdot 10^{-3}$
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	$3.15 \cdot 10^{-3}$
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	$1.00 \cdot 10^{-5}$
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	$2.20 \cdot 10^{-5}$
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	$1.00 \cdot 10^{-5}$
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	$1.80 \cdot 10^{-4}$
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	$6.00 \cdot 10^{-6}$
Vitamina B12	$5.00 \cdot 10^{-7}$
Vitamina B1	$1.00 \cdot 10^{-4}$
biotina	$5.00 \cdot 10^{-7}$

Il mantenimento delle colture algali è un'attività di fondamentale importanza perché fornisce gli inoculi necessari agli esperimenti. Il processo di mantenimento può essere effettuato in due diversi modi a seconda dello scopo; in entrambi i casi le operazioni vengono fatte sotto cappa a flusso laminare e con materiale sterile, per evitare inquinamenti:

1. colture monospecifiche vengono inoculate in piastre Petri su agar; lo scopo è il mantenimento dell'axenicità dei ceppi che servono per inoculi in volumi più grandi;

2. colture monospecifiche provenienti dalle piastre Petri vengono inoculate nel mezzo liquido in beuta. Lo scopo è ottenere delle dispersioni con una concentrazione adeguata per essere direttamente utilizzate come inoculo negli esperimenti; con questa procedura la coltura viene mantenuta in fase logaritmica allo scopo di mantenere attiva la replicazione cellulare.

In entrambi i casi, le colture vengono mantenute in ambienti asettici (per evitare contaminazioni), a temperatura costante (22-24°C) e illuminazione costante.

### **2.2.2 Apparecchiature**

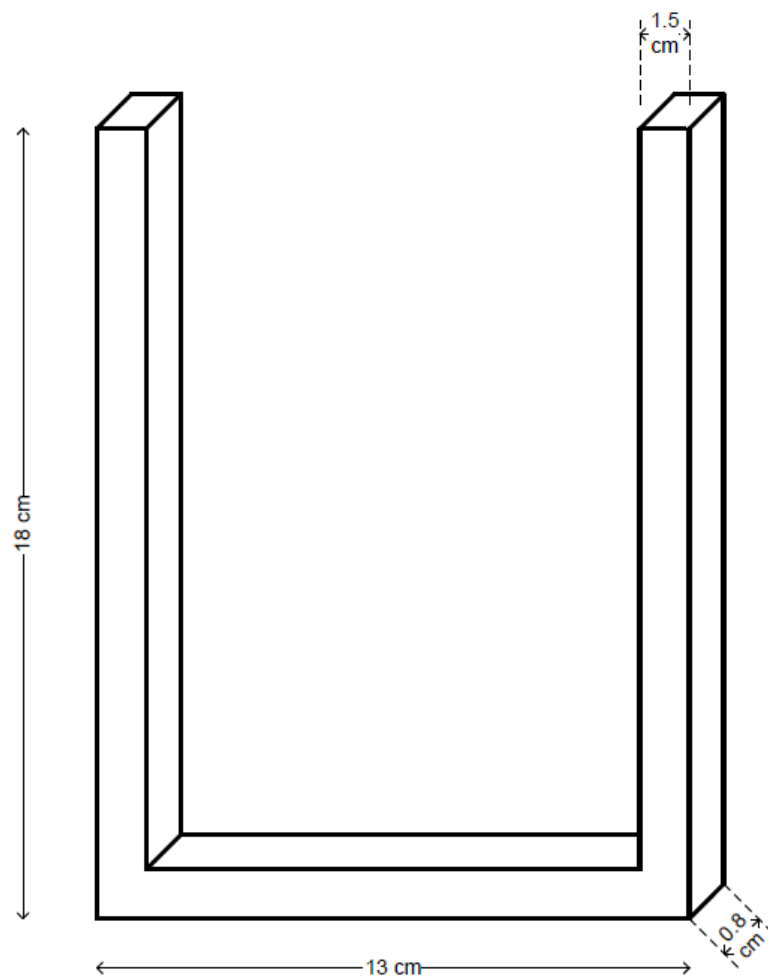
Per determinare come le microalghe variano la crescita in funzione della luce, vengono effettuati esperimenti utilizzando due tipi di apparecchiature che verranno spiegate nei paragrafi successivi: il reattore e la lampada.

#### **2.2.2.1 Il reattore**

Il reattore utilizzato è un semi-batch, reattore definito come “sistema chiuso alimentato” dato che le microalghe ed il mezzo di coltura vengono trattati in modo discontinuo (ovvero non ci sono ingressi e uscite), mentre la miscela di aria e anidride carbonica viene trattata in modo continuo (perché è continuamente alimentata).

Il reattore è caratterizzato da una geometria piatta (*flat panel*), cioè un pannello caratterizzato da una bassa profondità ed un’elevata superficie di esposizione alla luce; tale tipo di reattore permette di quantificare più facilmente la luce incidente e di considerare trascurabile il cammino ottico in un intervallo di concentrazioni della coltura.

Il reattore è costituito da una struttura ad “U” in policarbonato che definisce lo spessore del reattore; le sue dimensioni sono riportate in Figura 2.1. Sulla struttura ad “U” sono state incollate (attraverso un silicone particolare al policarbonato) due facce in policarbonato dello spessore di 2 mm. Il volume di coltura contenibile così generato è di circa 150 mL.



**Figura 2.1.** Schema e dimensioni della struttura ad “U” del reattore fed-bach.

L'immissione della miscela di aria e anidride carbonica avviene attraverso un tubicino forato, fatto passare attraverso due fori ricavati sui lati più lunghi della struttura in prossimità della base. La tenuta viene garantita ancora una volta dal silicone al policarbonato immesso negli interstizi tra il tubo e la struttura ad “U”. I fori sul tubicino sono stati effettuati con una siringa e vengono tenuti ad una distanza di circa 1.5 cm l'uno dall'altro.

Il reattore viene illuminato su una faccia in modo che il fascio possa essere considerato perpendicolare alla superficie; è inoltre importante tenere in considerazione che la geometria scelta rende trascurabile (almeno a basse concentrazioni) l'effetto delle oscillazioni a cui le microalghe sono esposte per effetto dell'agitazione (i cosiddetti cicli luce-buio). Per studiare questi effetti e il contributo di questi alla crescita delle microalghe (Terry 1986; Nedbal *et al.*; 1996a,b; Janssen *et al.* 2000 b; Merchuk *et al.*, 1998) si deve modificare l'andamento della luce attraverso la fonte luminosa utilizzata, imponendo, ad esempio, una frequenza di pulsazione.

Il bilancio della biomassa è quello di un reattore batch, in cui non si considera la morte cellulare:

$$\frac{dc_x}{dt} = \mu \cdot c_x, \quad (2.1)$$

dove:

- $c_x$ : concentrazione di biomassa nella soluzione [ $\text{g}_{\text{bio}} \text{L}^{-1}$ ];
- $\mu$ : velocità di crescita delle microalghe [ $\text{h}^{-1}$ ];
- $t$ : tempo [h].

Per quanto riguarda l'anidride carbonica il bilancio è invece simile ad un reattore continuo:

$$0 = \left( \rho \cdot \dot{V} \cdot x_{CO_2 \text{ in}} \right) \Big|_{in} - \left( \rho \cdot \dot{V} \cdot x_{CO_2 \text{ out}} \right) \Big|_{out} - (r_{CO_2}), \quad (2.2)$$

dove:

- $c'_{CO_2}$ : concentrazione molare di anidride carbonica nella soluzione [ $\text{mol L}^{-1}$ ];
- $V$ : volume di soluzione [L];
- $\rho$ : densità molare della miscela aria-anidride carbonica [ $\text{mol L}^{-1}$ ];
- $\dot{V}$ : portata volumetrica [ $\text{L h}^{-1}$ ];
- $x_{CO_2 \text{ in}}$ : frazione molare di anidride carbonica nella miscela in ingresso [-];
- $x_{CO_2 \text{ out}}$ : frazione molare di anidride carbonica nella miscela in uscita [-].
- $r_{CO_2}$ : termine di reazione; esso rappresenta l'anidride carbonica fissata dalle microalghe tramite la fotosintesi [ $\text{mol h}^{-1}$ ].

La portata volumetrica della miscela aria-anidride carbonica è generalmente fissata a circa  $1 \text{ L h}^{-1}$  (5% vol/vol  $\text{CO}_2$  in aria) e si trova alla pressione di 1.5 bar. Secondo i calcoli presenti nel lavoro di Turazza (2010), la portata molare dell'anidride carbonica al reattore corrisponde a  $0.184 \text{ moli} \cdot \text{giorno}^{-1}$ , perciò per un reattore di volume complessivo di 100 mL, e una composizione di carbonio del 54% del peso secco dell'alga (Zanella, 2010), la quantità di anidride carbonica che è necessario fissare per la produzione di  $1 \text{ kg}_{\text{dw}}$  (dove DW è il peso secco o *dry weight*) risulta essere di  $1.98 \text{ kg}_{\text{CO}_2}$ ; considerando una velocità di crescita di  $0.6 \text{ h}^{-1}$  e una concentrazione di  $5 \text{ g L}^{-1}$ , il fabbisogno di anidride carbonica risulta di  $0.0135 \text{ mol giorno}^{-1}$ .

Il fabbisogno di  $\text{CO}_2$  è soddisfatto dalle condizioni operative utilizzate, inoltre la portata di gas risulta sufficiente anche per garantire il mantenimento della sospensione e prevenire i depositi. Data la compatibilità delle condizioni operative, è possibile definire un parametro da utilizzare come riferimento indicativo per la definizione delle condizioni operative di massima in apparecchiature più grandi; tale parametro è il



rapporto tra la di portata di gas ed il volume del reattore, che nel caso studiato risulta pari a  $15 \text{ h}^{-1}$ . Ovviamente tale aspetto deve essere rivalutato nel caso in cui si vogliono effettuare esperimenti a più elevate concentrazioni di biomassa.

### 2.2.2.2 La lampada

La lampada a led utilizzata è prodotta dalla ditta ceca PhotoSynthetic Instruments (PSI); essa garantisce irradianze fino a circa  $1700 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ed è costituita da 112 led disposti in un rettangolo di  $14 \times 8$ . Operativamente, i pannelli devono essere messi ad una distanza di almeno 20 cm dalla fonte luminosa per avere omogeneità del flusso radiativo; l'intensità luminosa è misurata da un radiometro DeltaOhm HD2102.1, la cui sonda è stata posta alla stessa distanza dei pannelli dalla sorgente luminosa. Il controller acquistato assieme alla lampada permette di definire alcune funzioni preimpostate rappresentate in Figura 2.2; con esse è possibile effettuare un irraggiamento continuo, pulsato (frequenze anche oltre 5000 Hz), sinusoidale e crescente-decrescente.

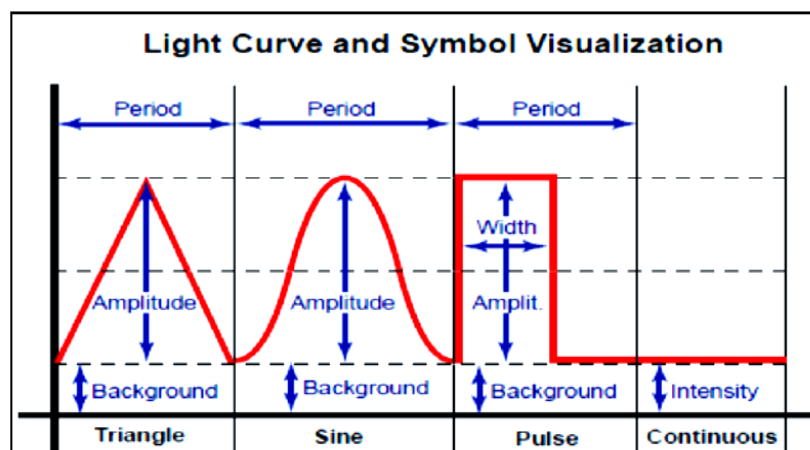


Figura 2.2. Funzioni di irraggiamento preimpostate nel controller della lampada.

Operativamente le funzioni più interessanti sono quelle che permettono un irraggiamento pulsato per simulare i cicli luce-ombra e quella sinusoidale per simulare l'andamento dell'irradianza solare.

### 2.2.3 Procedure e strumenti per analizzare le microalghe

Le analisi da effettuate sulla coltura microalgale possono essere suddivise in due grandi gruppi:

- analisi durante la crescita: si prelevano giornalmente dei campioni di coltura microalgale dal reattore e si misura la crescita delle microalghe; il sesto giorno si

anche inoltre il contenuto di pigmenti e l'efficienza fotosintetica (sempre lo stesso giorno per poter confrontare i dati di prove sperimentali diverse);

- analisi al termine della crescita: tale misura viene effettuata solitamente dopo l'ottavo giorno (in sistemi semi-batch), quando la crescita della coltura entra nella fase stazionaria; per ogni campione prelevato si misura il peso secco.

Si elencano in seguito le procedure e gli strumenti utilizzati per effettuare le analisi appena elencate.

### 2.2.3.1 Misura della crescita delle colture microalgali

Colture monospecifiche sono inoculate ( $\sim 10^7$  cell mL<sup>-1</sup>) nei reattori contenenti il mezzo di coltura in quantità definite nel paragrafo precedente; la successiva crescita delle microalgahe, che ha una durata media di 7-8 giorni, viene seguita mediante due metodi:

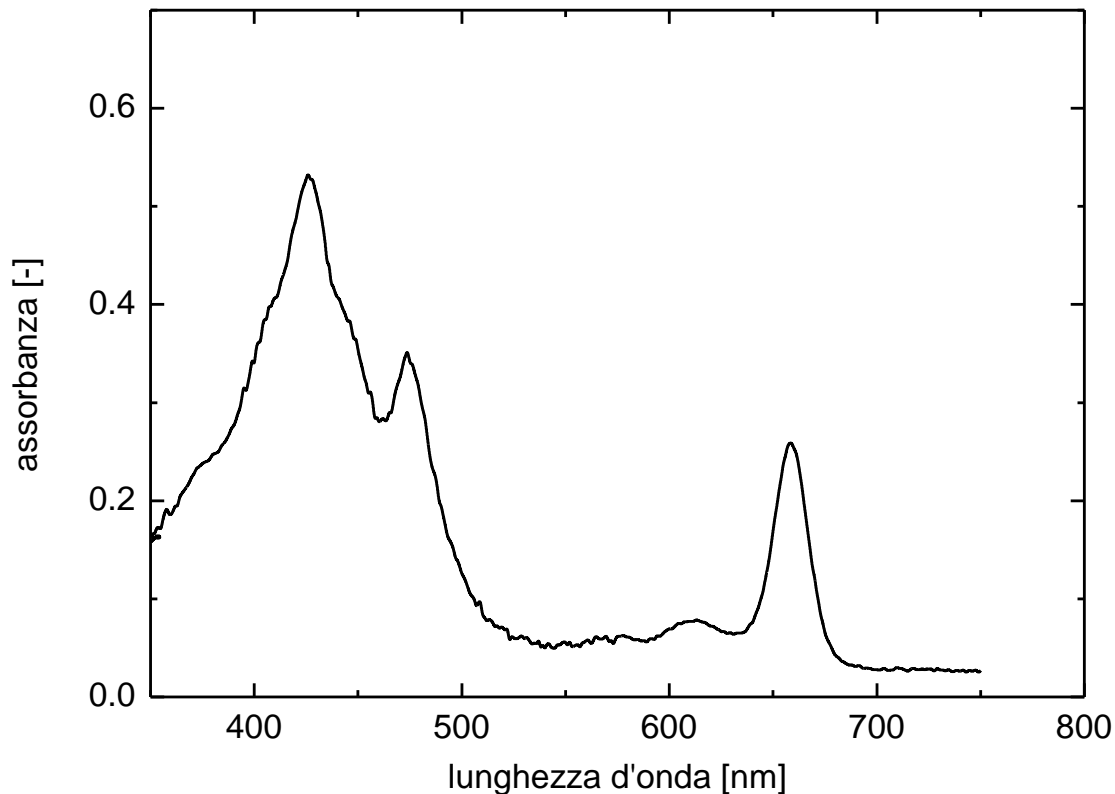
- conta del numero di cellule (metodo diretto): le cellule vengono contate ogni giorno utilizzando il microscopio ottico ed un emocitometro (o camera di Bürker); quest'ultimo strumento consiste in un vetrino di elevato spessore su cui è inciso un reticolo di dimensioni note, al di sopra del quale viene applicato un sottile vetrino coprioggetto. La procedura consiste nel diluire la soluzione da analizzare (per permettere di distinguere le cellule nella conta) e iniettarla vicino allo spazio che si crea fra la superficie incisa ed il vetrino coprioggetto; in questo modo la soluzione riempie lo spazio per capillarità ed è possibile contare le cellule visibili al microscopio. Il successivo calcolo della concentrazione di cellule per millilitro si effettua tenendo in considerazione il volume di soluzione analizzato (il volume che la soluzione riempie per capillarità è noto) ed il grado di diluizione.
- determinazione della densità ottica (metodo indiretto-correlazionale): il prelievo giornaliero di coltura viene sottoposto alla misurazione della densità ottica (o assorbanza) attraverso uno spettrofotometro (Spectronic Unicam UV500) a doppio raggio con monocromatore; viene misurata l'assorbanza a 750 nm (OD<sub>750</sub> in cuvette a cammino ottico di 1 cm) perché a tale lunghezza d'onda le molecole di clorofilla non assorbono e quindi, ipotizzando che la luce assorbita sia dovuta solo alle presenza delle cellule e non dei pigmenti, si può ricavare un'indicazione discretamente accurata dell'assorbanza dovuta alle cellule. Per ottenere una correlazione tra l'assorbanza misurata e la concentrazione di cellule è necessario effettuare una taratura con prove sperimentali; si ottiene così una relazione di linearità specifica per il tipo di cellule impiegate. Tuttavia, al termine della fase di crescita esponenziale delle alghe, la relazione tra assorbanza e concentrazione cellulare perde l'iniziale linearità per via dell'accumulo di detriti cellulari.

### 2.2.3.2 Misura del peso secco

La procedura per misurare il peso secco prevede il prelievo di una quantità nota di coltura, la sua diluizione con acqua deionizzata e la filtrazione sottovuoto mediante l'uso di filtri di nitrocellulosa (porosità 0.2  $\mu\text{m}$ ) precedentemente essiccati e pesati. Dopo la filtrazione, si pongono i dischi di nitrocellulosa (su cui sono depositate le microalghe) in un forno a 80°C per 2 ore in modo tale da eliminare l'umidità residua. Al termine dell'essiccamento i dischi vengono pesati un'altra volta per poter poi ottenere il peso netto; dividendo tale valore per il volume noto inizialmente prelevato, si ottiene il peso secco (DW) della coltura.

### 2.2.3.3 Estrazione dei pigmenti con solvente

I pigmenti contenuti nelle microalghe vengono estratti e successivamente quantificati attraverso una determinazione spettrofotometrica. La procedura prevede che il sesto giorno di crescita si prelevi 1 mL di coltura e lo si sottoponga a centrifugazione in microcentrifuga (*Labnet Spectrafuge 7M*) a 3000 rpm per 10 minuti; successivamente si elimina il surnatante e si procede alla risospensione del pellet in 1 mL di N,N-dimetilformammide 100% (DMF), solvente capace di estrarre sia la clorofilla sia i carotenoidi dalle cellule. La soluzione così ottenuta viene lasciata al buio in frigorifero (4 °C) per un minimo di 48 ore in modo da completare l'estrazione; successivamente si centrifugano nuovamente i campioni per 10 minuti e si pongono in cuvette di quarzo (cammino ottico di 1 cm) per la scansione spettrofotometrica (*Spectronic Unicam UV500*) con le lunghezze d'onda comprese nell'intervallo 350 nm e 750 nm. Si ottiene un grafico di assorbimento il cui tipico andamento è riportato in Figura 2.3.



**Figura 2.3.** Esempio dello spettro di assorbimento ottenuto dalla scansione spettrofotometrica di un campione trattato con DMF per la misurazione del contenuto di pigmenti.

Dall'analisi dello spettro di assorbimento si ricava l'assorbanza a 664 nm, lunghezza d'onda di assorbimento della clorofilla *a* (unica clorofilla presente in *Nannochloropsis salina*) e a 480 nm, lunghezza d'onda di assorbimento dei carotenoidi.

Il calcolo della concentrazione di clorofilla si effettua assumendo che la relazione tra il valore di assorbanza (ottenuto dalla scansione spettrofotometrica) e la concentrazione sia descritta dalla legge di Lambert-Beer

$$A_{664} = \varepsilon \cdot C_{chl} \cdot l, \quad (2.3)$$

dove:

- $C_{chl}$ : concentrazione di clorofilla *a* nel campione [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ];
- $A_{664}$ : assorbanza della clorofilla *a* in N,N-dimetilformammide alla lunghezza d'onda pari a 664 nm;
- $\varepsilon$ : coefficiente di estinzione specifico per il pigmento in DMFA, pari a 88.74;
- $l$ : cammino ottico, coincidente con lo spessore della cuvetta [m].

La concentrazione dei carotenoidi si ottiene invece utilizzando l'assorbanza secondo l'equazione proposta da Wellburn (1994):

$$Car = \frac{(1000 \cdot A_{480}) - (1.12 \cdot C_{chl})}{245}, \quad (2.4)$$

dove:

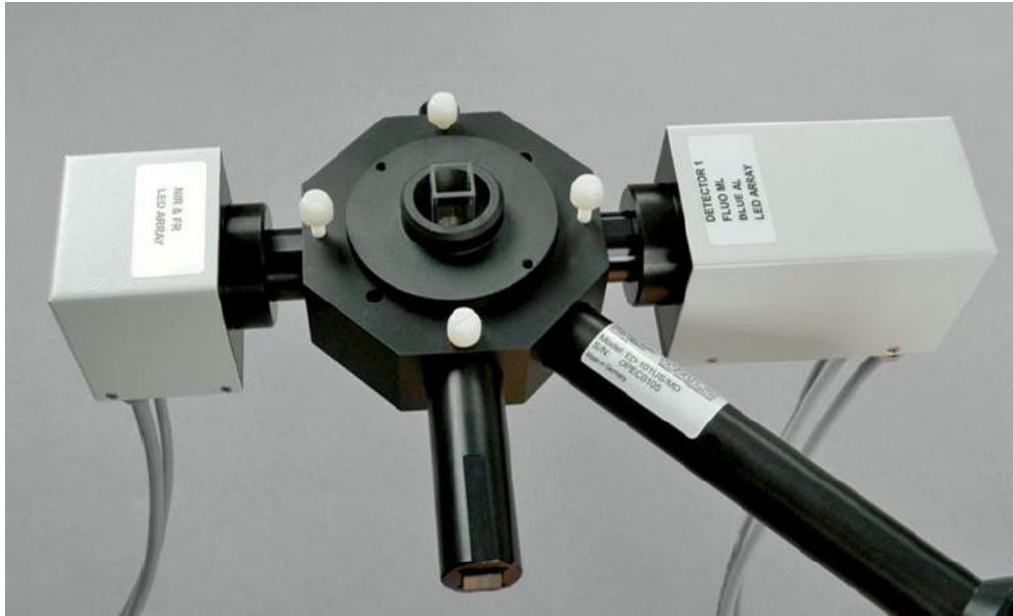
- $Car$ : concentrazione di carotenoidi nel campione [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ];
- $A_{480}$ : assorbanza dei carotenoidi in N,N-dimetilformammide alla lunghezza d'onda pari a 480 nm.

#### 2.2.3.4 Misura della fluorescenza in vivo

La misura dell'efficienza e della funzionalità dei fotosistemi (in particolare del PSII) è fondamentale per determinare l'effetto delle diverse intensità di luce a cui sono state sottoposte le colture durante la crescita.

I fotoni inviati dalla sorgente luminosa raggiungono le molecole di clorofilla, eccitando gli elettroni allo stato di singoletto o di tripletto; questa energia accumulata viene trasferita fra le molecole di clorofilla dell'antenna fotosintetica fino a giungere, in una frazione di secondo, il centro di reazione dove avvia una cascata fotochimica che coinvolge numerose molecole e che ha come risultato finale la separazione di carica necessaria alla scissione della molecola d'acqua. Tuttavia non tutta l'energia giunta all'antenna viene scaricata nel centro di reazione, perché in parte (1-2%) viene dissipata sotto forma di calore o emessa come fluorescenza (Müller, 2001); se questa emissione è basale e costante significa che il "traffico elettronico" è regolare e che non vi sono rallentamenti del flusso dovuti a chinoni ridotti o a danni di componente del fotosistema, mentre un'emissione maggiore indica, invece, che l'antenna sta dissipando una maggiore quantità di energia. In questo caso i fotosistemi sono "chiusi", cioè dissipano in fluorescenza l'energia luminosa in eccesso e questa può essere rilevata da un tipo particolare di fluorimetro.

Il fluorimetro impiegato è il Dual-"Pulse Amplitude Modulation"-100 (PAM) Measuring System (rappresentato in Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Fluorimetro utilizzato per la misura della fluorescenza in vivo.

L'analisi di fluorescenza si effettua con tre differenti luci:

1. luce di misura (ML): è una luce modulata di debole intensità ( $42 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); essa permette allo strumento di rilevare la fluorescenza emessa dal campione ma non è in grado di indurre fotosintesi;
2. luce attinica: consente al campione di eseguire la fotosintesi saturando la sua capacità fotosintetica;
3. flash saturante: è una luce di elevata intensità ( $6000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ma di breve durata (600 ms) che è in grado di saturare momentaneamente la fotochimica riducendo tutti gli accettori chinonici disponibili, così da avere tutti i centri di reazione chiusi.

Per svolgere l'analisi si preleva il campione (2 mL) dal reattore e lo si centrifuga a 3000 rpm per 10 minuti; successivamente si eliminano 500  $\mu\text{l}$  di surnatante e si risospinge il pellet nei restanti 1,5 ml.

Il campione viene posto al buio per almeno 20 minuti, in modo tale che l'assenza di luce spinga le cellule ad aprire tutte le antenne fotosintetiche per essere in grado di assorbire qualsiasi fotone in arrivo, portando quindi il potenziale di cattura dei fotoni al massimo possibile; in questo modo è possibile misurare l'efficienza dei fotosistemi.

Il campione viene e posto nella cuvetta (cammino ottico 1 cm) e lo strumento restituisce un grafico, nel quale si prendono in considerazione i seguenti valori:

- $F_0$ : rendimento minimo di fluorescenza al buio; esso rappresenta la base della misurazione e viene calcolato accendendo la luce di misura dopo l'adattamento

al buio. In questo caso tutti i centri di reazione sono aperti e la fluorescenza è al minimo;

- $F_m$ : rendimento di fluorescenza massimale alla luce; esso è ottenuto con un flash di luce saturante che causa l'immediata chiusura dei centri di reazione per sovraccarico e la conseguente totale deviazione in fluorescenza dell'energia incamerata dalle antenne.
- $F_v$ : valore variabile di fluorescenza; esso viene definito dalla differenza tra  $F_0$  e  $F_m$ .

Da questi parametri si ricava il valore indicativo dell'efficienza fotosintetica (rendimento quantico massimale) del PSII:

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m}, \quad (2.5)$$

Il rapporto  $F_v/F_m$  indica l'efficienza massimale di cattura dei fotoni da parte dei centri di reazione del PSII. Tale grandezza può cambiare in seguito ad una modifica dell'efficienza del *quenching* non fotochimico.

### 2.3 Svolgimento prove sperimentali

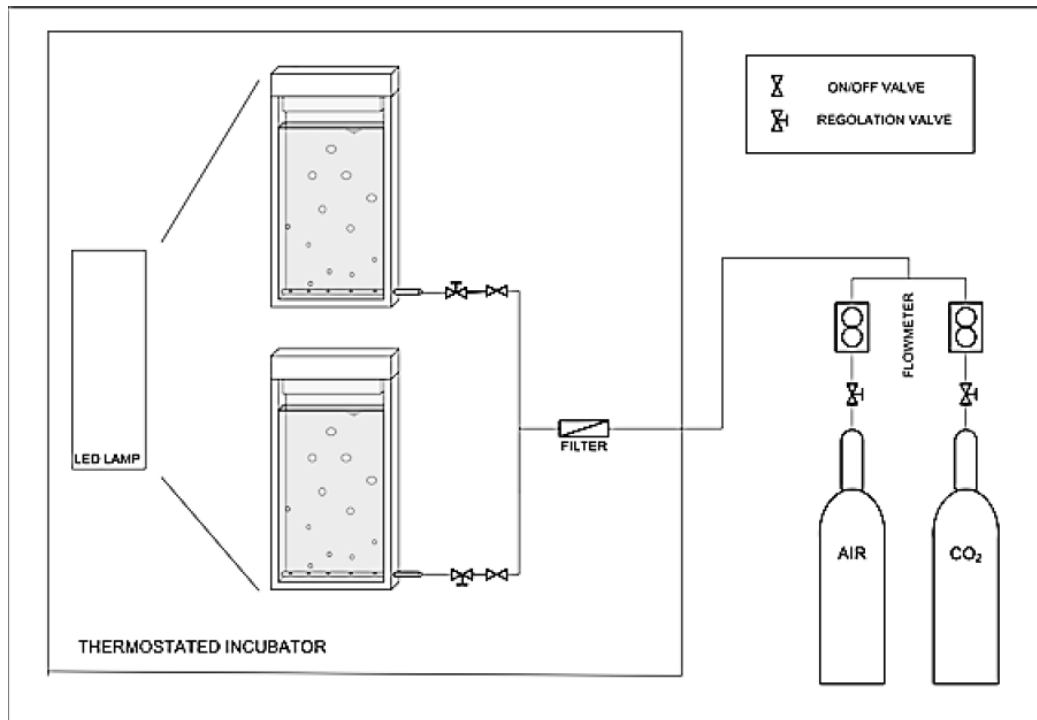
Le prove sperimentali sono state effettuate assemblando il reattore semi-batch e la lampada descritti in §2.2.2; esse sono state svolte in modo da valutare il comportamento delle microalghe non solo in funzione dell'intensità di luce ma anche in funzione del rapporto luce-buio e della frequenza delle pulsazioni.

Per ottenere tali dati sono stati svolti esperimenti a luce continua variando solo l'intensità di luce ed esperimenti a luce pulsata mantenendo costante l'intensità di luce e variando il rapporto luce-buio e la frequenza di pulsazione; quest'ultima tipologia di prove è stata effettuata per comprendere se l'utilizzo di pulsazioni comporta una variazione nell'intensità di luce ottimale per la crescita delle microalghe.

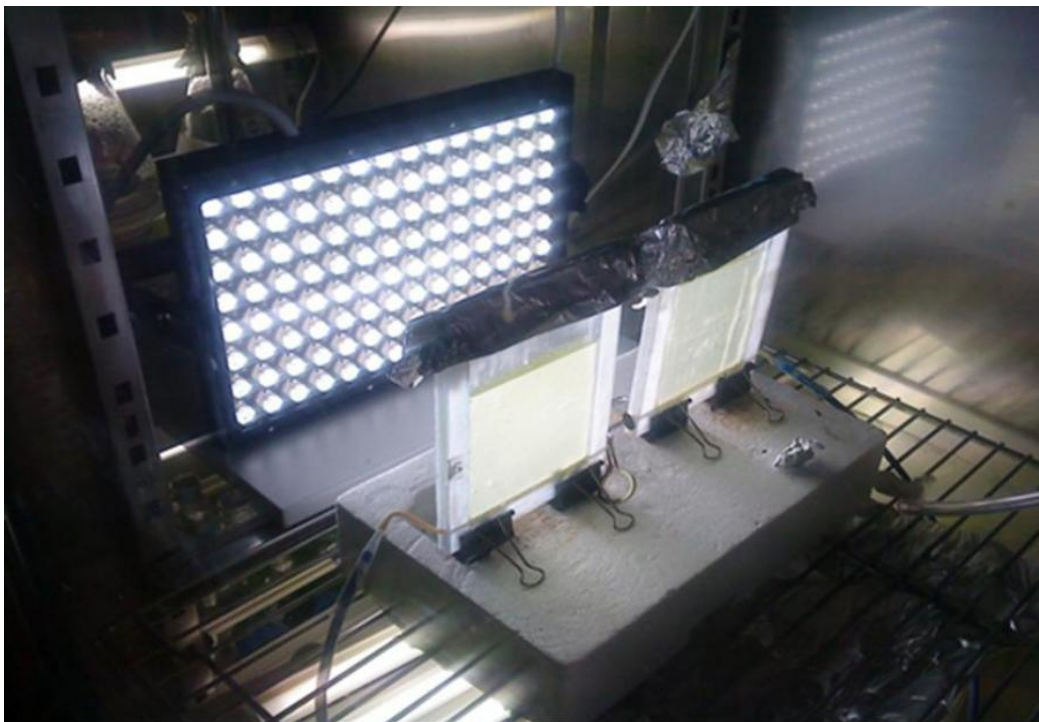
La procedura seguita per la prova sperimentale è la seguente: il pannello viene lavato e sterilizzato, si riempie con 150 mL di mezzo di coltura e si procede con l'inoculo di microalghe ( $\sim 10^7$  cell mL<sup>-1</sup>); in seguito si posiziona il reattore semi-batch davanti alla lampada ed entrambi vengono posti all'interno di un incubatore per mantenere costante la temperatura del ambiente che li circonda; infine si collegano i tubi per alimentare la coltura con la miscela composta da anidride carbonica ed aria.

Ogni prova prevede la coltivazione delle microalghe in un sistema di due reattori posizionati in parallelo e sottoposti alle medesime condizioni, in modo da avere una verifica dei risultati sperimentali. Lo schema del sistema utilizzato per la

sperimentazione è rappresentato in Figura 2.5a; la Figura 2.5b illustra invece l'implementazione di tale schema in laboratorio.



(a)



(b)

**Figura 2.5.** Illustrazione del sistema di sperimentazione semi-batch; (a) schema e (b) implementazione dello schema usato in laboratorio.



Le prove sperimentali con luce fissa prevedono di impostare la lampada ad un'intensità di luce prestabilita e mantenerla accesa in modo continuo per l'intera durata della curva di crescita; le prove sono state svolte analizzando le seguenti intensità di luce :  $4.6 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $46 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Per quanto riguarda invece le prove sperimentali con luce pulsata, si ha un sistema in cui le microalghe sono sottoposte a dei cicli definiti "luce-buio" con una frequenza stabilita; mentre la frequenza stabilisce quanti cicli luce-buio vengono effettuati nell'unità di tempo, il rapporto luce-buio stabilisce la parte del tempo del ciclo in cui la luce è fissa all'intensità dell'impulso e la restante parte in cui è assente; di conseguenza è necessario impostare altri due parametri nella lampada oltre l'intensità di luce:

1. frequenza di pulsazione: è il parametro che esprime quanti cicli vengono fatti in un'unità di tempo; nel caso in cui la frequenza venga espressa in Hz, il valore ad esso associato rappresenta il numero di cicli per secondo;
2. rapporto luce-buio: è il parametro che definisce la frazione di un ciclo in cui il sistema riceve luce rispetto al tempo in cui l'intensità di luce è nulla.

La logica con cui si confrontano i dati ottenuti è che è possibile mantenere costante l'intensità di luce aumentando l'intensità dell'impulso e contemporaneamente diminuendo il tempo di irraggiamento; risulta perciò fondamentale la distinzione tra intensità di luce e intensità dell'impulso. Per spiegare tale concetto si introduce la Figura 2.6:

- Figura 2.6a: luce continua con intensità di luce pari a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ;
- Figura 2.6b: luce con intensità dell'impulso pari a  $350 \mu\text{E m}^{-2}$ , frequenza di 10 Hz e rapporto luce-buio del ciclo pari a 1:2. L'intensità di luce è pari a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ;
- Figura 2.6c: luce con intensità dell'impulso pari a  $1200 \mu\text{E m}^{-2}$ , frequenza di 10 Hz e rapporto luce-buio del ciclo pari a 1:9. L'intensità di luce è pari a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

$$\text{Intensità di luce : } 120 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

TEMPO: 1 s	
L	

(a)

<b>Intensità dell'impulso</b>	$350 \mu\text{E m}^{-2}$
<b>Frequenza</b>	10 Hz
<b>Quantità di fotoni in un ciclo se il rapporto L-B = 1:0</b>	$350 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1} / 10 \text{ Hz} = 35 \mu\text{E m}^{-2}$
<b>Rapporto L-B</b>	1 : 2
<b>Quantità effettiva di fotoni in un ciclo</b>	$35 \mu\text{E m}^{-2} / 3 = \sim 12 \mu\text{E m}^{-2}$
<b>Intensità di luce</b>	$\sim 12 \mu\text{E m}^{-2} \cdot 10 \text{ Hz} = \sim 120 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

TEMPO: 1s									
CICLO L-B	CICLO L-B	CICLO L-B	CICLO L-B	CICLO L-B	CICLO L-B	CICLO L-B	CICLO L-B	CICLO L-B	CICLO L-B
L B B	L B B	L B B	L B B	L B B	L B B	L B B	L B B	L B B	L B B

(b)

<b>Intensità dell'impulso</b>	$1200 \mu\text{E m}^{-2}$
<b>Frequenza</b>	10 Hz
<b>Quantità di fotoni in un ciclo se il rapporto L-B = 1:0</b>	$1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1} / 10 \text{ Hz} = 120 \mu\text{E m}^{-2}$
<b>Rapporto L-B</b>	1 : 9
<b>Quantità effettiva di fotoni in un ciclo</b>	$120 \mu\text{E m}^{-2} / 10 = 12 \mu\text{E m}^{-2}$
<b>Intensità di luce</b>	$12 \mu\text{E m}^{-2} \cdot 10 \text{ Hz} = 120 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

TEMPO: 0.3 s																			
CICLO L-B				CICLO L-B					CICLO L-B										
L	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	L	B	B	B	B	B	B	B

(c)

**Figura 2.6.** Rappresentazione della luce continua e pulsata; per ogni caso il tempo viene suddiviso in funzione della frequenza e della frazione luce-buio. In (a) si illustra una luce continua con intensità pari a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; in (b) si illustra una luce con intensità di impulso pari a  $350 \mu\text{E m}^{-2}$ , con frequenza 10 Hz e frazione del ciclo luce-buio pari a 1:2; in (c) si illustra una luce con intensità di impulso pari a  $1200 \mu\text{E m}^{-2}$ , con frequenza 10 Hz e frazione del luce buio pari a 1:9.

Sono state effettuate più prove sperimentali, variando contemporaneamente l'intensità di impulso, la frequenza di pulsazione e il rapporto luce-buio; per tutti i casi la quantità di fotoni al secondo è uguale, infatti l'intensità di luce è pari a  $120\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Le diverse prove sono definite nella Tabella 2.4.

**Tabella 2.4.** *Elenco del valore assunto dalle variabili associate alla lampada nelle prove sperimentali con luce pulsata; la quantità di fotoni al secondo è uguale per tutte le prove, infatti l'intensità di luce è pari a  $120\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .*

Intensità dell'impulso [ $\mu\text{E m}^{-2}$ ]	Frequenza di pulsazione [Hz]	Rapporto luce-buio	Significato
350	10	1:2	Un ciclo luce-buio dura 100 ms composto da ~33 ms di luce e ~66 ms di buio.
350	30	1:2	Un ciclo luce-buio dura ~33 ms composto da ~11 ms di luce e ~22 ms di buio.
1200	10	1:9	Un ciclo luce-buio dura 100 ms composto da 10 ms di luce e 90 ms di buio.
1200	5	1:9	Un ciclo luce-buio dura 200 ms composto da 20 ms di luce e 180 ms di buio.
1200	1	1:9	Un ciclo luce-buio dura 1000 ms composto da 100 ms di luce e 900 ms di buio.

In seguito i risultati ottenuti sono stati confrontati con le prove sperimentali a luce continua a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  per valutare come la frequenza e il rapporto luce-buio influiscono nella produttività e nell'efficienza fotosintetica.

## 2.4 Risultati e discussione

L'analisi sperimentale, come definito nei paragrafi precedenti, prevede lo svolgimento di prove diverse a seconda degli obiettivi prefissati in §2.1; in seguito vengono perciò elencati e discussi i risultati ottenuti per i diversi tipi di prova sperimentale, in particolare:

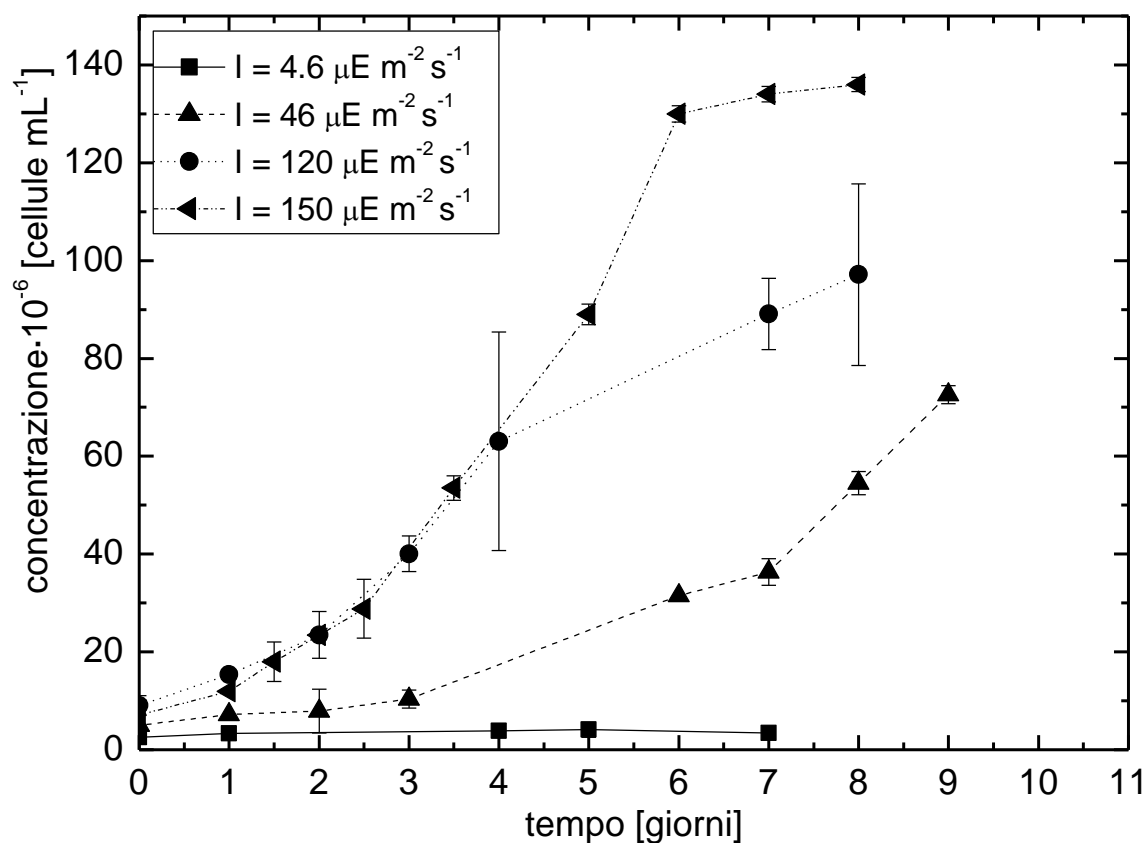
- risultati ottenuti dalle prove sperimentali con il reattore semi-batch utilizzando un irraggiamento continuo e variandone l'intensità (§2.4.1);

- risultati ottenuti dalle prove sperimentali con il reattore semi-batch utilizzando un irraggiamento pulsato e variando l'intensità dell'impulso, la frequenza e il rapporto luce-buio (§2.4.2).

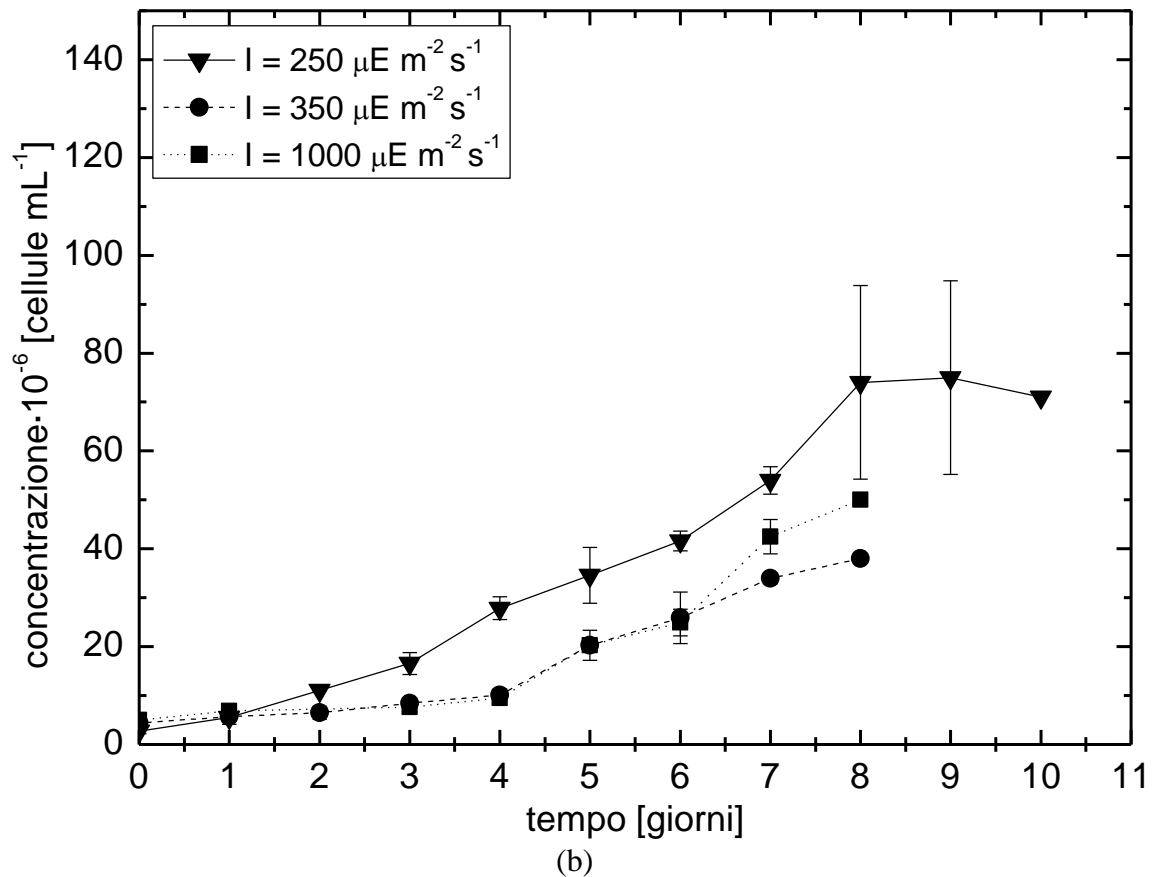
## 2.4.1 Irraggiamento continuo: variazione dell'intensità di luce

### 2.4.1.1 Curva di crescita

I risultati delle prove sperimentali in cui è stato valutato come le curve di crescita delle microalghe variano se sottoposte a diverse intensità di luce, sono riportati in Figura 2.7; in particolare, in Figura 2.7a, si rappresentano le curve di crescita della coltura sottoposta ad un'intensità di luce pari a  $5 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $46 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $120 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e  $150 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , mentre in Figura 2.7b, le curve di crescita quando le microalghe sono sottoposte ad un'intensità di luce pari a  $250 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ,  $350 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  e  $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .



(a)



**Figura 2.7.** Risultati ottenuti dalle prove sperimentali a luce continua; in (a) viene riportata la curva di crescita per  $I=5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $46 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mentre in (b) per  $I=250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

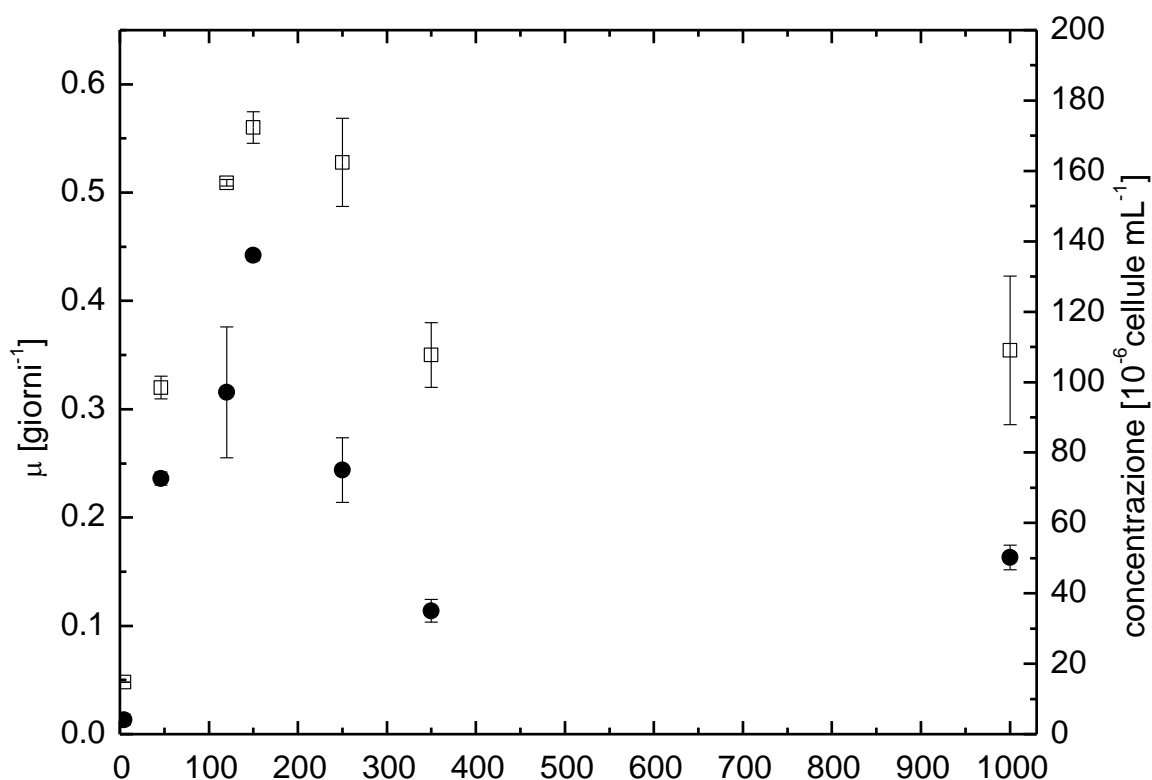
L'analisi della Figura 2.7a rivela che per un intervallo di intensità di luce compreso tra  $5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , le velocità di crescita aumentano all'aumentare dell'intensità dell'irraggiamento.

La coltura sottoposta ad un'intensità di luce pari a  $5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mantiene pressoché invariata la propria concentrazione e non presenta una fase esponenziale; ciò significa che l'intensità di luce utilizzata è insufficiente per la crescita della biomassa. Analogamente risulta insufficiente anche un'intensità di luce pari a  $46 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , per la quale si ottiene un limitato incremento di concentrazione; anche in questo caso si può perciò concludere che il valore di intensità di luce utilizzato è limitante per la crescita delle microalghe. Le coltivazioni sottoposte ad un'intensità di luce pari a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  presentano invece una velocità nettamente superiore rispetto alle precedenti; la fase di crescita esponenziale è visibile tra il primo ed il quarto giorno, mentre tra il quinto ed il sesto la coltura presenta una fase stazionaria e la concentrazione risulta poco inferiore a  $100 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$ . Infine, con intensità di luce pari a  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la crescita delle microalghe diventa esponenziale già dopo il primo giorno, ma a differenza della prova a

$120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , essa non termina al quarto giorno bensì al sesto, ottenendo una concentrazione finale di quasi  $140 \cdot 10^6$  cellule  $\text{mL}^{-1}$ .

Per quanto riguarda invece i risultati rappresentati in Figura 2.7b, si nota che, benché l'andamento delle curve sia simile a quello di Figura 2.7a, le concentrazioni che si raggiungono sono nettamente inferiori. La coltivazione microalgale sottoposta ad un'intensità di luce pari a  $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  presenta una crescita molto lenta, preceduta da una lunga fase di ritardo (*lag*); si suppone che in tale fase le microalghe effettuino delle modifiche strutturali (per esempio varia il contenuto di pigmenti) per adattarsi all'elevata intensità di luce alla quale sono sottoposte. Tale andamento si ripresenta nelle curve di crescita a  $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; si nota però che in queste la concentrazione finale della coltivazione è inferiore rispetto a quella ottenuta quando l'intensità di luce è pari a  $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Il decrescere della concentrazione finale e della velocità di crescita all'aumentare dell'intensità di luce è spiegabile ipotizzando che le microalghe sono fotoinibite.

In Figura 2.8 vengono rappresentate le velocità di crescita calcolate nella fase esponenziale delle curve di entrambi i grafici di Figura 2.7; tale grafico corrisponde alla curva *P/I* descritta in §1.2.3. Vengono riportate anche le concentrazioni finali raggiunte dalle colture alle diverse intensità di luce.



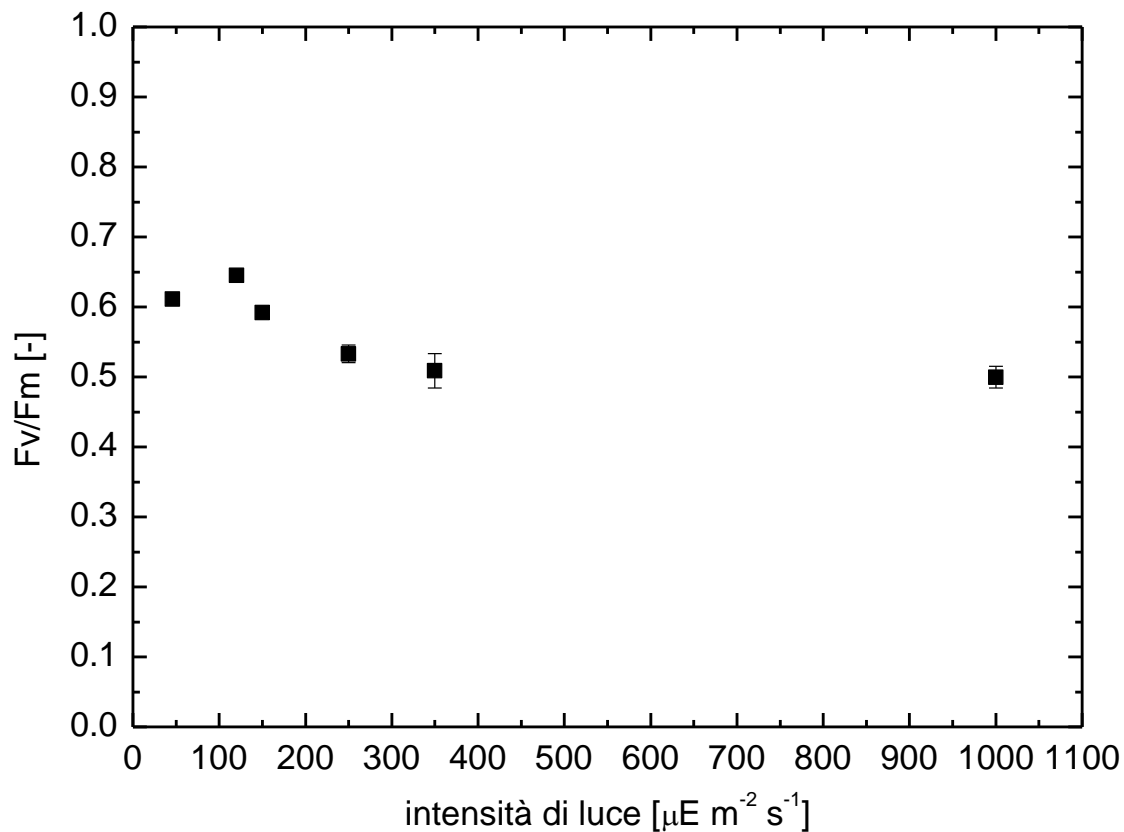
**Figura 2.8.** Rappresentazione delle velocità di crescita (quadri) ottenute nella fase esponenziale e delle concentrazioni finali (cerchi) ottenute per le diverse intensità di luce.

Dall'analisi dell'andamento delle costanti di crescita rappresentato in Figura 2.8, si conclude che per intensità di luce inferiore a  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  il sistema si trova nella regione "luce limitante", ovvero la parte della curva P/I in cui la velocità di fotosintesi aumenta in modo direttamente proporzionale all'aumentare dell'intensità di luce; ciò avviene perché, in tali condizioni, la velocità di assorbimento dei fotoni determina la velocità di trasporto degli elettroni dall'acqua all'anidride carbonica e ciò comporta che la costante di crescita aumenti quasi linearmente con l'intensità di luce. Se si considerano invece valori di intensità superiori a  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , il sistema si trova nella regione "luce inibente", nella quale l'irraggiamento diventa eccessivo e influisce negativamente sulla velocità di crescita; si conclude perciò che l'intensità di luce saturante corrisponda ad un valore compreso tra  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

La concentrazione cellulare ottenuta in fase stazionaria nelle diverse curve presenta un andamento analogo alle velocità di crescita.

#### 2.4.1.2 Efficienza fotosintetica

L'efficienza fotosintetica è un parametro definito attraverso la misura della fluorescenza in vivo; i risultati ottenuti sono rappresentati in Figura 2.9. Come definito in § 2.2.3.4, il rapporto  $F_v/F_m$  è un valore indicativo dell'efficienza massimale di cattura dei fotoni da parte dei centri di reazione del PSII e permette perciò di stimare lo stato di efficienza degli apparati fotosintetici di colture sottoposte a diverse intensità di luce.



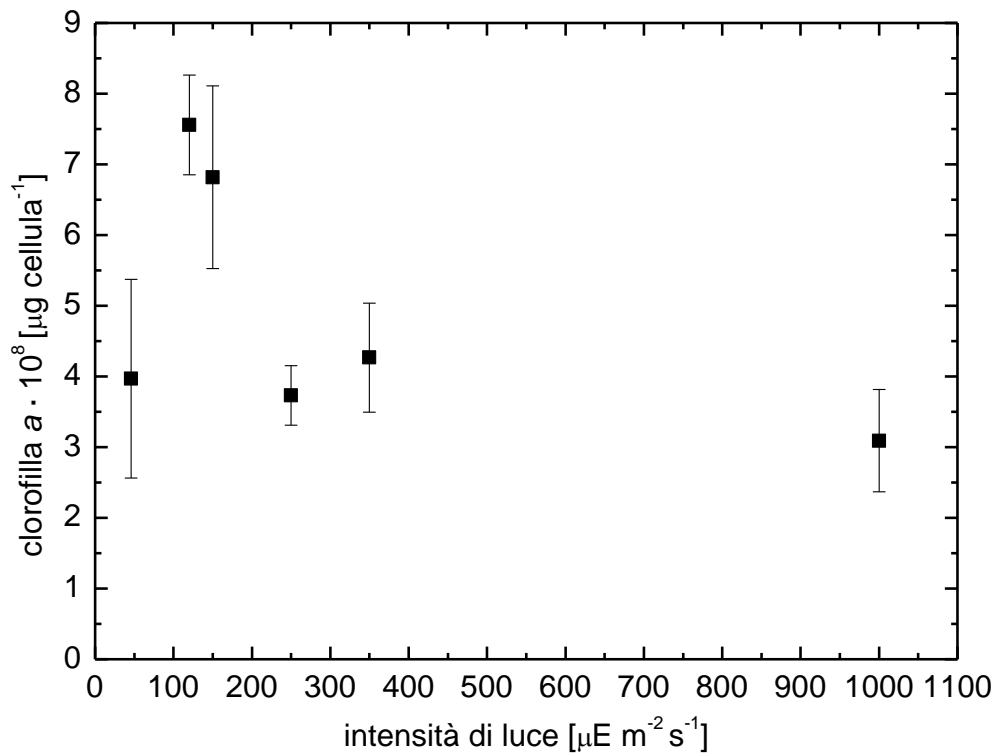
**Figura 2.9.** Efficienza degli apparati fotosintetici di colture sottoposte a diverse intensità di luce.

Nella Figura 2.9 si nota che per le colture sottoposte ad intensità di luce fino a  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  il rapporto  $F_v/F_m$  oscilla intorno a 0.6, valore che secondo gli studi di McMinn e Hegseth (2004) indica una buona efficienza degli apparati fotosintetici per *Nannochloropsis salina*; quando le colture sono sottoposte ad un'intensità di luce superiore, il rapporto  $F_v/F_m$  diminuisce e diventa 0.5, valore soglia sotto il quale le colture sono da considerarsi fotoinibite.

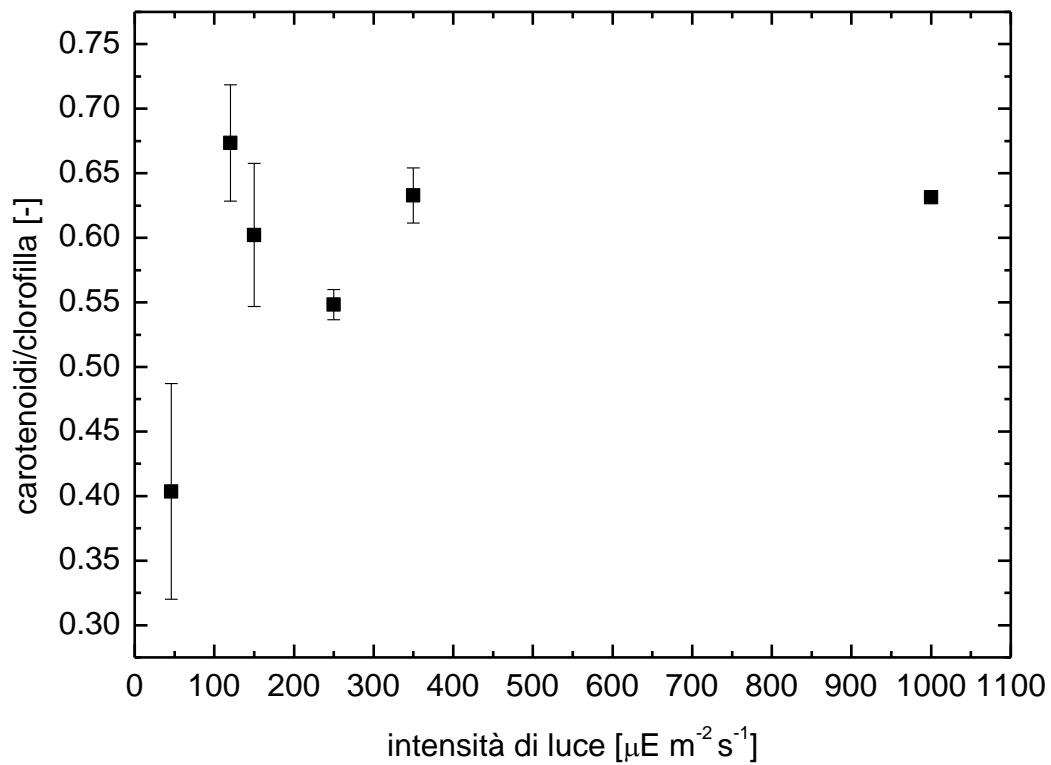
#### 2.4.1.3 Concentrazione di pigmenti

Il contenuto di pigmenti delle microalghe sottoposte alle diverse prove sperimentali è stato ottenuto con la tecnica riportata in § 2.2.3.3. I risultati ottenuti sono riportati in Figura 2.10; in particolare si presenta il contenuto di clorofilla *a* nella cellula in Figura 2.10a e il rapporto tra carotenoidi e clorofilla *a* in Figura 2.10b.





(a)



(b)

**Figura 2.10.** *Contenuto di pigmenti delle microalghe sottoposte alle diverse prove sperimentali; (a) contenuto di clorofilla a nella cellula e (b) rapporto tra carotenoidi e clorofilla a nella cellula.*

Le colture sottoposte ad intensità di luce fino a  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  presentano un contenuto di clorofilla *a* che aumenta con l'aumentare dell'intensità luminosa; per intensità di luce superiori il contenuto di clorofilla *a* diminuisce fino a raggiungere un valore medio pressoché costante pari a  $4 \cdot 10^{-8} \mu\text{g cellula}^{-1}$ . L'andamento della clorofilla *a* può essere spiegato considerando che nella regione "luce limitante" la coltura aumenta la concentrazione di clorofilla *a* per assorbire la maggior quantità possibile di fotoni, mentre nella regione "luce inibente" la concentrazione di clorofilla *a* diminuisce perché la quantità di fotoni è superiore alla capacità di assorbimento dei fotosistemi.

Per quanto riguarda invece il rapporto tra carotenoidi e clorofilla *a*, rappresentato in Figura 2.10b, esso subisce un aumento quando l'intensità di luce supera i  $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; ciò significa che, considerando che la concentrazione di clorofilla *a* rimane pressoché costante, il contenuto di carotenoidi aumenta. Il motivo per il quale la concentrazione di carotenoidi aumenta nella regione "luce inibente" è legato alla loro funzione; essi, infatti, permettono di proteggere i centri di reazione da un'eccessiva eccitazione (§1.2.3).

#### *2.4.2 Irraggiamento pulsato: variazione dell'intensità di luce impostata, della frequenza e del ciclo luce-buio*

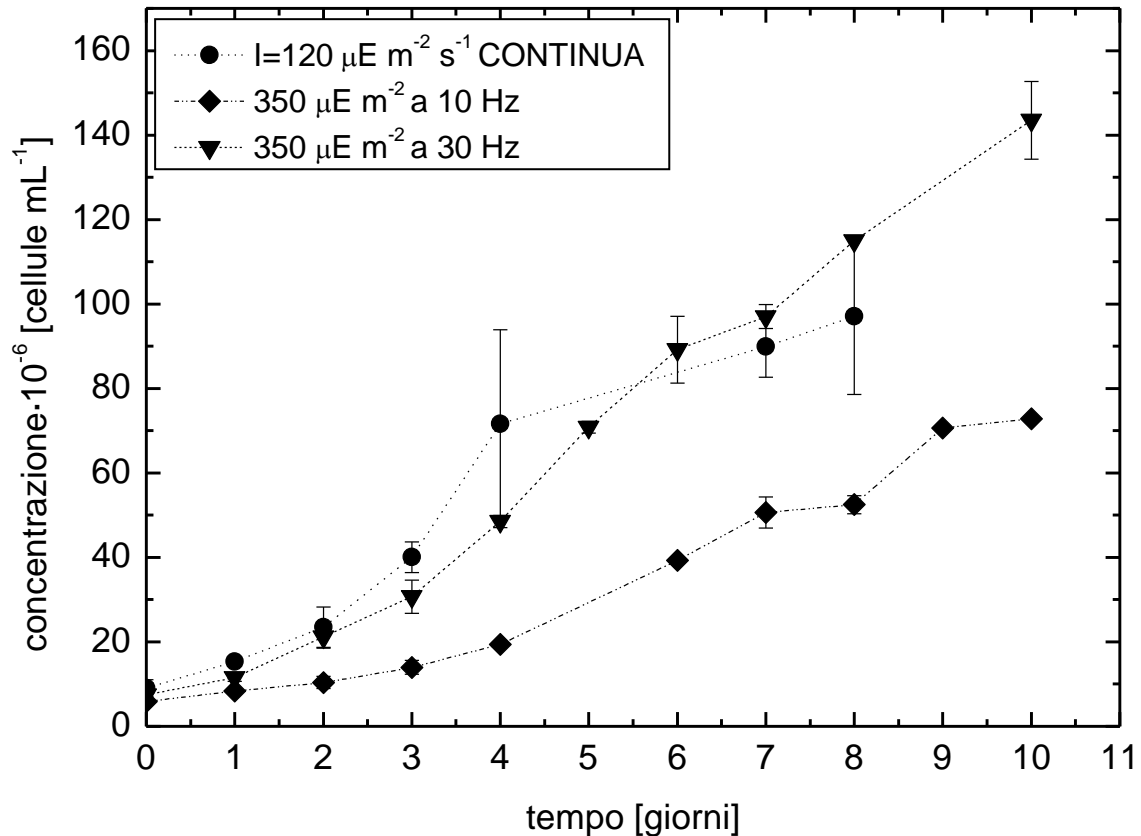
Le prove sperimentali a luce pulsata sono state effettuate per comprendere come le microalghe modificano la propria crescita in funzione della frequenza e del ciclo luce-buio; per poter ottenere risultati esaustivi sono stati svolti molteplici esperimenti. La Tabella 2.4 evidenzia che, benché negli esperimenti si impongano diverse intensità dell'impulso, si ottiene un'intensità di luce sempre pari a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (ovvero la quantità di fotoni forniti in un secondo è costante); di conseguenza i dati sono stati confrontati con quelli ottenuti per la coltivazione sottoposta ad intensità di luce continua pari a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in modo da comprendere le differenze fra luce continua e luce pulsata.

I risultati possono essere suddivisi in due gruppi:

1. dati ottenuti da due esperimenti con luce pulsata caratterizzata da un'intensità dell'impulso pari a  $350 \mu\text{E m}^{-2}$  e un rapporto luce-buio di 1:2; ciò che varia è la frequenza che viene fissata a 30 Hz e 10 Hz;
2. dati ottenuti da tre esperimenti con luce pulsata caratterizzata da un'intensità dell'impulso pari a  $1200 \mu\text{E m}^{-2}$  e un rapporto luce-buio di 1:9; ciò che varia è la frequenza che viene fissata a 10 Hz, 5 Hz e 1 Hz.

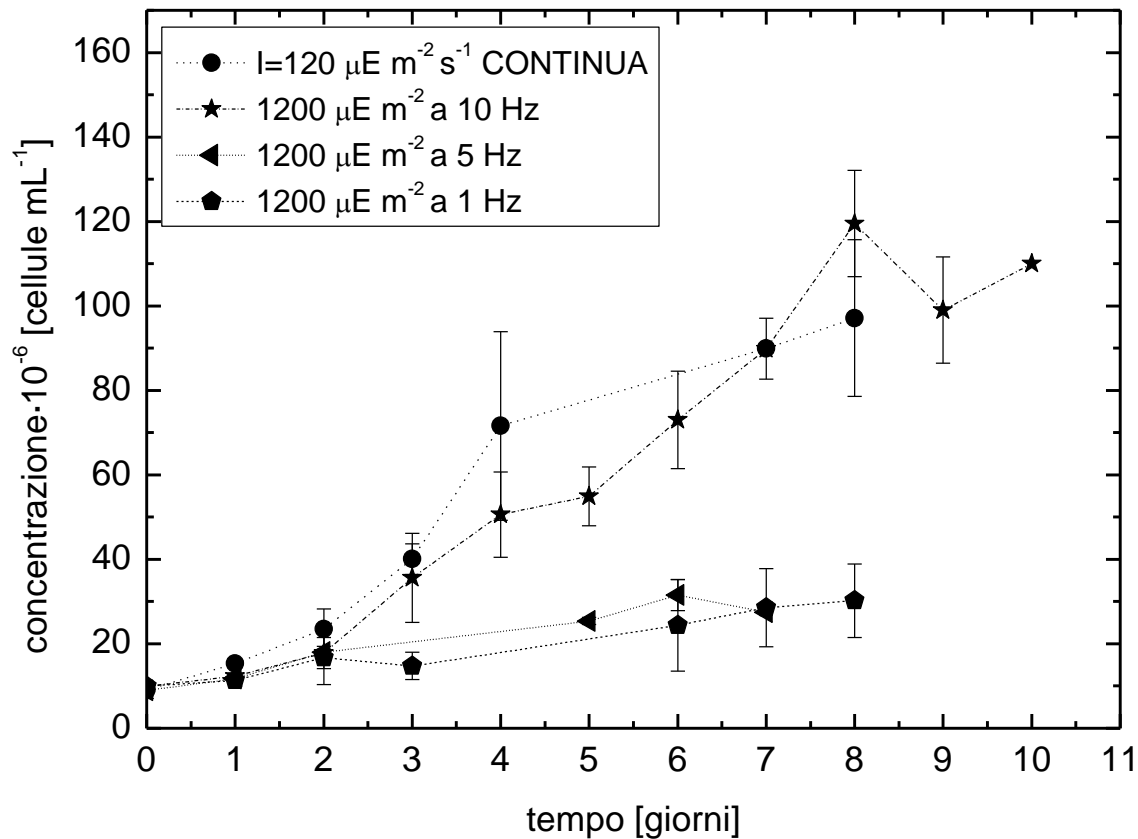
### 2.4.2.1 Curva di crescita

Le curve di crescita delle coltivazioni sottoposte al primo gruppo di prove sperimentali sono rappresentate in Figura 2.11.



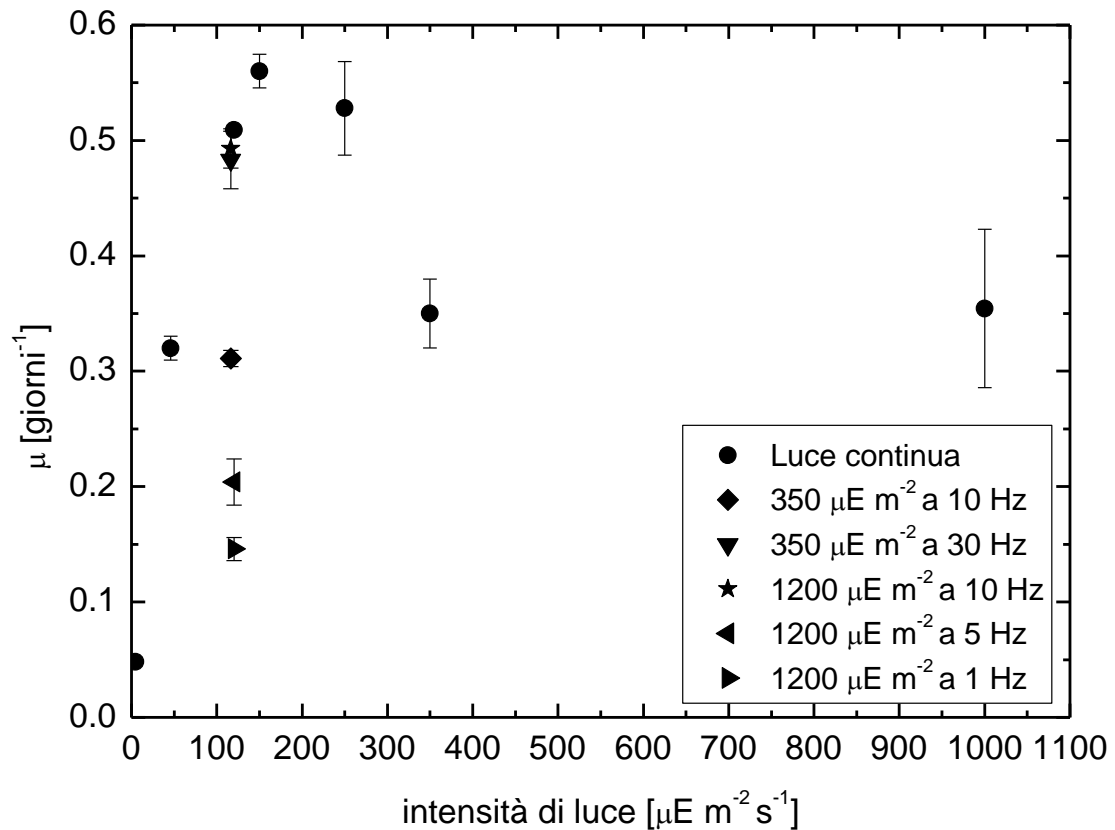
**Figura 2.11.** Confronto tra prove a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ : luce continua a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e luce pulsata con intensità dell'impulso pari a  $350 \mu\text{E m}^{-2}$  e rapporto luce-buio 1:9 (frequenza pari a 10Hz e 30 Hz).

La Figura 2.11 dimostra che a parità di intensità di luce, aumentando la frequenza (ovvero diminuendo la durata dell'impulso) si può avere un incremento della produttività microalgale fino a raggiungere quella a luce fissa; ciò significa che la durata dell'impulso, che dipende dal rapporto luce-buio e dalla frequenza, influenza la produttività. Un altro aspetto importante deriva dal confronto tra le curve di crescita a  $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pulsata di Figura 2.11 e la curva di crescita a  $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fissa di Figura 2.7b; si ha infatti che l'utilizzo di un'intensità di luce pari a  $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con un irraggiamento fisso risulta inibente, mentre se si utilizza come intensità di impulso la coltivazione cresce in modo paragonabile alle migliori condizioni determinate in §2.4.1. Le curve di crescita delle coltivazioni sottoposte al secondo gruppo di prove sperimentali sono rappresentate in Figura 2.12:



**Figura 2.12.** Confronto tra prove a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ : luce continua a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e luce pulsata con intensità dell'impulso pari a  $1200 \mu\text{E m}^{-2}$  e rapporto luce-buio 1:2 (frequenza pari a 5 Hz, 10 Hz e 30 Hz).

La Figura 2.12 conferma l'andamento ottenuto nella Figura 2.11, per il quale aumentando la frequenza della pulsazione, la durata dell'impulso diminuisce e aumenta la velocità di crescita e la concentrazione in fase stazionaria; ciò è confermato dall'andamento delle curve a 5 Hz e 1 Hz, per le quali la durata dell'impulso diventa eccessiva, le alghe sono fotoinibite e di conseguenza la crescita della biomassa si riduce. Dal confronto fra i dati ottenuti nel primo e nel secondo gruppo di prove sperimentali emerge che la crescita delle microalghe è influenzata dalla durata dell'impulso, che dipende sia dalla frequenza sia dal rapporto luce-buio; si nota che, benché la quantità di fotoni al secondo (l'intensità di luce) sia la stessa, si verifica una diminuzione della crescita all'aumentare della durata dell'impulso. La relazione tra costante di crescita e durata dell'impulso è rappresentata in Figura 2.13:



**Figura 2.13.** Confronto tra le costanti cinetiche ottenute in prove sperimentali con luce continua e pulsata.

I punti rappresentati in Figura 2.13 corrispondono ad impulsi con le seguenti durate:

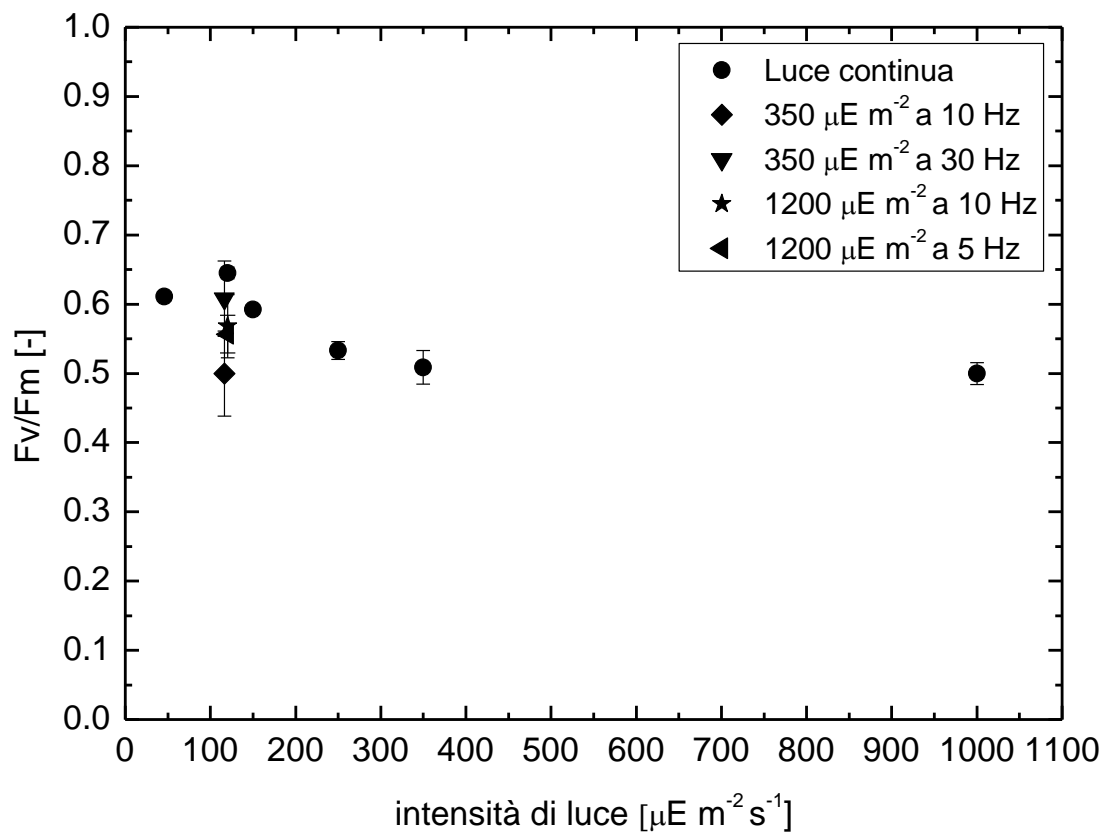
- $1200\mu\text{E m}^{-2}$ , rapporto 1:9, frequenza 10 Hz: 10 ms;
- $350\mu\text{E m}^{-2}$ , rapporto 1:2, frequenza 30 Hz: ~11 ms.
- $350\mu\text{E m}^{-2}$ , rapporto 1:2, frequenza 10 Hz: ~33 ms;
- $1200\mu\text{E m}^{-2}$ , rapporto 1:9, frequenza 5 Hz: 20 ms;
- $1200\mu\text{E m}^{-2}$ , rapporto 1:9, frequenza 1 Hz: 100 ms.

Il grafico conferma l'ipotesi per cui minore è la durata dell'impulso e maggiore è la velocità di crescita; si nota infatti che le costanti cinetiche maggiori corrispondono a  $1200\mu\text{E m}^{-2}$  a 10 Hz (rapporto 1:9) e  $350\mu\text{E m}^{-2}$  a 30 Hz (rapporto 1:2), con valori che si avvicinano al dato ottenuto per la luce continua. Ciò è dovuto al fatto che i fotosistemi sono in grado di assorbire un certo numero di fotoni in un determinato tempo, perciò, se l'intensità di irraggiamento è troppo elevata (per esempio  $1200\mu\text{E m}^{-2}$ ), ma viene inviata per un tempo sufficientemente breve (per esempio 10 ms) i fotosistemi riescono a sopportare l'irraggiamento e a sfruttare l'energia ricevuta per la crescita. Si ha però che la costante di crescita a  $350\mu\text{E m}^{-2}$  a 10 Hz (rapporto 1:2) è superiore a quella ottenuta a  $1200\mu\text{E m}^{-2}$  a 5 Hz (rapporto 1:2) benché la durata dell'impulso sia superiore; ciò avviene perché, a parità di durata dell'impulso, con un'intensità

dell'impulso pari a  $1200 \mu\text{E m}^{-2}$  la coltura risulta maggiormente fotoinibita rispetto a  $350 \mu\text{E m}^{-2}$ .

#### 2.4.2.2 Efficienza fotosintetica

L'efficienza fotosintetica è stata ottenuta mediante misure di fluorescenza in vivo; in Figura 2.14 vengono riportati i risultati delle misurazione effettuate sulle coltivazioni sottoposte a luce pulsata e vengono confrontati con i dati ottenuti nelle prove a luce fissa:



**Figura 2.14.** Confronto tra l'efficienza fotosintetica delle microalghe sottoposte a luce pulsata e quelle sottoposte a luce fissa.

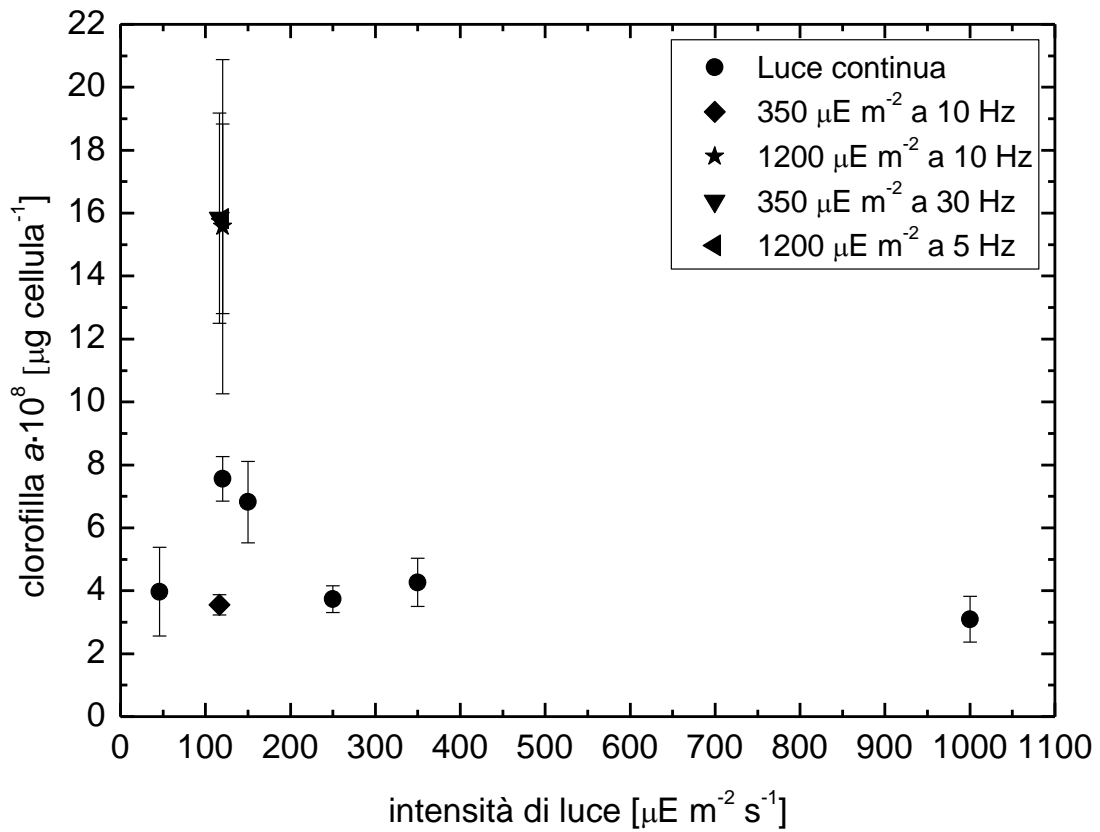
Nella Figura 2.14 si ripropone il ragionamento effettuato in precedenza: benché i valori siano simili, a parità di intensità di luce ricevuta, maggiore è la durata dell'impulso e maggiore è lo stress alla quale è sottoposta la coltura. Si ha infatti che per le prove a  $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pulsata il rapporto  $Fv/Fm$  diminuisce al diminuire della frequenza; si ottiene lo stesso risultato anche per le prove a  $1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pulsata.

#### 2.4.2.3 Concentrazione di pigmenti

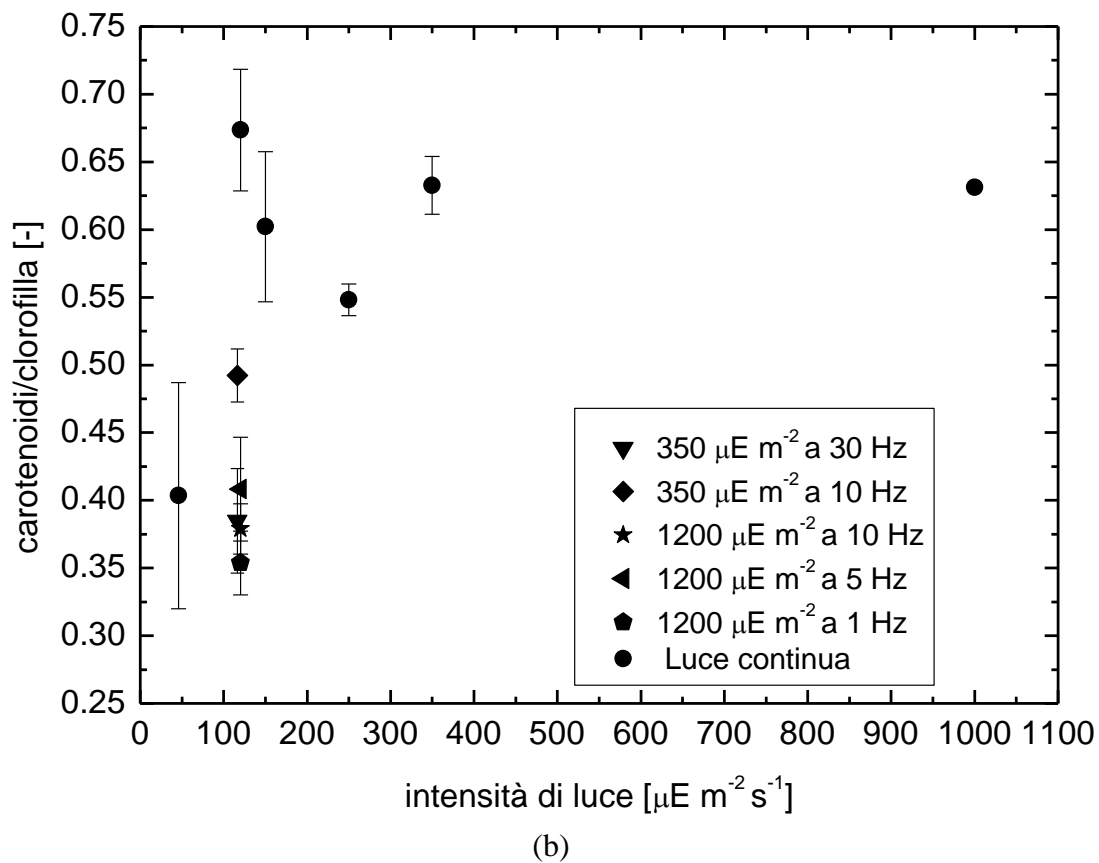
I risultati relativi al contenuto di clorofilla *a* nella cellula ed il rapporto tra carotenoidi e clorofilla *a* sono riportati in Figura 2.15a e 2.15b rispettivamente; dall'analisi di tali

curve si può individuare lo stato di fotoinibizione della coltura sottoposte a  $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pulsata a 10 Hz: il contenuto di clorofilla *a* è molto inferiori rispetto sia alle altre curve a luce pulsata, sia a quelle a luce continua; inoltre, il rapporto fra i carotenoidi e la clorofilla *a* è il più alto della serie, indice del fatto che le cellule, per non sovraccaricare i centri di reazione, hanno modificato il loro contenuto di pigmenti.

Le altre curve a luce pulsata hanno una concentrazione di clorofilla *a* molto simile tra loro, con valore circa doppio rispetto a ciò che si ottiene con per le colture sottoposte a luce continua a  $1200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; per quanto riguarda invece il contenuto di carotenoidi, anch'esso è molto simile fra le curve a luce pulsata ed è simile anche a quello a luce continua: evidentemente, queste condizioni di irraggiamento non causano particolari danni ai fotosistemi, e di conseguenza non c'è un incremento della concentrazione di carotenoidi per la fotoprotezione.



(a)



**Figura 2.15.** *Contenuto di pigmenti delle microalghe sottoposte alle diverse prove sperimentali; (a) contenuto di clorofilla a nella cellula (b) rapporto tra carotenoidi e clorofilla a.*



# Capitolo 3

## La cinetica di crescita

Nel seguente capitolo si descrivono i tre modelli utilizzati per riprodurre la cinetica di crescita delle microalghe; essi vengono presentati seguendo un ordine di completezza, ovvero partendo con il più semplice e concludendo con quello in grado di rappresentare una quantità maggiore di caratteristiche delle microalghe. Ogni modello si descrive elencando le equazioni che lo costituiscono ed approfondendo eventuali concetti teorici. Le variabili e i parametri sono definiti per ogni modello, anche quando rappresentano le stesse grandezze (e sono pertanto indicati con gli stessi simboli). Si è scelto di operare in questo modo per evitare ambiguità di interpretazione, a causa delle differenze di rappresentazione e, talvolta, anche di definizione che esistono per ciascun modello. Al termine della presentazione si effettua un confronto tra i modelli presentati elencando le principali differenze costitutive.

### 3.1 Il modello A

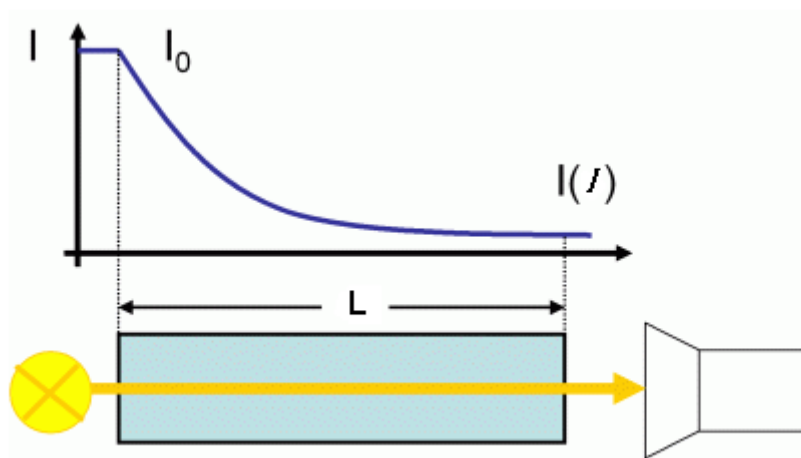
Il modello A, contrariamente agli altri modelli descritti in §3.2 e §3.3, non è stato proposto da un articolo scientifico, ma deriva dall'accoppiamento di due equazioni presenti in letteratura; una di queste descrive il comportamento della luce all'interno della soluzione microalgale, mentre l'altra descrive la crescita della coltura in un reattore semi-batch; il modello non descrive la dipendenza da nutrienti e processi quali la fotoacclimatazione e la fotoinibizione.

#### 3.1.1 Distribuzione della luce

La distribuzione spaziale dell'intensità di luce all'interno del fotobioreattore è principalmente influenzata dall'attenuazione di luce dovuta all'ombreggiamento reciproco delle cellule, dall'assorbimento dei pigmenti e dallo scattering generato dalle microalghe stesse. Nel corso degli anni, come accennato in §1.4, sono stati sviluppati numerosi modelli che calcolano il gradiente di luce tenendo in considerazione gli aspetti appena elencati; il compito di tali modelli è di rappresentare ciò che avviene sperimentalmente, ovvero all'aumentare della profondità del reattore (partendo dalla superficie in cui incide la luce), la velocità di crescita delle microalghe diminuisce

esponenzialmente fino a raggiungere una concentrazione limite, oltre la quale la crescita avviene in modo lineare. Tale aspetto si spiega considerando che a concentrazioni pari o superiori a quella critica, una parte del volume totale presenta un'intensità di luce nulla; il rallentamento della velocità di crescita non è perciò conseguenza della diminuzione dell'efficienza del processo, bensì corrisponde ad un'incapacità da parte dell'attività fotosintetica di soddisfare il bisogno di energia per la respirazione (Clemens, 2009).

Il sistema che si vuole rappresentare è caratterizzato da una soluzione diluita e perciò, non raggiungendo la concentrazione critica, si assume che l'intensità di luce diminuisca esponenzialmente. Tale andamento può essere perciò descritto dalla legge di Lambert-Beer, rappresentata graficamente nella Figura 3.1.



**Figura 3.1.** Rappresentazione grafica della legge di Lambert Beer; l'intensità di luce diminuisce in modo esponenziale attraverso il materiale ([http://www.doas-bremen.de/doas\\_tutorial.htm](http://www.doas-bremen.de/doas_tutorial.htm)).

Tale equazione correla l'assorbimento della luce alle proprietà del materiale che essa attraversa; in particolare si stabilisce che ci sia una dipendenza logaritmica tra la trasmittanza di luce  $T$  attraverso un materiale (rapporto tra la luce trasmessa e la luce incidente) e il prodotto del coefficiente di assorbimento della sostanza  $\alpha$  e la distanza che la luce deve percorrere nel materiale  $L$ .

Per le soluzioni si ha perciò:

$$T = \frac{I(l)}{I_0} = \exp(-\alpha \cdot c_x \cdot l), \quad (3.1)$$

da cui si ottiene:

$$I(l) = I_0 \cdot \exp(-\alpha \cdot c_x \cdot l), \quad (3.2)$$

dove:

- $T$  : trasmittanza [-];
- $I(l)$ : intensità di luce alla profondità  $l$  [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ];
- $I_0$ : intensità di luce incidente sulla superficie del fotobioreattore [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ];
- $\alpha$  : coefficiente di assorbimento [ $\text{m}^2 \text{g}_{\text{bio}}^{-1}$ ];
- $c_x$  : concentrazione di biomassa nella soluzione espressa in peso secco [ $\text{g}_{\text{bio}} \text{L}^{-1}$ ];
- $l$ : profondità del fotobioreattore rispetto alla superficie su cui incide la luce [m].

Il coefficiente di assorbimento  $\alpha$  è un parametro tipico di ogni sostanza, strettamente legato alla lunghezza d'onda della luce incidente; esso caratterizza la facilità di un materiale o mezzo ad essere penetrato da un fascio di luce; minore è tale valore e più il mezzo in questione risulta trasparente.

Spesso si utilizzano indifferentemente i termini “coefficiente di assorbimento” e “coefficiente di attenuazione”, ma in alcuni casi essi non hanno lo stesso significato; quando un fascio di luce stretto (collimato) attraversa una sostanza, l'intensità di luce diminuisce per due processi: la luce può essere assorbita dalla sostanza oppure può essere dispersa (*scattering*). Se all'estremità in cui esce il fascio trasmesso si pone un rivelatore configurato per misurare la luce dispersa in diverse direzioni, è possibile capire quanta luce è stata assorbita e quanta è stata trasmessa. Per definizione il “coefficiente di assorbimento” considera solo quanta luce è stata assorbita dal mezzo, mentre il “coefficiente di attenuazione” definisce la perdita totale di luce; si ha perciò che il “coefficiente di attenuazione” è sempre maggiore o uguale al “coefficiente di assorbimento”.

Secondo lo studio di Cornet *et al.* (1995), nel caso di reattori piatti (*flat reactor*) ovvero caratterizzati da profondità limitate, si può assumere che la luce all'interno del reattore diminuisca in modo esponenziale, trascurando il mutuo ombreggiamento delle cellule e lo scattering; di conseguenza, considerando che il sistema che si vuole rappresentare è un fotobioreattore piatto, si assume che il coefficiente di attenuazione corrisponda al coefficiente di assorbimento.

Il modello A prevede un'altra semplificazione dovuta all'elevato grado di diluizione del fotobioreattore: si può considerare un'unica intensità di luce media volumetrica anziché dover discretizzare il sistema lungo la profondità  $l$  per descrivere in modo più dettagliato l'andamento dell'intensità di luce nella soluzione microalgale. Il calcolo dell'intensità di luce media avviene attraverso l'integrazione della legge di Lambert-Beer lungo  $l$ :

$$\bar{I} = \int_0^L I_0 \cdot \exp(-\alpha \cdot c_x \cdot l) dl = I_0 \frac{1 - \exp(-\alpha \cdot c_x \cdot L)}{\alpha \cdot c_x \cdot L}, \quad (3.3)$$

dove:

- $\bar{I}$  : intensità di luce media da 0 a  $L$  [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ];
- $L$  : profondità del reattore [m].

### 3.1.2 Cinetica di crescita

La cinetica di crescita delle microalghe è descritta dalla relazione di Monod, definita nel seguente modo:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left( \frac{\bar{I}}{\bar{I} + K_I} \right), \quad (3.4)$$

dove:

- $\mu$  : velocità di crescita [ $\text{h}^{-1}$ ];
- $\mu_{\max}$  : velocità massima di crescita [ $\text{h}^{-1}$ ];
- $K_I$  : costante di saturazione, definita come l'intensità di luce richiesta per raggiungere metà della massima velocità di crescita [ $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ].

L'equazione 3.4 esprime la relazione tra l'intensità di luce media e la velocità di crescita: un incremento dell'intensità di luce media corrisponde ad un aumento della velocità di crescita fino a raggiungere il massimo valore  $\mu_{\max}$ , situazione in cui la luce non è più limitante per la crescita delle microalghe; al contrario, una riduzione dell'intensità di luce media comporta una diminuzione della velocità di crescita fino ad annullarsi quando il sistema si trova al buio.

L'interpretazione appena effettuata porta a concludere che non è possibile rappresentare la fase stazionaria in cui la velocità di crescita si annulla, tranne nel caso in cui  $I_0$  sia pari a zero; ciò accade perché la variabile  $\bar{I}$  è definita come l'integrale dell'intensità di luce lungo la profondità del reattore (equazione 3.3) e pertanto, se  $I_0$  non è nulla,  $\bar{I}$  risulta sempre maggiore di zero. Dato che lo scopo dello studio consiste nel creare un modello capace di rappresentare le microalghe in funzione dell'intensità di luce anche nel caso in cui essa non sia sufficiente e la coltura entra nella fase stazionaria, risulta necessario moltiplicare l'equazione (3.4) per un'altra relazione:

$$\left( 1 - \frac{c_x}{C_1 \cdot I_0} \right)^{C_2}, \quad (3.5)$$

dove:

- $C_1$  : costante 1 [ $\text{m}^2 \text{s g}_{\text{bio}} \mu\text{E}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ];
- $C_2$  : costante 2 [-].

L'espressione appena definita è stata sviluppata adattando l'equazione di Riccati, frequentemente utilizzata nella descrizione di sistemi biologici (Bailey e Ollis, 1986):

$$\frac{dx}{dt} = k \cdot x \cdot (1 - \beta \cdot x), \quad (3.6)$$

dove:

- $x$ : concentrazione di biomassa [ $\text{g}_{\text{bio}} \text{L}^{-1}$ ];
- $k$ : velocità massima di crescita [ $\text{h}^{-1}$ ];
- $\beta$ : costante di inibizione [ $\text{L g}_{\text{bio}}^{-1}$ ].

Con l'equazione (3.6) si ottiene una concentrazione in fase stazionaria indipendente dall'intensità di luce perché  $\beta$  non dipende da quest'ultima; tuttavia, nel sistema che si vuole rappresentare, un incremento dell'intensità di luce comporta un aumento della concentrazione quando la coltura entra in regime stazionario; ciò è visibile nel grafico di Figura 2.7.

Per eliminare tale limite, nell'equazione (3.4) si definisce  $\beta$  come il reciproco del rapporto tra  $I_0$  e  $C_1$ ; in questo modo quando  $c_x$  uguaglia  $C_1 \cdot I_0$  l'espressione si annulla, e ciò varia in funzione di  $I_0$ .

La seconda costante  $C_2$  è stata invece introdotta per rendere più sensibile il modello alla fase stazionaria.

La cinetica appena descritta viene applicata al bilancio di materia della biomassa, portando alla seguente relazione finale:

$$\frac{dc_x}{dt} = \mu_{\text{max}} \cdot c_x \cdot \left( \frac{\bar{I}}{\bar{I} + K_I} \right) \cdot \left( 1 - \frac{c_x}{C_1 \cdot I_0} \right)^{C_2}. \quad (3.7)$$

### 3.2 Il modello B (Quinn *et al.*, 2011)

Il modello B presentato nell'articolo di Quinn *et al.* (2011), rappresenta la crescita delle colture microalgali basandosi su parametri ed equazioni che regolano i fattori che maggiormente influiscono nella cinetica di crescita e nell'accumulo dei lipidi delle microalghe. Tale modello è stato validato utilizzando dati sperimentali di *Nannochloropsis oculata* coltivata in fotobioreattori esterni della Solix (società che opera con la Colorado State University per produrre il biodiesel da alghe).

I fattori principali che influiscono sulla produttività delle alghe sono: l'intensità di luce, la velocità di fotosintesi, la velocità di respirazione, la velocità di crescita, la temperatura, la disponibilità di nutrienti e la produzione di lipidi. Per descrivere come tali fattori influenzano la crescita delle microalghe, il modello è costituito da cinque

sottosistemi, ognuno dei quali composto da una o più equazioni; il modello prevede che vengano dati in ingresso l'intensità di luce e la temperatura mentre fornisce in uscita la crescita della biomassa e l'accumulo di lipidi. Nei paragrafi successivi vengono elencate e descritte le equazioni che costituiscono ogni sottosistema, con l'eccezione della fase dell'accumulo di lipidi, non considerata nel lavoro di Tesi.

### 3.2.1 Distribuzione della luce

Nel modello B, la distribuzione spaziale della luce viene rappresentata come nel modello A, ovvero si assume che la concentrazione di microalghe sia abbastanza bassa da applicare la legge di Lambert-Beer e ottenere una diminuzione esponenzialmente dell'intensità di luce all'aumentare della profondità; inoltre, come definito nell'Equazione (3.3), si utilizza come variabile la media volumetrica calcolata considerando l'intensità di luce sulla superficie del fotobioreattore.

Il modello assume che le microalghe siano già fotoacclimatate all'intensità di luce media e che, date le basse concentrazioni, il mixing non influenzi in modo considerevole la crescita delle microalghe in termini di cicli luce-buio.

#### 3.1.1.1 Approfondimento sull'uso della legge di Lambert-Beer

Nel materiale integrativo associato all'articolo di Quinn *et al.* (2011), è presente un approfondimento per quanto riguarda l'utilizzo della legge di Lambert-Beer. In esso viene evidenziato che la complessità di modellazione della distribuzione spaziale dell'intensità di luce cresce all'aumentare della concentrazione delle microalghe perché aumenta la dispersione della luce (*scattering*).

Nel corso degli anni sono stati definiti numerosi modelli per rappresentare la distribuzione della luce all'interno della soluzione microalgale e, ognuno di questi, considera in modo diverso l'influenza della dispersione. La maggior parte di tali modelli integra o utilizza direttamente la legge di Lambert-Beer; la letteratura concorda sul fatto che le assunzioni su cui si basa tale legge non siano valide quando la concentrazione delle microalghe è molto alta ma non c'è concordanza su cosa significhi "concentrazione molto alta". Fernández *et al.* (1997) hanno proposto un modello iperbolico sperimentale che considera sia l'assorbimento sia la dispersione; dal confronto tra tale lavoro ed i risultati ottenuti dall'applicazione del modello di Lambert-Beer (solo assorbimento) e del modello proposto da Cornet *et al.* (1992) (sia assorbimento sia dispersione) è emerso che i tre modelli non esibiscono differenze particolarmente significative nella rappresentazione di come varia l'intensità di luce all'interno del reattore.

### 3.2.2 Velocità di fotosintesi

Nel modello B, il calcolo della crescita della biomassa si basa sul bilancio di energia, in cui si confronta l'energia assorbita attraverso la fotosintesi con l'energia richiesta per la respirazione e per l'assorbimento dei nutrienti.

La fotosintesi, come descritto in §1.2.3, si compone di una serie di reazioni che prevedono, in progressione, l'assorbimento di luce, l'immagazzinamento di energia attraverso la formazione di NADPH e ATP come composti intermedi e, infine, la fissazione del carbonio nel ciclo di Calvin. Per descrivere la fotosintesi si introduce la "velocità di fissazione del carbonio", è definita nel seguente modo:

$$P_C = P_{C\_calc} \cdot \left[ 1 - \exp\left(\frac{-\alpha \cdot \phi_m \cdot \bar{I}}{P_{C\_calc}}\right) \right], \quad (3.8)$$

dove:

- $P_C$ : velocità di fissazione del carbonio [ $\text{h}^{-1}$ ];
- $\alpha$ : coefficiente di assorbimento [ $\text{m}^2 \text{g}_{\text{bio}}^{-1}$ ];
- $\phi_m$ : efficienza relativa all'assorbimento dei fotoni [ $\text{g}_{\text{bio}} \mu\text{mol}^{-1}$ ];
- $\bar{I}$ : intensità di luce media [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ].

L'equazione (3.8) è stata formulata in modo da rappresentare solo le prime due regioni della curva  $P/I$ , visibili nella Figura 1.9 nel §1.2.3; ciò significa che il modello B non considera la fotoinibizione, assumendo che si operi sempre in condizioni di intensità di luce inferiori a quella critica.

La variabile  $P_{C\_calc}$ , presente nell'equazione (3.8), rappresenta la massima velocità di fissazione del carbonio ottenibile nelle condizioni del sistema, essa infatti è definita nel modo seguente:

$$P_{C\_calc} = P_{C\_max} \cdot \phi_T \cdot \phi_{qN_{\text{int}}}, \quad (3.9)$$

dove:

- $P_{C\_max}$ : velocità massima di fissazione del carbonio [ $\text{h}^{-1}$ ];
- $\phi_T$ : efficienza relativa alla temperatura [-];
- $\phi_{qN_{\text{int}}}$ : efficienza relativa all'azoto intercellulare [-].

L'equazione (3.9) evidenzia il fatto che la fotosintesi dipende da due importanti fattori: la temperatura del sistema e l'azoto intercellulare; per quanto riguarda la temperatura si ha che una variazione di questa rispetto alla temperatura ottimale comporta la diminuzione della velocità di fotosintesi perché, come definito nel §3.2.5, la temperatura influenza l'attività del ribulosio-bisfosfato carbossilasi (rubisco). Per

quanto riguarda invece l'azoto intercellulare, la velocità di fotosintesi diminuisce in corrispondenza alla riduzione di esso; ciò è conseguenza del fatto che, come definito nel §3.2.6., i componenti dell'apparato fotosintetico della cellula contengono una grande parte dell'azoto totale, perciò la mancanza di azoto comporta una riduzione degli apparati fotosintetici e, di conseguenza, una diminuzione della velocità massima di fotosintesi.

La variabile  $P_{C\_max}$ , presente nell'equazione (3.9), è la velocità massima di fissazione del carbonio; essa è legata alla velocità massima di crescita della coltura microalgale  $\mu_{max}$  [ $h^{-1}$ ] e può essere calcolata combinando le equazioni (3.13), (3.21) e (3.22). Si ottiene così la seguente equazione:

$$P_{C\_max} = \frac{\mu_{max} + R_C}{1 - \zeta \cdot qN_{max}} \quad (3.10)$$

dove:

- $R_C$ : velocità di respirazione [ $h^{-1}$ ];
- $qN_{max}$ : quota massima di azoto nella cellula [ $g_N g_C^{-1}$ ].

La variabile  $\zeta$  [ $g_{bio} g_N^{-1}$ ] rappresenta l'efficienza fotosintetica; essa considera l'energia richiesta per la riduzione da nitrato ad ammonio, l'incorporazione dell'ammonio negli amminoacidi e la polimerizzazione degli amminoacidi in proteine.

Per quanto riguarda invece la variabile  $\phi_m$ , presente nell'equazione (3.8), essa rappresenta l'efficienza con la quale il sistema assorbe i fotoni provenienti dalla sorgente luminosa; l'equazione che definisce tale variabile è dedotta dalla seguente identità che si ipotizza valida:

$$E_k \cdot \alpha \cdot \phi_m = P_{C\_max}, \quad (3.11)$$

da cui si ottiene:

$$\phi_m = \frac{P_{C\_max}}{E_k \cdot \alpha}, \quad (3.12)$$

dove la variabile  $E_k$  [ $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ ] è definita come intensità di luce di saturazione. Nel caso in cui  $\phi_m$  fosse massima, secondo lo schema Z di Hill-Bendall (è il tragitto, a forma di Z, che gli elettroni percorrono durante la fase luminosa della fotosintesi spostandosi in funzione del potenziale ossidoriducete del sistema in cui si trovano) per produrre una mole di  $CH_2O$  sarebbero necessari otto fotoni; nella realtà, in cui il sistema non è ideale ( $\phi_m$  è minore del limite teorico), per formare la stessa quantità di  $CH_2O$  è



necessaria una quantità di fotoni maggiore, in parte utilizzati per la fotorespirazione (processo metabolico respirativo che le piante con ciclo di Calvin attuano alla luce, e continuano per un breve periodo anche al buio, per eliminare l'ossigeno in eccesso) ed in parte persi.

### 3.2.3 Velocità di respirazione

La respirazione è sostanzialmente la funzione inversa della fotosintesi: questa, infatti, si basa sul consumo di ossigeno e produce anidride carbonica; in altri termini, mentre la fotosintesi trasforma l'energia luminosa in energia chimica con la formazione di glucidi, la respirazione libera l'energia contenuta in questi ultimi, mettendola a disposizione delle attività vitali dell'organismo.

Il modello B incorpora nella respirazione anche i costi metabolici di biosintesi e i costi di mantenimento cellulare, facendo eccezione per i costi metabolici di riduzione da nitrato ad ammonio e l'incorporazione dell'ammonio nella biomassa, che vengono invece definiti in funzione dell'assorbimento dell'azoto attraverso l'efficienza biosintetica. Secondo i risultati di alcune ricerche (Geider e Osborne, 1991), la velocità di respirazione nella notte è uguale alla velocità di respirazione durante il giorno, ovvero essa non è né stimolata né inibita dalla crescita; per questo motivo il modello definisce la velocità di respirazione  $R_C$  costante. Dagli stessi risultati si deduce anche che la velocità di respirazione può essere considerata una percentuale della velocità specifica massima di carbonio.

La velocità di respirazione osservata nelle colture corrisponde alla combinazione della respirazione batterica e cellulare; il modello B assume quindi che la quantità di batteri sia insignificante.

### 3.2.4 Velocità di crescita

Nel modello B, contrariamente al modello A, la crescita delle microalghe viene rappresentata in termini di carbonio contenuto nelle cellule anziché di concentrazione della biomassa (espressa in termini di peso secco); la velocità di crescita del carbonio è definita in funzione della velocità di fissazione del carbonio, della velocità di respirazione e della velocità di assorbimento dell'azoto. Il bilancio di materia del carbonio in un reattore semi-batch è il seguente:

$$\frac{1}{c_C} \cdot \frac{dc_C}{dt} = \mu = P_C - R_C - \zeta \cdot rN, \quad (3.13)$$

dove:

- $c_C$ : concentrazione del carbonio intracellulare [ $\text{g}_C \text{L}^{-1}$ ];
- $t$ : tempo [h];
- $\mu$ : velocità di crescita [ $\text{h}^{-1}$ ];
- $rN$ : velocità di assorbimento dell'azoto [ $\text{h}^{-1}$ ].

Il peso secco della biomassa può essere calcolato parallelamente all'equazione (3.13) considerando l'ipotesi per cui la biomassa sia composta dal 50% di carbonio; di conseguenza la concentrazione di biomassa in termini di peso secco è:

$$c_x = 2 \cdot c_C. \quad (3.14)$$

### 3.2.5 Dipendenza dalla temperatura

Nel modello B la dipendenza della fotosintesi dalla temperatura è descritta dall'effetto che essa ha sull'attività del rubisco; ciò diventa particolarmente significativo quanto si considerano coltivazioni esterne sottoposte ai cambiamenti stagionali perché la temperatura diventa la variabile ambientale che influenza maggiormente la crescita delle microalghe. Il modello assume che la temperatura varia solo la velocità di fotosintesi nella regione di saturazione mentre rimane costante la pendenza iniziale della curva  $P/I$ . Il modello assume inoltre che la temperatura influenzi in modo uguale il processo di fotosintesi e di respirazione.

La dipendenza dalla temperatura viene rappresentata inserendo il modello di Alexandrov and Yamagata (2007):

$$\phi_T = \frac{2 \cdot T}{1 + f^2(T)} \quad (3.15)$$

$$f(T) = \exp\left(\frac{E_a}{R \cdot T_{opt}} - \frac{E_a}{R \cdot T}\right), \quad (3.16)$$

dove:

- $T$ : temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ];
- $E_a$ : energia di attivazione del rubisco [ $\text{J mol}^{-1}$ ];
- $R$ : costante dei gas ideali [ $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ];
- $T_{opt}$ : temperatura in cui la velocità di crescita delle microalghe è massima [ $^{\circ}\text{C}$ ].

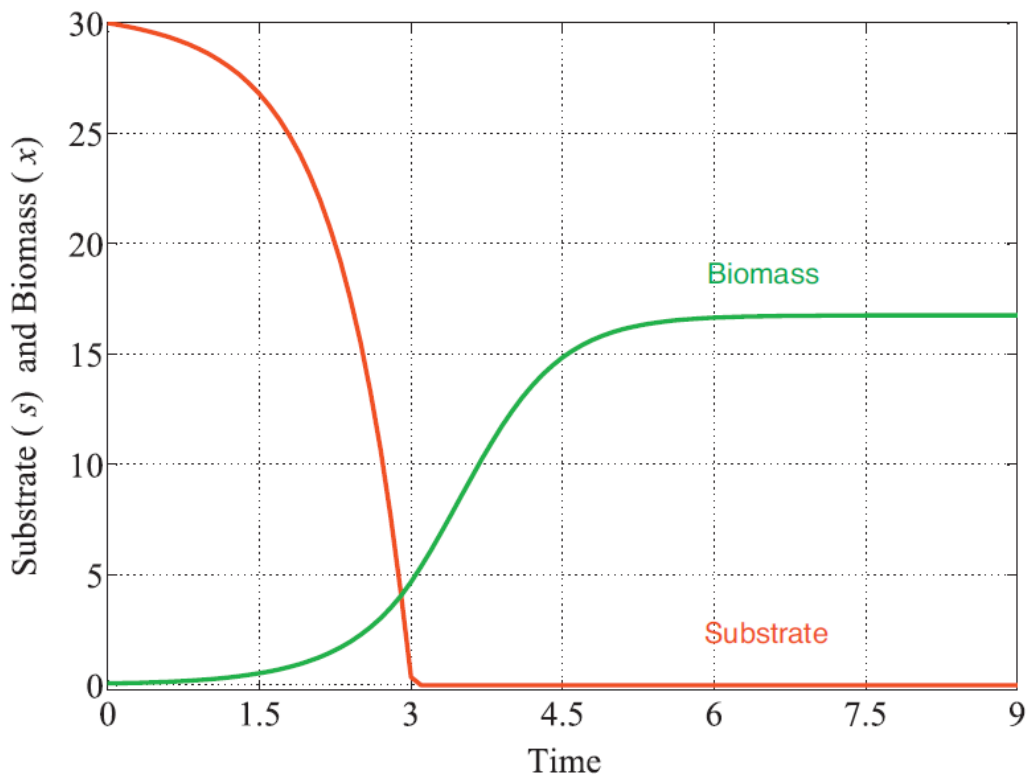
L'efficienza relativa alla temperatura  $\phi_T$  è un numero adimensionale compreso tra zero e uno; quando la temperatura del sistema uguaglia la temperatura ottimale l'efficienza risulta pari a uno, negli altri casi essa risulta  $0 < \phi_T < 1$ .

### 3.2.6 Dipendenza dall'azoto

Nel modello B si assume che la crescita delle microalghe sia limitata dalla disponibilità dell'azoto e non dal fosforo; in particolare il modello incorpora una rappresentazione della dipendenza da azoto per calcolare in modo preciso la crescita delle microalghe e l'accumulo di lipidi.

I componenti dell'apparato fotosintetico della cellula (compreso il rubisco) contengono una grande parte dell'azoto totale, perciò la mancanza di azoto comporta una riduzione degli apparati fotosintetici e, di conseguenza, una diminuzione della velocità massima di fotosintesi. Nel modello di Geider *et al.* (1997), si assume che la mancanza di azoto influisca sulla velocità di crescita agendo direttamente sulla velocità di fissazione del carbonio a luce saturante; in particolare si moltiplica la velocità massima di fissazione del carbonio  $P_{C\_max}$  per un'efficienza rappresentativa nella disponibilità di azoto nel sistema  $\phi_{qN_{int}}$  calcolata applicando il modello di Droop (1983).

In generale, in un sistema di coltivazione semi-batch, il tipico andamento delle curve di concentrazione di biomassa e concentrazione di substrato è rappresentato nella Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Rappresentazione dell'andamento tipico delle curve di concentrazione di biomassa (linea verde) e concentrazione di substrato (linea rossa) in funzione del tempo in un reattore semi-batch; è evidente come la biomassa continua a crescere per alcuni giorni dopo l'esaurimento dei nutrienti (Bernard, 2011).

Le microalghe si adattano alla quantità di nutrienti disponibili nell'ambiente attraverso modifiche strutturali, accumulo e migliorando la propria efficienza di utilizzo delle risorse; inoltre, ciò che si deduce dall'analisi del grafico in Figura 3.2, è che la biomassa continua a crescere anche in seguito al consumo totale del substrato; ciò implica che i modelli in cui la crescita delle microalghe è legata solamente alla concentrazione del nutriente presente nella soluzione non possono essere considerati rappresentativi del reale comportamento delle coltivazioni. Infatti, i primi modelli rappresentativi della dipendenza delle microalghe dai nutrienti consideravano solamente la concentrazione di substrato nella soluzione, ma questa teoria è stata modificata in seguito ad osservazioni sperimentali dalle quali si conclude che l'assorbimento di nutrienti dipende maggiormente dalla quantità di substrato contenuta all'interno della cellula rispetto alla concentrazione del nutriente nella soluzione esterna. Le microalghe, infatti, sono capaci di modificare l'assorbimento di nutrienti in funzione della quantità di sostanza contenuta all'interno della cellula. Tali conclusioni hanno portato alla formulazione del modello di Droop (1968), nella quale viene definito un modello per rappresentare come la quantità di vitamina B12 contenuta nel fitoplancton influisce nella crescita di questo; successivamente, nel lavoro di Droop (1983), è stato dimostrato che tale modello è applicabile anche per rappresentare come la crescita delle colture dipende dal contenuto interno di macronutrienti come azoto e fosforo.

La quantità di substrato interno alla cellula viene rappresentato da una grandezza detta quota cellulare definita nel seguente modo:

$$qS = \frac{c_{S \text{ interno}}}{c_C}, \quad (3.17)$$

dove:

- $qS$  : quota cellulare di substrato S [ $\text{g}_S \text{g}_C^{-1}$ ];
- $c_{S \text{ interno}}$  : concentrazione di substrato interno alla cellula [ $\text{g}_S \text{L}^{-1}$ ].

La quota cellulare di substrato  $qS$  può essere sperimentalmente misurata e varia nel tempo; i valori limite associati alla variabile  $qS$  sono  $qS_{\min}$  e  $qS_{\max}$ ; il primo corrisponde alla quota minima di substrato al di sotto della quale la cellula muore, mentre il secondo corrisponde alla massima frazione di substrato che la cellula può contenere.

Nel Modello B si introduce la teoria di Droop per rappresentare la dipendenza da azoto assumendo che la velocità di crescita sia legata al contenuto di azoto interno alle cellule; in particolare la velocità di crescita viene definita mediante l'introduzione dell'efficienza relativa all'azoto intercellulare:

$$\phi_{qN_{int}} = 1 - \frac{qN_{min}}{qN} \quad (3.18)$$

$$\mu = \mu_{max} \cdot \phi_{qN_{int}}, \quad (3.19)$$

dove:

- $qN_{min}$  : quota minima di azoto che permette la crescita delle microalghe [ $g_N g_C^{-1}$ ];
- $qN$  : quota di azoto [ $g_N g_C^{-1}$ ].

Oltre all'efficienza relativa all'azoto intracellulare è possibile definire un'efficienza relativa alla velocità di assorbimento dell'azoto; quest'ultima è definita considerando che la concentrazione di azoto nella soluzione vari seguendo la cinetica di Michaelis-Menten.

La cinetica di Michaelis-Menten descrive l'andamento della velocità di una reazione al variare della concentrazione di substrato; questo modello fu proposto nel 1913 per enzimi allosterici ma è stato successivamente utilizzato per altri sistemi che si comportano allo stesso modo, per esempio per descrivere l'assorbimento di azoto da parte delle microalghe.

Secondo questo approccio, l'efficienza relativa alla velocità di assorbimento dell'azoto è definita nel seguente modo:

$$\phi_{qN_{ext}} = \frac{cN_{medium}}{cN_{medium} + K_N}, \quad (3.20)$$

dove:

- $\phi_{qN_{ext}}$  : efficienza relativa alla velocità di assorbimento dell'azoto [-];
- $cN_{medium}$  : concentrazione di azoto nella soluzione, intracellulare [ $g_N L^{-1}$ ];
- $K_N$  : costante di Michaelis-Menten per l'assorbimento di azoto [ $g_N L^{-1}$ ].

Dall'analisi delle equazioni (3.18) e (3.20) è evidente che quando la concentrazione di azoto intercellulare è bassa e la concentrazione intracellulare è alta le efficienze relative all'azoto sono basse e si ha un assorbimento lento. La velocità di assorbimento calcolata  $rN_{calc}$  [ $h^{-1}$ ] si ottiene moltiplicando la massima velocità di assorbimento per le due efficienze appena descritte e per quella legata alla temperatura:

$$rN_{calc} = rN_{max} \cdot \phi_{qN_{int}} \cdot \phi_{qN_{ext}} \cdot \phi_T, \quad (3.21)$$

La variabile  $rN_{max}$  [ $h^{-1}$ ] è la velocità di assorbimento dell'azoto massima; essa è funzione della velocità massima di fissazione del carbonio  $P_{C_{max}}$  espressa in [ $g_N g_C h^{-1}$ ], ovvero:

$$rN_{\max} = P_{C_{\max}} \cdot qN_{\max} \quad (3.22)$$

La velocità di assorbimento dell'azoto è calcolata nel seguente modo:

$$\frac{1}{qN} \cdot \frac{dqN}{dt} = rN = \frac{rN_{calc}}{qN} - rR_N, \quad (3.23)$$

da cui si ottiene come varia la quota cellulare di azoto nel tempo:

$$qN = qN_0 \cdot \exp(rN \cdot t), \quad (3.24)$$

dove  $rR_N$  è la costante di respirazione per l'azoto [ $\text{h}^{-1}$ ].

La quantità di azoto intercellulare viene definita dal bilancio di massa nel semi-batch:

$$\frac{dc_N}{dt} = -(rN \cdot c_C + qN \cdot c_C \cdot \mu). \quad (3.25).$$

### 3.3 Il modello C (Bernard, 2011)

Il modello C proposto nell'articolo di Bernard (2011), considera il modello di Droop per gestire la complessità delle dinamiche microalgali e presenta una teoria semplificata per definire i processi di coltivazione, descrivendo la crescita delle microalghe limitata contemporaneamente da luce e nutrienti. Il modello è stato validato utilizzando dati sperimentali per *Isochrysis galbana* ottenuti dal lavoro di Smith e Yamanaka (2007).

Come per il modello B descritto nel §3.2, tale articolo propone un modello capace di rappresentare la crescita delle colture microalgali basandosi su parametri ed equazioni che regolano i fattori che maggiormente influiscono la cinetica di crescita e l'accumulo dei lipidi delle microalghe; esso è costituito da un sistema di quattro equazioni differenziali: bilancio di massa del substrato, bilancio di massa della quota di azoto, bilancio di massa del carbonio intracellulare e un'equazione per rappresentare le dinamiche di adattamento delle microalghe all'intensità di luce. Il modello prevede che vengano dati in ingresso l'intensità di luce e la temperatura mentre fornisce in uscita la crescita della biomassa e l'accumulo di lipidi. Nei paragrafi successivi vengono elencati i quattro bilanci e le altre equazioni che il modello C prevede per descrivere i diversi processi.

### 3.3.1 Interazione tra crescita e nutrienti

Nel modello C l'interazione tra crescita e nutrienti è descritta dal modello di Droop; in particolare, come nel modello B, si considera limitante solo la disponibilità di azoto, mentre gli altri nutrienti utilizzati dalle microalghe sono presenti in abbondanza. Il modello di Droop è stato scelto rispetto ad altri in seguito all'evidenza sperimentale per la quale la crescita delle microalghe dipende maggiormente dalla concentrazione di azoto intracellulare rispetto a quello intercellulare e perché le microalghe sono in grado di separare il processo di assorbimento dei nutrienti dalla crescita.

L'introduzione del modello di Droop nella cinetica delle microalghe prevede la definizione di alcuni parametri descritti in §3.2.6., in particolare la quota  $q$ , ovvero il rapporto tra concentrazione intracellulare di azoto e la concentrazione intracellulare di carbonio.

La definizione della dinamica all'interno di un reattore continuo perfettamente mescolato prevede un sistema di tre bilanci di materia: uno per l'azoto intercellulare, uno per la quota e infine uno per la biomassa:

$$\begin{cases} \frac{dc_N}{dt} = D \cdot c_N^{in} - \rho \cdot c_C - D \cdot c_N \\ \frac{dq}{dt} = \rho - \mu \cdot q \\ \frac{dc_C}{dt} = \mu \cdot c_C - D \cdot c_C \end{cases}, \quad (3.26)$$

dove:

- $c_C$ : concentrazione del carbonio intracellulare [ $\text{g}_C \text{m}^{-3}$ ];
- $c_N$ : concentrazione di azoto intercellulare [ $\text{g}_N \text{m}^{-3}$ ];
- $q$ : quota cellulare di azoto [ $\text{g}_N \text{g}_C^{-1}$ ];
- $D$ : rapporto tra il volume del reattore e la portata volumetrica (*dilution rate*) [ $\text{giorni}^{-1}$ ];

La variabile  $\rho$  rappresenta la velocità di assorbimento dell'azoto; nel modello l'assorbimento è rappresentato come una cinetica Michaelis-Menten:

$$\rho(c_N) = \rho_m \cdot \frac{c_N}{c_N + K_N}, \quad (3.27)$$

dove:

- $\rho_m$ : velocità massima di assorbimento dell'azoto [ $\text{giorni}^{-1}$ ];
- $K_N$ : costante di Michaelis-Menten per l'assorbimento di azoto [ $\text{g}_N \text{m}^{-3}$ ].

Come definito precedentemente, la velocità di crescita è basata sul modello di Droop, ovvero in relazione alla quota cellulare di azoto:

$$\mu = \bar{\mu} \cdot \left(1 - \frac{Q_0}{q}\right), \quad (3.28)$$

dove:

- $\bar{\mu}$ : velocità di crescita riferita ad una quota infinita [giorni<sup>-1</sup>];
- $Q_0$ : quota minima di azoto che permette la crescita delle microalghe [g<sub>N</sub> g<sub>C</sub><sup>-1</sup>].

Si definisce la variabile  $Q_m$  come la quota cellulare di azoto massima che si può ottenere in condizioni di nutrienti non limitanti; essa è calcolata con la seguente equazione:

$$Q_m = Q_0 + \frac{\rho_m}{\bar{\mu}}. \quad (3.29)$$

Il modello di Droop garantisce che per una quota iniziale  $Q_0 \leq q(t) \leq Q_m$ , il valore assunto dalla quota in ogni istante di tempo risulta compreso tra i due limiti. Tale proprietà può essere dimostrata analiticamente (Bernard, 2011).

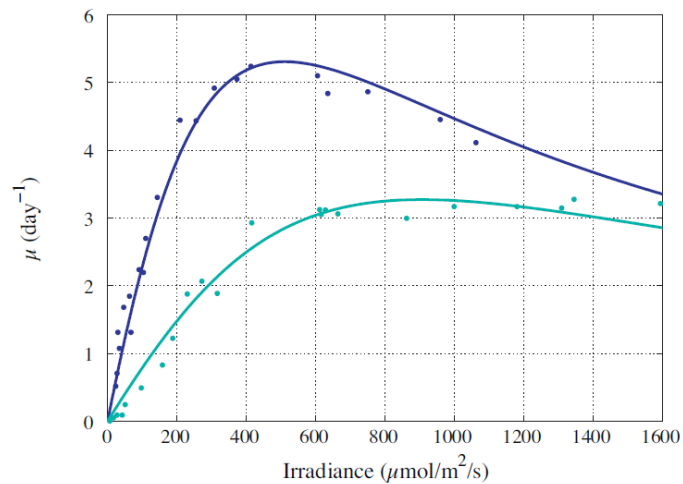
### 3.3.2 Interazione tra crescita e luce

Nello scorso decennio sono stati sviluppati numerosi modelli per rappresentare la risposta delle alghe in termini di densità di pigmenti al variare sia della luce sia dei nutrienti. Il caso più difficile da trattare è rappresentare la limitazione da luce in un ambiente in cui l'azoto scarseggia perché la sintesi di pigmenti dipende strettamente dalla quantità di azoto disponibile.

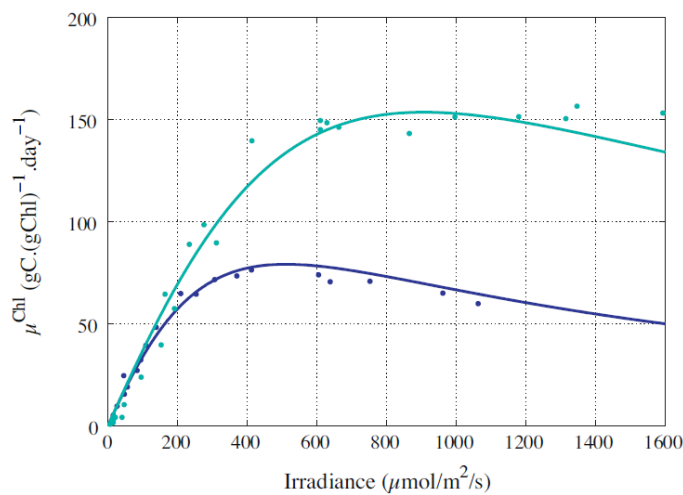
Geider *et al.* (1998) sono stati i primi a proporre un modello semplice che si basa sulla clorofilla come variabile; questo modello considera la risposta della clorofilla sia in funzione della luce sia dell'azoto presenti nel sistema. Successivamente sono stati sviluppati ulteriori modelli più complessi che permettono di descrivere in modo più dettagliato i vari meccanismi, coinvolgendo però un maggior numero di parametri e variabili di stato che rendono più difficile la validazione e l'uso del modello stesso.



Uno degli aspetti chiave nel definire l'interazione tra crescita e luce è la fotoacclimatazione; come definito in §1.2.3, si tratta del processo che permette alle alghe di adattare la sintesi dei pigmenti (in particolar della clorofilla) all'intensità di luce alla quale sono sottoposte; l'andamento della crescita per due colture sottoposte e fotoacclimate a due diverse intensità di luce è rappresentata nella Figura 3.3.



(a)



(b)

**Figura 3.3.** Modellazioni (linee) e dati sperimentali (punti) della velocità di crescita e di fotosintesi di *Skeletononema costatum* a intensità di luce bassa ( $I=50\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , linea e punti blu) e a intensità di luce elevata ( $I=1200\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , linea e punti azzurro). Il grafico (a) è normalizzato sul carbonio mentre il grafico (b) sulla clorofilla (Bernard, 2011).

Dall'analisi della Figura 3.3, è evidente che la velocità di crescita e di fotosintesi dipende dall'intensità di luce alla quale la coltura è sottoposta e fotoacclimatata; si può

notare un ulteriore aspetto importante: quando la velocità di crescita è normalizzata sulla concentrazione di carbonio (Figura 3.3a), la pendenza iniziale della curva è diversa per le due intensità di luce; al contrario, quando la velocità di fotosintesi è normalizzata sulla concentrazione di clorofilla (Figura 3.3b), la pendenza iniziale della curva è uguale per le due intensità di luce, ovvero è indipendente dalla fotoacclimatazione. Da tali considerazioni è stata definita  $\theta$  [ $g_{chl} g_C$ ], una variabile che risulta anch'essa indipendente dalla fotoacclimatazione:

$$\theta = \frac{Chl}{c_C}, \quad (3.30)$$

dove  $Chl$  è la concentrazione di clorofilla [ $g_{chl} m^{-3}$ ]. Di conseguenza, per poter modellare la crescita delle microalghe indipendentemente dalla loro fotoacclimatazione, sono stati sviluppati molteplici modelli in cui si considera che la velocità di crescita sia espressa in funzione della luce e di  $\theta$ .

Nella Figura 3.3 è possibile notare anche che a elevate intensità di luce si verifica la fotoinibizione; tale processo è stato affrontato in §1.2.3 e solitamente non viene considerato nei modelli cinetici anche se è di fondamentale importanza in quanto anch'esso contribuisce alla produttività microalgale ad alte intensità di luce.

Un modo per considerare l'effetto della luce nella cinetica delle microalghe consiste nell'includere nell'espressione rappresentativa della velocità di crescita alcune variabili e parametri che considerano i processi fisici, appena definiti, associati all'intensità di luce:

$$\bar{\mu} = \tilde{\mu} \cdot \frac{I}{I + K_{sl} + I^2/K_{il}}, \quad (3.31)$$

dove:

- $\bar{\mu}$ : velocità di crescita in funzione dell'intensità di luce [giorni<sup>-1</sup>];
- $\tilde{\mu}$ : velocità indipendente dall'intensità di luce [giorni<sup>-1</sup>];
- $I$ : intensità di luce [ $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ ].

Nell'equazione (3.31) sono presenti anche il coefficiente di inibizione  $K_{il}$  [ $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ ] e  $K_{sl}$  [ $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ ]; quest'ultimo è definito come:

$$K_{sl} = \frac{K_{sl}^*}{\theta}, \quad (3.32)$$

dove  $K_{sl}^*$ : coefficiente di fotoacclimatazione [ $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ ].

Con questa espressione la pendenza iniziale della velocità di assorbimento del carbonio normalizzato per la clorofilla è costante, qualunque sia la luce di pre-acclimatazione (con la relativa  $\theta$ ).

L'introduzione del coefficiente di inibizione e del coefficiente di fotoacclimatazione permettono di definire il parametro  $I_{opt}$  [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ], ovvero l'intensità di luce alla quale la velocità di crescita  $\bar{\mu}$  è massima:

$$I_{opt} = \sqrt{K_{sl} \cdot K_{il}} . \quad (3.33)$$

Il modello deve essere in grado di rappresentare la concentrazione di clorofilla nel sistema per poter definire la distribuzione dell'intensità di luce nella coltura. Per semplificare, si assume che la clorofilla sia proporzionale alle proteine presenti nella cellula e, di conseguenza, linearmente correlato all'azoto intracellulare. Per un modello in cui le alghe sono fotoacclimate ad un'intensità di luce  $I^*$  la concentrazione di clorofilla è rappresentata nel seguente modo:

$$Chl = \gamma \cdot c_c \cdot q , \quad (3.34)$$

dove  $\gamma$  [ $\text{g}_{Chl} \text{g}_N^{-1}$ ] è la costante di proporzionalità tra massa di azoto intracellulare e la massa di clorofilla; essa è calcolata definendo la variabile  $\gamma_{max}$  [ $\text{g}_{Chl} \text{g}_N^{-1}$ ] ed il parametro  $k_I$  [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]:

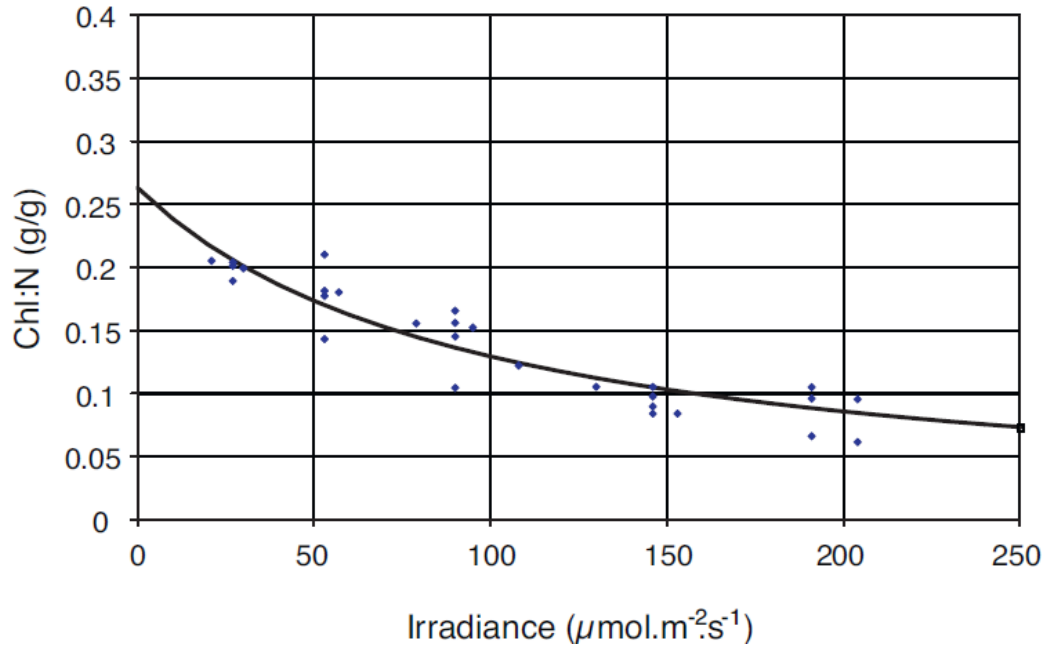
$$\gamma = \gamma_{max} \cdot \frac{k_I}{I^* + k_I} . \quad (3.35)$$

Nella Figura 3.4 viene rappresentato l'andamento dell'equazione (3.34) (linea continua) al variare dell'intensità di luce; il confronto con i dati sperimentali (Pawlowski, 2004) (punti) ottenuti per *Rhodomonas salina* con vari livelli di azoto limitante, conferma la capacità dell'equazione (3.34) di descrivere la quantità di clorofilla per unità di azoto cellulare.

Un'importante caratteristica del modello appena definito, è che le equazioni utilizzate non vengono espresse in funzione di  $I$  bensì in funzione di  $I^*$ ; quest'ultima variabile è stata introdotta da Bernard *et al.* (2009) ed esprime l'irradianza a cui le microalghe sono fotoacclimate. In una cultura in stato stazionario caratterizzata da una bassa concentrazione e da un'intensità di luce media tale variabile corrisponde all'intensità di luce media. Perciò per rappresentare le dinamiche di adattamento alla luce si introduce la seguente equazione:

$$\frac{dI^*}{dt} = \delta\mu \cdot (\bar{I} - I^*), \quad (3.36)$$

dove  $\bar{I}$  [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ] è l'intensità di luce media lungo il volume della coltura e  $\delta$  è la velocità di fotoacclimatazione.



**Figura 3.4.** Rappresentazione del rapporto tra clorofilla a e azoto in varie condizioni di intensità di luce per *Rhodomonas salina* con vari livelli di azoto limitante in un reattore chemostat; la linea rappresenta l'Equazione 3.34 mentre i punti rappresentano i dati sperimentali (Bernard, 2011).

### 3.3.3 Velocità di assorbimento dell'azoto

L'assorbimento massimo di substrato deve essere legato alla quota massima di substrato caratteristica della cellula; ciò è di particolare importanza soprattutto nel caso in cui si voglia descrivere un sistema che prevede l'assenza di luce. Quando l'intensità di luce è assente, le cellule non crescono ( $\bar{\mu}(0)=0$ ) e perciò se l'azoto potesse essere continuamente assimilato senza essere consumato, ciò porterebbe ad una quota massima pari a uno. Per tenere conto del fatto che non è possibile avere una quota di azoto pari a uno, è necessario modificare l'equazione (3.27) secondo la formulazione:

$$\rho = \bar{\rho} \cdot \frac{c_N}{c_N + K_N} \cdot \left(1 - \frac{q}{Q_l}\right), \quad (3.37)$$

dove :

- $Q_l$  : quota massima di azoto intracellulare [ $\text{g}_N \text{g}_C^{-1}$ ];
- $\bar{p}$  : velocità massima di assorbimento dell'azoto [ $\text{giorni}^{-1}$ ].

É possibile dimostrare che se inizialmente  $Q_0 < q(0) < Q_l$  allora per ogni istante si avrà  $Q_0 < q(t) < Q_l$ .

### 3.3.4 Respirazione cellulare

La respirazione è un altro processo rappresentato nel modello C (solitamente è contenuta nella velocità di crescita netta del modello di Droop).

In sistemi ad elevata densità che presentano un'elevata frazione di microalghe non esposte alla luce è necessario considerare esplicitamente la respirazione; in tali condizioni infatti, la respirazione risulta maggiore della crescita perciò la quantità di  $\text{CO}_2$  consumata è inferiore rispetto a quella prodotta.

La respirazione è la somma di due termini: uno legato al costo di biosintesi, a sua volta dipendente dall'assorbimento di nutrienti e dalla crescita, e uno legato alla respirazione basale, proporzionale alla biomassa. Il modo più semplice per considerare la respirazione nel modello è assumere che il costo di biosintesi sia già contenuto nella velocità di crescita e che la respirazione basale venga rappresentata in modo proporzionale rispetto alla biomassa. Si assume, inoltre, che la velocità di rilascio di azoto da parte delle microalghe sia uguale alla velocità di rilascio del carbonio; ciò implica che il termine di respirazione considera anche la mortalità delle cellule.

In conclusione, per rappresentare la respirazione, si sottrae un termine pari a  $R \cdot c_C$  al bilancio di massa del carbonio.

### 3.3.5 Distribuzione spaziale della luce

La distribuzione spaziale della luce viene determinata assumendo, per semplicità, una geometria planare con illuminazione perpendicolare ad un piano di spessore  $L$  [m]; è possibile applicare il modello anche per geometrie più complicate ma è più difficile ottenere risultati analitici. Si assume, inoltre, che la concentrazione della biomassa all'interno del reattore sia omogenea in modo che la luce abbia solo una distribuzione spaziale.

Con le precedenti assunzioni si può rappresentare la distribuzione dell'intensità di luce all'interno del reattore come nel modello A e nel modello B, ovvero applicando la legge di Lambert-Beer secondo cui si verifica una diminuzione esponenziale dell'intensità di luce lungo la profondità del reattore; in questo modello però non si considera che il coefficiente di assorbimento sia costante bensì che esso vari in funzione della concentrazione di clorofilla, di concentrazione della biomassa e di torbidità; viene

perciò introdotta la variabile  $\xi$  che rappresenta la velocità di attenuazione della luce [ $\text{m}^{-1}$ ]:

$$\xi = a \cdot Chl + b \cdot c_c + c, \quad (3.38)$$

dove:

- $a$ : coefficiente di attenuazione della luce relativo alla clorofilla [ $\text{m}^2 \text{g}_{\text{Chl}}^{-1}$ ];
- $b$ : coefficiente di attenuazione della luce relativo alla biomassa [ $\text{m}^2 \text{g}_C^{-1}$ ];
- $c$ : coefficiente di attenuazione della luce relativo alla tobidità di fondo [ $\text{m}^{-1}$ ].

La legge di Lambert-Beer diventa perciò:

$$I = I_0 \cdot e^{-\xi \cdot l}, \quad (3.39)$$

dove:

- $I$ : intensità di luce alla profondità  $l$  [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ];
- $I_0$ : intensità di luce incidente sulla superficie del fotobioreattore [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ];
- $l$ : profondità del fotobioreattore rispetto alla superficie [m].

Il gradiente di intensità di luce risultante dall'applicazione della legge di Lambert-Beer non tiene conto della dispersione della luce in una cultura densa e può essere migliorata usando di modelli di irradianza più precisi che considerano le proprietà ottiche delle microalghe; tale concetto è approfondito in §3.2.1.1.

Dato l'elevato grado di diluizione della soluzione nel fotobioreattore, si è scelto di considerare un'unica intensità di luce media volumetrica; il relativo calcolo avviene attraverso la definizione della variabile  $\lambda$  [-]:

$$\lambda = L \cdot \xi \quad (3.40)$$

e l'integrazione della legge di Lambert-Beer lungo  $l$ :

$$\bar{I} = \frac{I_0}{L} \int_0^L e^{-\xi \cdot z} dz = \frac{I_0}{\lambda} [1 - e^{-\lambda}] = \frac{I_0 - I}{\ln\left(\frac{I_0}{I}\right)}. \quad (3.41)$$

### 3.3.6 Velocità di crescita media

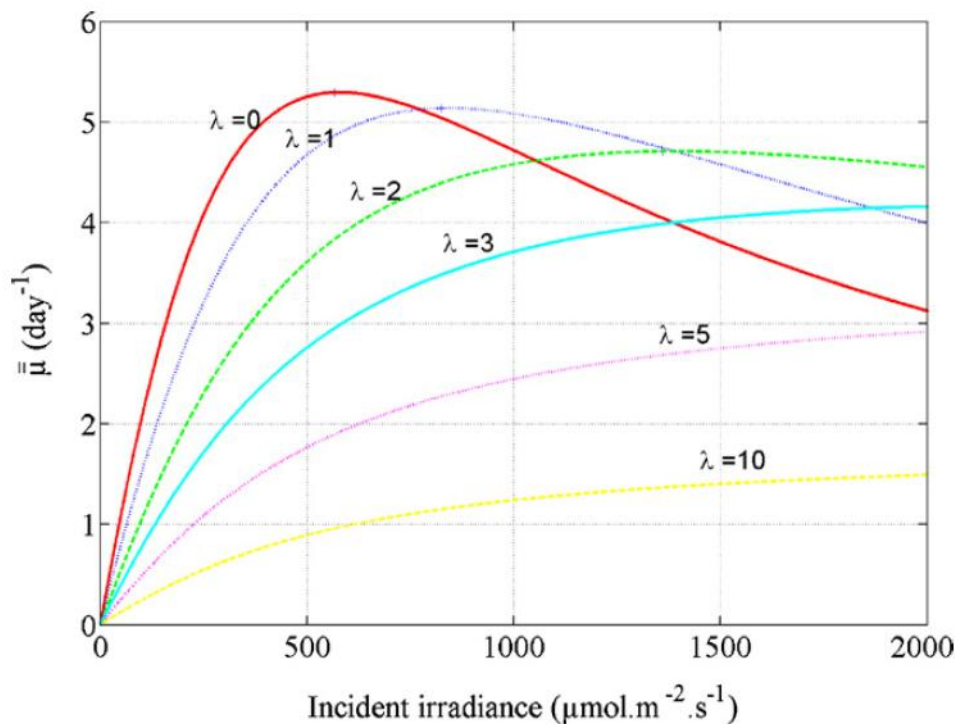
Il modello C prevede di mediare la velocità di crescita attraverso il gradiente di luce perché dati sperimentali (Huisman *et al.*, 2002) evidenziano che l'efficienza fotosintetica delle colture microalgali aumenta al diminuire dell'intensità di luce, perciò

con l'aumento della profondità. La velocità di crescita media  $\bar{\mu}$  (giorni<sup>-1</sup>) è definita perciò nel seguente modo:

$$\bar{\mu} = \frac{1}{L} \int_0^L \mu \, dl. \quad (3.42)$$

La Figura 3.5 illustra come varia la velocità di crescita media in funzione dell'intensità di luce e al variare di  $\lambda$ .

In particolare si considera un intervallo di valori pari a  $0 \leq \lambda \leq 10$ , dove  $\lambda = 0$  corrisponde al caso in cui non ci sono effetti di ombreggiamento e  $\lambda = 10$  corrisponde al caso in cui la luce è completamente attenuata da un'elevata concentrazione di biomassa o da un'elevata profondità.



**Figura 3.5.** Rappresentazione dell'andamento della velocità di crescita media in funzione dell'intensità di luce e al variare di  $\lambda$  (Bernard, 2011).

### 3.4 Confronto modelli

Il confronto tra i modelli descritti nei paragrafi precedenti richiede un'analisi di come vengono rappresentati i processi caratteristici associati alle microalghe; per poterlo fare viene innanzitutto riportato in seguito un elenco delle equazioni che compongono i modelli stessi:

**MODELLO A**Distribuzione spaziale dell'intensità di luce

$$\bar{I} = \int_0^L I_0 \cdot \exp(-\alpha \cdot c_x \cdot l) dl = I_0 \frac{1 - \exp(-\alpha \cdot c_x \cdot L)}{\alpha \cdot c_x \cdot L}$$

Cinetica di crescita

$$\frac{dc_x}{dt} = \mu_{\max} \cdot c_x \cdot \left( \frac{\bar{I}}{\bar{I} + K_I} \right) \cdot \left( 1 - \frac{c_x}{C_1 \cdot I_0} \right)^{C_2}$$

**MODELLO B**Distribuzione spaziale dell'intensità di luce

$$\bar{I} = \int_0^L I_0 \cdot \exp(-\alpha \cdot c_x \cdot l) dl = I_0 \frac{1 - \exp(-\alpha \cdot c_x \cdot L)}{\alpha \cdot c_x \cdot L}$$

Cinetica di crescita

- Velocità di fotosintesi

$$P_C = P_{C\_calc} \cdot \left[ 1 - \exp\left( \frac{-\alpha \cdot \phi_m \cdot \bar{I}}{P_{C\_calc}} \right) \right]$$

$$P_{C\_calc} = P_{C\_max} \cdot \phi_T \cdot \phi_{qN_{int}}$$

$$P_{C\_max} = \frac{\mu_{\max} + R_C}{1 - \zeta \cdot qN_{\max}}$$

$$\phi_m = \frac{P_{C\_max}}{E_k \cdot \alpha}$$

- Velocità di crescita

$$\frac{1}{c_C} \cdot \frac{dc_C}{dt} = \mu = P_C - R_C - \zeta \cdot rN$$

$$c_x = 2 \cdot c_C$$



Dipendenza della crescita dall'azoto

$$\phi_{qN_{int}} = 1 - \frac{qN_{min}}{qN}$$

$$\phi_{qN_{ext}} = \frac{cN_{medium}}{cN_{medium} + K_N}$$

$$rN_{calc} = rN_{max} \cdot \phi_{qN_{int}} \cdot \phi_{qN_{ext}} \cdot \phi_T$$

$$rN_{max} = P_{C\_max} \cdot qN_{max}$$

$$\frac{1}{qN} \cdot \frac{dqN}{dt} = rN = \frac{rN_{calc}}{qN} - rR_N$$

$$\frac{dc_N}{dt} = -(rN \cdot c_C + qN \cdot c_C \cdot \mu)$$

Dipendenza della crescita dalla temperatura

$$\phi_T = \frac{2 \cdot T}{1 + f^2(T)}$$

$$f(T) = \exp\left(\frac{Ea}{R \cdot T_{opt}} - \frac{Ea}{R \cdot T}\right)$$

**MODELLO C**

Il sistema si compone di quattro equazioni:

$$\frac{dc_N}{dt} = D \cdot c_N^{in} - \bar{\rho} \cdot \frac{c_N}{c_N + K_N} \cdot \left(1 - \frac{q}{Q_l}\right) \cdot c_C - D \cdot c_N$$

$$\frac{dq}{dt} = \bar{\rho} \cdot \frac{c_N}{c_N + K_N} \cdot \left(1 - \frac{q}{Q_l}\right) - \bar{\mu} \cdot (q - Q_0)$$

$$\frac{dc_C}{dt} = \bar{\mu} \cdot \left(1 - \frac{Q_0}{q}\right) \cdot c_C - D \cdot c_C - Rc \cdot c_C$$

$$\frac{dI^*}{dt} = \bar{\mu} \cdot \left(1 - \frac{Q_0}{q}\right) \cdot (\bar{I} - I^*)$$

Ci sono ulteriori equazioni per definire le variabili del sistema:

Distribuzione spaziale dell'intensità di luce

$$\xi = a \cdot Chl + b \cdot c_C + c$$

$$\lambda = L \cdot \xi$$

$$\bar{I} = \frac{I_0}{L} \int_0^L e^{-\xi \cdot z} dz = \frac{I_0}{\lambda} [1 - e^{-\lambda}] = \frac{I_0 - I}{\ln\left(\frac{I_0}{I}\right)}$$

Cinetica di crescita

- Interazione tra velocità di crescita e luce

$$\bar{\mu}(I) = \tilde{\mu} \cdot \frac{I}{I + K_{sI} + I^2/K_{iI}}$$

$$K_{sI} = \frac{K_{sI}^*}{\theta}$$

$$\theta = \frac{Chl}{c_C}$$

$$Chl = \gamma \cdot c_C \cdot q$$

$$\gamma = \gamma_{\max} \cdot \frac{k_I}{I^* + k_I}$$

- Velocità di crescita media

$$\bar{\bar{\mu}} = \frac{1}{L} \int_0^L \bar{\mu} dl$$

Dall'analisi dei tre modelli si ottengono i seguenti risultati:

- Distribuzione spaziale dell'intensità di luce: in tutti i modelli si applica la legge di Lambert-Beer per rappresentare la diminuzione esponenziale dell'intensità di luce lungo la profondità del fotobioreattore; inoltre, dato il grado di diluizione della soluzione, non si considerano valori diversi di intensità di luce lungo la profondità, bensì si calcola un'intensità di luce media integrando la legge di

Lambert-Beer. Mentre il modello A ed il modello B assumono un coefficiente di assorbimento costante pari ad  $\alpha$ , nel modello C il coefficiente di assorbimento varia al variare della concentrazione di clorofilla, della concentrazione di biomassa e della torbidità caratteristica della soluzione nel sistema.

- Fotoacclimatazione: nel modello A e nel modello B non vengono rappresentati i processi di fotoacclimatazione e fotoinibizione; essi sono invece inglobati all'interno del modello C mediante l'introduzione del coefficiente di fotoacclimatazione  $K_{sl}^*$  e del coefficiente di inibizione  $K_{II}$  nell'equazione che descrive la velocità di crescita in funzione dell'intensità di luce.

Un ulteriore aspetto che differenzia il modello C rispetto agli altri, è che esso non utilizza direttamente l'intensità di luce media bensì introduce una variabile fittizia, direttamente legata all'intensità di luce media, che rappresenta l'intensità di luce alla quale le microalghe sono fotoacclimate.

- Cinetica di crescita: nel modello A la crescita è rappresentata in termini di concentrazione di biomassa e si basa sulla relazione di Monod, in cui si considera l'intensità di luce media come un nutriente. Dato che l'intensità di luce media si annulla solo nel caso in cui la luce incidente sia pari a zero, è stata introdotta l'equazione di Riccati modificata per poter rappresentare la fase stazionaria che si presenta quando la luce è limitata. I modelli B e C rappresentano, invece, la crescita delle microalghe in termini di concentrazione di carbonio intracellulare e tengono in considerazione anche la perdita di biomassa per la respirazione cellulare; in essi la velocità di crescita varia in funzione di diversi fattori. Nel modello B la velocità di crescita varia nel tempo in funzione della velocità di fissazione del carbonio (che dipende a sua volta dall'intensità di luce, dalla concentrazione di azoto intracellulare e dalla temperatura), della velocità di respirazione cellulare e della velocità di assorbimento dell'azoto. Anche nel modello C la cinetica varia nel tempo, ma non si considera la velocità di fissazione di carbonio; viene calcolata invece una velocità che varia in funzione dell'intensità di luce e che dipende dalla fotoinibizione (attraverso il coefficiente di inibizione) e dalla fotoacclimatazione (dividendo il coefficiente di fotoacclimatazione per il rapporto tra la concentrazione di clorofilla e di carbonio intracellulare). Un ulteriore aspetto che differenzia il modello di C rispetto al modello B è che nel modello C la velocità di crescita viene calcolata non solo in funzione del tempo (le variabili appena elencate sono omogenee nello spazio e variano solo nel tempo) ma anche al variare della profondità; ciò perché si ha che l'efficienza fotosintetica delle colture microalgali aumenta al diminuire dell'intensità di luce, perciò con l'aumento della profondità.

- Effetto dalla temperatura: il modello B è l'unico che rappresenta la dipendenza dalla temperatura per le colture microalgali.
- Effetto della concentrazione di azoto: il modello A, contrariamente al modello B ed al modello C, non considera che la crescita delle microalghe dipenda dalla concentrazione di azoto intracellulare ed intercellulare. Negli altri si calcola un bilancio di massa per l'azoto in soluzione e uno per la quota cellulare e si applica il modello di Droop, basato sul concetto che la crescita delle microalghe dipende maggiormente dall'azoto intracellulare rispetto a quello intercellulare.
- Effetto del contenuto di clorofilla: il modello C è l'unico che definisce la concentrazione di clorofilla; questa viene calcolata considerando che essa è proporzionale alla quantità di azoto intracellulare. Tale grandezza viene utilizzata per calcolare le variabili  $\theta$  e  $\xi$  definite in §3.3.2 e §3.3.5 rispettivamente.

# Capitolo 4

## Identificazione dei modelli di crescita

Nel seguente capitolo si presenta l'implementazione nel software gPROMS® dei modelli descritti nel Capitolo 3. In seguito si effettua una stima di alcuni di questi parametri per rappresentare i dati sperimentali ottenuti nelle prove a intensità di luce fissa descritte nel Capitolo 2. Si espongono infine una discussione e una valutazione della capacità dei modelli di rappresentare il comportamento delle microalghe al variare dell'intensità di luce alle quali sono sottoposte.

### 4.1 Implementazione dei modelli

I modelli descritti nel Capitolo 3 sono stati implementati in gPROMS®; tale software è distribuito dall'azienda PSE (Process Systems Enterprise Limited). Il termine gPROMS® deriva da “general PROcess Modelling System”, esso infatti è un simulatore di processi chimici che permette di simulare, stimare i parametri di un modello e ottimizzare (sia in stato transitorio sia in stato stazionario).

L'implementazione dei tre modelli è stata eseguita creando tre progetti (`Project`) distinti e seguendo tali step:

1. dichiarazione del tipo di variabili (`Variable Types`): si definiscono i tipi di variabile utilizzati nel modello specificando informazioni quali il nome, il valore preimpostato (di *default*), il limite massimo e minimo e le unità di misura;
2. definizione del modello (`MODEL`): descrizione matematica del comportamento fisico del sistema che si vuole rappresentare. In tale step vengono definiti più elementi: `PARAMETER`, i parametri che caratterizzano il sistema, ovvero grandezze che vengono definite dall'utente e rimangono costanti durante la simulazione; `VARIABLE`, le variabili che descrivono il comportamento del sistema in funzione del tempo, esse possono essere simulate o definite per saturare i gradi di libertà (step successivo); `EQUATION`, le equazioni utilizzate per determinare l'andamento delle variabili in funzione del tempo;
3. definizione delle attività di simulazione (`PROCESS`): attraverso tale step si definisce l'attività di simulazione che si vuole effettuare; in esso si richiama il

nome del modello da simulare e si definiscono i parametri, le variabili necessarie per saturare i gradi di libertà, le condizioni iniziali e la durata della simulazione.

#### 4. Esecuzione della simulazione.

L'implementazione dei modelli B e C è stata compiuta inserendo le equazioni che li compongono e imponendo parametri e condizioni definite nelle prove sperimentali utilizzate dagli autori degli articoli in modo da verificare la corretta implementazione dei modelli stessi. Non è stato possibile effettuare lo stesso per il modello A dato che, come definito in §3.1.2, esso non è stato ricavato da modelli di letteratura come i precedenti.

I listati completi del codice di implementazione dei tre modelli sono riportati in Appendice.

## 4.2 Stima dei parametri

Il software gPROMS® permette di effettuare la stima dei parametri di un modello partendo da dati sperimentali; tale attività ha l'obiettivo di rendere il modello predittivo, ovvero permettere, in seguito, di rappresentare l'andamento reale del sistema senza svolgimento di ulteriori prove.

La stima dei parametri si basa sul metodo della massima verosimiglianza e la procedura prevede più step:

1. Definizione degli esperimenti eseguiti (*Performed Experiments*): in tale step si inseriscono i dati ottenuti negli esperimenti precedentemente svolti; per ognuno risulta necessario definire alcuni elementi: le condizioni iniziali delle variabili misurate, definizione e andamento della variabile di controllo e i dati misurati.
2. Definizione della stima dei parametri (*Parameter Estimation entity*): la definizione di tale entità prevede l'inserimento di ulteriori informazioni che non vengono specificate nello step precedente; in particolare, si definiscono i parametri che devono essere stimati (si indica il valore tentativo e i limiti superiore ed inferiore) e gli esperimenti che devono essere utilizzati per la stima.
3. Esecuzione della stima dei parametri.

## 4.3 Definizione dei dati sperimentali e dei parametri

Nei seguenti paragrafi si definiscono quali dati sperimentali vengono utilizzati nella stima dei parametri, quali sono i parametri dei modelli presentati nel Capitolo 3 e quali di questi vengono stimati.

### 4.3.1 Dati sperimentali

La stima dei parametri è stata eseguita utilizzando come *Performed Experiments* gli esperimenti in semi-batch a intensità di luce fissa descritti in §2.3; in particolare sono state utilizzate le curve a intensità di luce pari a  $46 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , il cui andamento è illustrato in §2.4.1.1. Si è deciso di considerare le curve foto inibite solo per il modello C dato che i modelli A e B non sono in grado di rappresentare tale fenomeno; inoltre si è deciso di trascurare la curva a  $5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  perché la coltivazione presenta crescita nulla.

La condizione iniziale delle variabili misurate consiste nella definizione della concentrazione dell'inoculo  $c_x^0$ . L'intensità di luce sulla superficie del reattore  $I_0$ , si assume costante nel tempo.

### 4.3.2 Parametri

Nei modelli presentati nel Capitolo 3 vengono definiti molteplici parametri, diversi a seconda del modello in cui vengono utilizzati; per chiarire quali sono i parametri viene definita una tabella per ogni modello, all'interno della quale si specifica il simbolo del parametro, il gruppo a cui appartengono (solo per i modelli B e C), il valore, l'unità di misura e il significato.

Per ogni modello si definiscono inoltre quali tra i parametri elencati nella tabella vengono poi stimati; l'individuazione di tali parametri è stata fatta considerando quali di questi influiscono maggiormente nella relazione tra coltura e luce, dato che l'obiettivo primario della stima è di ottenere un modello capace di prevedere il comportamento delle microalghe sottoposte a diverse intensità di luce. Si è scelto di identificare i parametri da stimare in tale modo anziché eseguire un'analisi di sensitività con l'obiettivo di privilegiare il significato fisico della grandezza che descrivono.

#### 4.3.2.1 Modello A

Nel modello A sono presenti cinque parametri; essi vengono elencati nella Tabella 4.1. Solo per il parametro  $\alpha$  si riporta un valore di letteratura; negli altri casi il valore indicato è quello usato per inizializzare la procedura di stima.

**Tabella 4.1.** *Elenco dei parametri utilizzati nel modello A; si specifica il simbolo del parametro, il valore, l'unità di misura e il significato. I parametri il cui valore è asteriscato sono quelli che poi saranno stimati dai dati sperimentali.*

PARAM.	VALORE	UDM	SIGNIFICATO
$\alpha$	0.0752	$\text{m}^2\text{g}^{-1}$	COEFFICIENTE DI ASSORBIMENTO Assorbanza specifica di una soluzione a concentrazione molare unitaria, ad una data lunghezza d'onda, attraverso una cella di lunghezza ottica unitaria; il valore varia durante un esperimento batch ma in questo caso si può considerare costante. Valore presente in Gentile and Blanch (2001) per <i>Nannochloropsis gaditana</i> .
$\mu_{\text{max}}$	0.02*	$\text{h}^{-1}$	VELOCITA' DI CRESCITA MASSIMA Velocità di crescita massima delle microalghe, raggiungibile nella fase esponenziale.
$K_I$	70*	$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	COSTANTE DI SATURAZIONE Intensità di luce richiesta per raggiungere metà della massima velocità di crescita.
$C_1$	1*	$\text{m}^2 \text{s g}_{\text{bio}} \mu\text{E}^{-1} \text{L}^{-1}$	COSTANTE 1
$C_2$	1*	adimensionale	COSTANTE 2

I parametri stimati nel modello A sono quattro:

- la velocità di crescita massima  $\mu_{\text{max}}$ : si decide di stimare tale parametro perché particolarmente sensibile alla specie algale e alle condizioni del sistema; l'imposizione di un valore errato comporta un'incapacità di rappresentare i dati sperimentali nella fase di crescita.
- la costante di saturazione  $K_I$ : si stima tale parametro perché risulta fondamentale nel comprendere come varia la crescita in funzione della luce, esso infatti rappresenta l'intensità di luce alla quale la velocità di crescita è la metà di quella massima;
- la costante 1  $C_1$  e la costante 2  $C_2$ : si stimano tali parametri perché sono necessari per descrivere la fase in cui la crescita diventa stazionaria.

Si decide di non stimare anche il parametro  $\alpha$  per non limitare i gradi di libertà del sistema.

#### 4.3.2.2 Modello B

I parametri presenti nel modello B sono raggruppati in tre gruppi a seconda che essi vengano utilizzati in equazioni che descrivono la luce, la crescita delle microalghe e l'azoto. I parametri vengono elencati in Tabella 4.2.



**Tabella 4.2.** *Elenco dei parametri utilizzati nel modello B; si specifica il simbolo del parametro, il gruppo di appartenenza, il valore, l'unità di misura e il significato. I parametri il cui valore è asteriscato sono quelli che poi saranno stimati dai dati sperimentali.*

PARAM.	GRUPPO	VALORE	UDM	SIGNIFICATO
$\alpha$	LUCE	0.0752*	$\text{m}^2 \text{g}_{\text{bio}}^{-1}$	<p>COEFFICIENTE DI ASSORBIMENTO</p> <p>Assorbanza specifica di una soluzione a concentrazione molare unitaria, ad una data lunghezza d'onda, attraverso una cella di lunghezza ottica unitaria; il valore varia durante un esperimento batch ma in questo caso si può considerare costante.</p> <p>Valore presente da Gentile e Blanch (2001) per <i>Nannochloropsis gaditana</i>.</p>
$R$	CRESCITA	$4.32 \cdot 10^{-4}$	$\text{h}^{-1}$	<p>VELOCITA' DI RESPIRAZIONE</p> <p>La respirazione è la funzione inversa della fotosintesi; essa si basa sul consumo di ossigeno e produce anidride carbonica liberando l'energia contenuta nei glucidi (formati nella fotosintesi) e mettendola a disposizione delle attività vitali dell'organismo. Nella respirazione si incorporano anche i costi metabolici di biosintesi e i costi di mantenimento cellulare, facendo eccezione per i costi metabolici di riduzione da nitrato ad ammonio e l'incorporazione dell'ammonio nella biomassa, che vengono invece definiti in funzione dell'assorbimento dell'azoto attraverso l'efficienza biosintetica.</p> <p>Valore ottenuto da Geider e Osborne (1991).</p>
$\zeta$	CRESCITA	4	$\text{g}_{\text{bio}} \text{g}_{\text{N}}^{-1}$	<p>EFFICIENZA BIOSINTETICA</p> <p>Energia richiesta per la riduzione di nitrato in ammonio, incorporazione ammonio negli amminoacidi e polimerizzazione amminoacidi nelle proteine.</p> <p>Valore ottenuto da Geider <i>et al.</i> (1998).</p>
$\mu_{\text{max}}$	CRESCITA	$2.5 \cdot 10^{-2}$ *	$\text{h}^{-1}$	<p>VELOCITA' DI CRESCITA MASSIMA</p> <p>Velocità di crescita massima delle microalghe, raggiungibile nella fase esponenziale.</p> <p>Valore ottenuto da Flynn <i>et al.</i> (1993) per <i>Nannochloropsis oculata</i>.</p>
$k_s$	AZOTO	0.005	$\text{g L}^{-1}$	<p>COSTANTE MICHAELIS-MENTEN</p> <p>Concentrazione di azoto necessaria affinché l'assorbimento abbia velocità pari a metà della velocità massima.</p> <p>Valore ottenuto da Ambrose (2006) per piante galleggianti.</p>

$qN_{\max}$	AZOTO	0.150	$\text{gN gC}^{-1}$	<p>QUOTA MASSIMA DI AZOTO</p> <p>Quantità massima di azoto che una cellula può contenere.</p> <p>Valore ottenuto da Flynn <i>et al.</i> (1993) per <i>Nannochloropsis oculata</i>.</p>
$qN_{\min}$	AZOTO	0.010	$\text{gN gC}^{-1}$	<p>QUOTA MINIMA DI AZOTO</p> <p>Quota minima che permette la crescita delle microalghe. Tale valore è misurabile con un esperimento batch quando i nutrienti finiscono e la crescita diventa nulla.</p> <p>Valore ottenuto da Flynn <i>et al.</i> (1993) per <i>Nannochloropsis oculata</i> e da Ambrose (2006) per piante galleggianti.</p>
$E_a$	TEMPER.	63	$\text{J mol}^{-1}$	<p>ENERGIA DI ATTIVAZIONE DEL RUBISCO</p> <p>Energia necessaria per attivare l'enzima rubisco, enzima presente nella fase di organizzazione del ciclo di Calvin e catalizza la reazione del ribulosio 1.5-bifosfato con <math>\text{O}_2</math> e <math>\text{CO}_2</math>.</p> <p>Valore ottenuto da da Geider e Osborne (1991).</p>
$R_{IG}$	TEMPER.	8.3144	$\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	COSTANTE DEI GAS
$T_{opt}$	TEMPER.	23	$^{\circ}\text{C}$	<p>TEMPERATURA OTTIMALE</p> <p>Temperatura in cui la velocità di crescita delle microalghe è massima.</p> <p>Valore ottenuto da Spolaore <i>et al.</i> (2006b) per <i>Nannochloropsis oculata</i></p>

I parametri stimati nel modello B sono due:

- coefficiente di assorbimento  $\alpha$ : si decide di stimare tale parametro perché è l'unico utilizzato nella descrizione di come l'intensità di luce varia all'interno del fotobioreattore;
- velocità di crescita massima  $\mu_{\max}$ : si decide di stimare tale parametro per i motivi definiti nel modello A.

Si è deciso di non stimare i parametri legati all'azoto ( $k_s$ ,  $qN_{\max}$ ,  $qN_{\min}$ ) perché si assume che essi abbiano effetto sulla capacità del modello di rappresentare la crescita poiché, come definito in precedenza, le prove sperimentali vengono svolte con una quantità di nutrienti non limitante; per lo stesso motivo non si stima nemmeno  $\zeta$ , parametro associato al gruppo crescita, ma correlato all'assorbimento di azoto. I parametri legati alla temperatura ( $E_a$ ,  $R_{IG}$ ,  $T_{opt}$ ) non vengono invece stimati perché si ipotizza che il sistema sia isoterma, dato che le prove sperimentali sono state svolte in un incubatore. Si decide inoltre di non stimare  $R$  perché è un parametro che non dipende dell'intensità di luce e influenza in modo limitato la crescita.

### 4.3.2.3 Modello C

I parametri presenti nel modello C vengono raggruppati in tre gruppi a seconda che essi vengano utilizzati in equazioni che descrivono la luce, la crescita delle microalghe e l'azoto. I parametri vengono sono specifici per *Isochrysis galbana* e sono elencati in Tabella 4.3.

**Tabella 4.3.** *Elenco dei parametri utilizzati nel modello C; si specifica il simbolo del parametro, il gruppo di appartenenza, il valore, l'unità di misura e il significato. I parametri il cui valore è asteriscato sono quelli che poi saranno stimati dai dati sperimentali.*

PARAM.	GRUPPO	VALORE	UDM	SIGNIFICATO
$Q_0$	AZOTO	0.010	gN gC <sup>-1</sup>	QUOTA MINIMA DI AZOTO Quota minima che permette la crescita delle microalghe. Tale valore è misurabile con un esperimento batch quando i nutrienti finiscono e la crescita diventa nulla. Valore ottenuto da Flynn <i>et al.</i> (1993) per <i>Nannochloropsis oculata</i> e da Ambrose (2006) per piante galleggianti
$Q_l$	AZOTO	0.150	gN gC <sup>-1</sup>	QUOTA MASSIMA DI AZOTO Quantità massima di azoto che una cellula può contenere. Valore ottenuto da Flynn <i>et al.</i> (1993) per <i>Nannochloropsis oculata</i> .
$\bar{\rho}$	AZOTO	0.073	gN gC <sup>-1</sup> giorni <sup>-1</sup>	VELOCITÀ MASSIMA DI ASSORBIMENTO DELL'AZOTO Velocità massima con la quale può essere assorbito l'azoto, ottenibile quando la concentrazione di azoto non limita la crescita delle microalghe. Valore presente nell'articolo di Bernard (2011).
$K_s$	AZOTO	5	gN m <sup>-3</sup>	COSTANTE MICHAELIS-MENTEN PER L'AZOTO Concentrazione di azoto necessaria affinché l'assorbimento abbia velocità pari a metà della velocità massima. Valore ottenuto da Ambrose (2006) per piante galleggianti.
$R$	CRESCITA	0.0081	giorni <sup>-1</sup>	VELOCITÀ DI RESPIRAZIONE BASALE La respirazione è la somma di due termini: uno legato al costo di biosintesi e uno legato alla respirazione basale, proporzionale alla biomassa; con $R$ si esprime quest'ultimo. Valore presente nell'articolo di Bernard (2011).

$\tilde{\mu}$	LUCE	1.7*	giorni <sup>-1</sup>	VELOCITA' MASSIMA Il significato di tale parametro non è del tutto chiaro; si suppone sia la velocità massima che si ottiene quando l'intensità di luce è ottimale. Valore presente nell'articolo di Bernard (2011).
$K_{sl}^*$	LUCE	1.4*	$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	COEFFICIENTE DI FOTOACCLIMATAZIONE Il significato di tale parametro non è del tutto chiaro; si suppone corrisponda alla pendenza iniziale della velocità di assorbimento di carbonio. Valore presente nell'articolo di Bernard (2011).
$K_{il}$	LUCE	295*	$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	COEFFICIENTE DI INIBIZIONE Il significato di tale parametro non è del tutto chiaro; si suppone corrisponda all'intensità di luce alla quale si ha fotoinibizione. Valore presente nell'articolo di Bernard (2011).
$\gamma_{\max}$	LUCE	0.57	$\text{gChl gN}^{-1}$	COSTANTE MASSIMA DI PROPORZIONALITA' TRA AZOTO E CLOROFILLA Coefficiente che rappresenta la frazione massima di azoto interno alla cellula che può essere considerato clorofilla. Valore presente nell'articolo di Bernard (2011).
$K_I^*$	LUCE	63	$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$	COEFFICIENTE DI AZOTO-CLOROFILLA Il significato di tale parametro non è del tutto chiaro; si suppone rappresenti la costante Michaelis-Menten per la relazione tra azoto e clorofilla, ovvero l'intensità di luce (alla quale le microalghe sono fotoacclimate) per la quale la costante di proporzionalità tra azoto e clorofilla è la metà rispetto alla massima ottenibile. Valore presente nell'articolo di Bernard (2011).
$a$	LUCE	16.2*	$\text{m}^2 \text{gChl}^{-1}$	COEFFICIENTE DI ATTENUAZIONE DELLA LUCE RELATIVO ALLA CONCENTRAZIONE DI CLOROFILLA Valore presente nell'articolo di Bernard (2011).
$b$	LUCE	0.087*	$\text{m}^{-1}$	COEFFICIENTE DI ATTENUAZIONE DELLA LUCE RELATIVO ALLA CONCENTRAZIONE DELLA BIOMASSA Valore presente nell'articolo di Bernard (2011).

I parametri stimati nel modello C sono cinque:

- velocità massima  $\tilde{\mu}$ : si decide di stimare tale parametro per gli stessi motivi definiti nel modello A;

- coefficiente di fotoacclimatazione  $K_{sl}^*$ : si stima tale parametro perché, benché il significato non sia del tutto chiaro, risulta avere un effetto sulla relazione tra luce e crescita;
- coefficiente di attenuazione della luce relativo alla concentrazione di clorofilla  $a$  e coefficiente di attenuazione della luce relativo alla concentrazione della biomassa  $b$ : si stimano tali parametri perché, come dimostrato in Figura 3.5, la velocità di crescita media in funzione dell'intensità di luce è molto sensibile a  $\lambda$ , che come definito nell'equazione 3.40, corrisponde al prodotto tra la profondità del pannello e la velocità di attenuazione della luce (in cui sono presenti  $a$  e  $b$ );
- coefficiente di inibizione  $K_{il}$ : tale parametro viene stimato per rappresentare le curve fotoinibite.

Per quanto riguarda gli altri parametri, in modo analogo a quanto fatto per il modello B, non si stimano né quelli correlati all'azoto ( $Q_0, Q_1, \bar{p}, K_s$ ) né il parametro  $R$ . Inoltre, non si stimano i parametri  $\gamma_{\max}$  e  $K_I$  perché, per semplificare la modellazione, si assume che la proporzionalità tra azoto e clorofilla rimanga costante al variare dell'intensità di luce.

## 4.4 Risultati e discussione

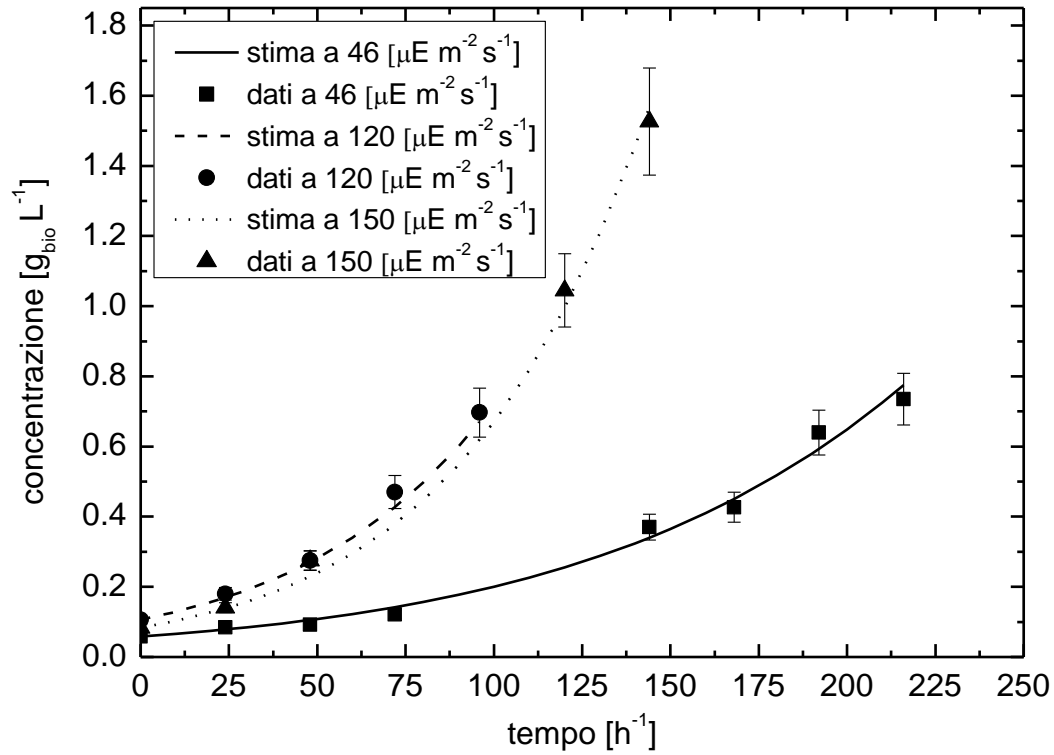
### 4.4.1 Modello A

La stima dei parametri è stata effettuata con due procedure diverse: una in cui viene eseguita una stima separata dei parametri e una in cui essi vengono stimati tutti insieme.

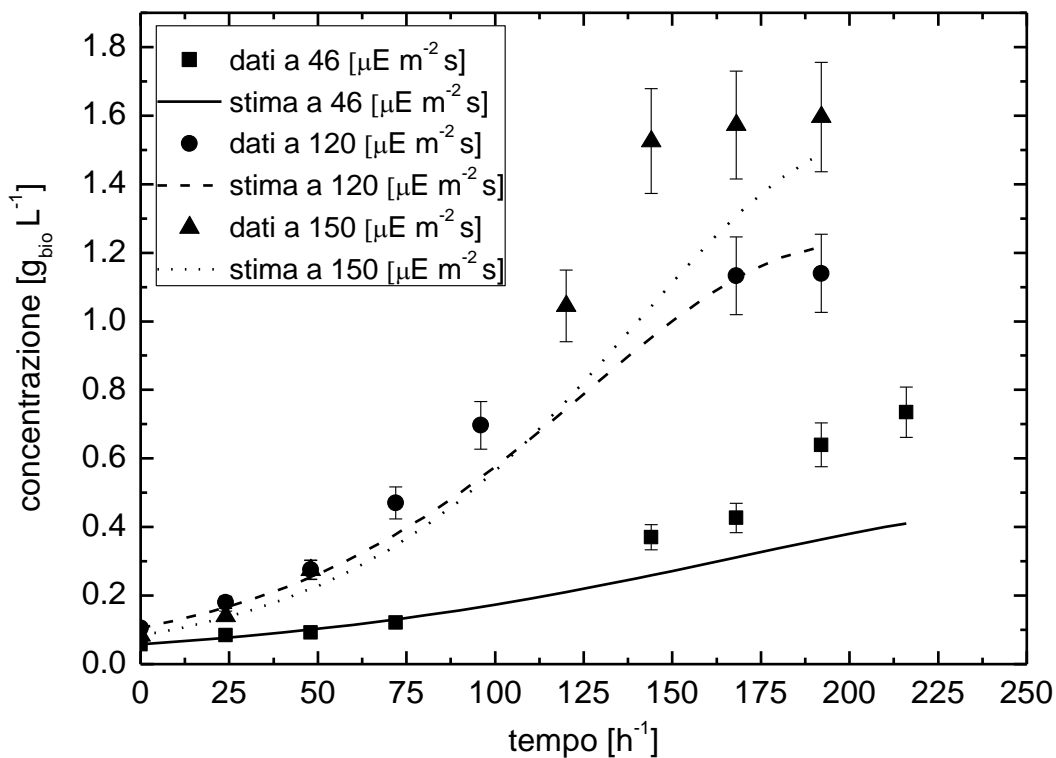
#### 4.4.1.1 Stima separata

In tale procedura si esegue inizialmente la stima dei parametri  $\mu_{\max}$  e  $K_I$  per rappresentare i dati della fase di crescita esponenziale; si assume che essa non sia influenzata dalla fase stazionaria e perciò, per non compromettere la stima, si eliminano i dati relativi a quest'ultima fase. Successivamente, si fissano i valori dei parametri appena stimati, si aggiungono i dati precedentemente tolti e si stimano  $C_1$  e  $C_2$ .

I risultati sono rappresentati in Figura 4.1.



(a)



(b)

**Figura 4.1.** Rappresentazione dei dati sperimentali e della simulazione ottenuta dalla stima separata dei parametri per il modello A; in (a) si rappresenta la fase di stima di  $\mu_{\text{max}}$  e  $K_1$  mentre in (b) si rappresenta la fase successiva in cui si fissano i valori appena ottenuti e si stimano  $C_1$  e  $C_2$ .

Nella Figura 4.1a si nota che il modello riproduce in modo accurato la fase di crescita esponenziale ma nello step successivo, rappresentato in Figura 4.1b, benché si fissino i valori di  $\mu_{max}$  e  $K_I$  ottenuti per la prima stima, l'introduzione di  $C_1$  e  $C_2$  porta ad un rallentamento della crescita che corrisponde all'abbassamento delle curve rispetto ai dati sperimentali.

I valori dei parametri stimati sono riportati in Tabella 4.4:

**Tabella 4.4.** Valori stimati dei parametri nella procedura separata per il modello A.

PARAMETRO	VALORE	UDM
$\mu_{max}$	0.031	$h^{-1}$
$K_I$	67.258	$\mu E m^{-2} s^{-1}$
$C_1$	0.010	$m^2 s g_{bio} \mu E^{-1} L^{-1}$
$C_2$	0.469	-

#### 4.4.1.2 Stima contemporanea

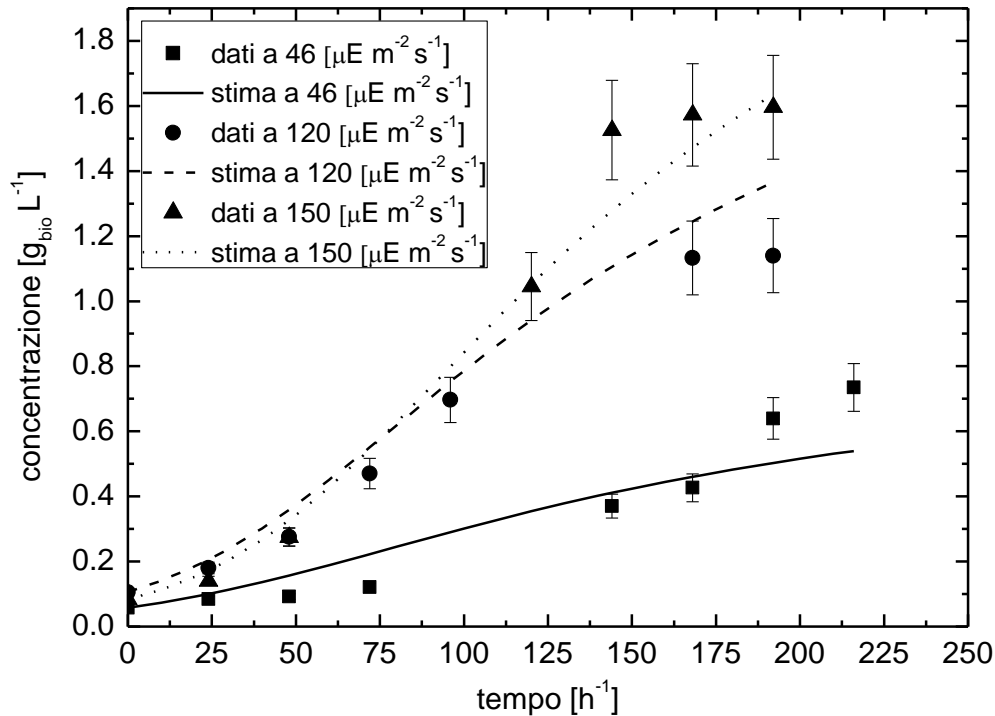
In tale procedura si assume che la crescita nella fase esponenziale sia influenzata dalla limitazione che la luce provoca nella fase stazionaria; si stimano perciò contemporaneamente i parametri definiti in §4.3.2.1.

I risultati sono rappresentati in Figura 4.2.

In Figura 4.2 si nota che la simulazione ottenuta dalla stima riproduce i dati sperimentali nella fase di crescita esponenziale ma non rappresenta adeguatamente la fase stazionaria. I valori dei parametri stimati sono riportati in Tabella 4.5:

**Tabella 4.5.** Valori stimati dei parametri nella procedura contemporanea per il modello A.

PARAMETRO	VALORE	UDM
$\mu_{max}$	0.037	$h^{-1}$
$K_I$	11.879	$\mu E m^{-2} s^{-1}$
$C_1$	0.028	$m^2 s g_{bio} \mu E^{-1} L^{-1}$
$C_2$	4.332	-



**Figura 4.2.** Rappresentazione dei dati sperimentali e della simulazione ottenuta dalla stima contemporanea dei parametri  $\mu_{\max}$ ,  $K_I$ ,  $C_1$  e  $C_2$  nel modello A.

#### 4.4.1.3 Confronto tra stima separata e stima contemporanea del modello A

Il confronto tra le simulazioni viene fatto attraverso sia un'analisi visiva dell'andamento delle curve sia attraverso il calcolo della deviazione standard; quest'ultimo metodo deve essere sempre associato all'analisi visiva dell'andamento, perché la deviazione standard totale è calcolata sommando l'errore per ogni dato sperimentale della curva nel seguente modo:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (c_x - c_x^*)^2}{N}}, \quad (4.1)$$

dove:

- $\sigma$ : deviazione standard [ $\text{g}_{\text{bio}} \text{L}^{-1}$ ];
- $N$ : numero di dati stimati [-];
- $c_x$ : dato di concentrazione ottenuto dalla prova sperimentale [ $\text{g}_{\text{bio}} \text{L}^{-1}$ ];
- $c_x^*$ : dato di concentrazione ottenuto dalla stima [ $\text{g}_{\text{bio}} \text{L}^{-1}$ ].

Dall'analisi dell'equazione (4.1) si deduce che le stime possono avere una deviazione standard simile anche se l'andamento riprodotto è diverso.

Per quanto riguarda l'analisi visiva, si ha che la fase di crescita esponenziale è rappresentata da entrambe le stime; per quanto riguarda invece la fase stazionaria, entrambe le simulazioni non riproducono il reale flesso della curva dei dati sperimentali,



tranne nel caso della curva a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ottenuta dalla stima separata, in cui la simulazione riproduce la forma sigmoidale ottenuta dagli esperimenti.

In Tabella 4.6 vengono riportate le deviazioni standard per ogni curva in entrambe le stime.

**Tabella 4.6.** Deviazioni standard per ogni curva in entrambe le stime per il modello A.

<b>STIMA SEPARATA</b>				
$I_0$ [ $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	46	120	150	<b>TOTALE</b>
$\sigma$ [ $\text{g}_{\text{bio}} \text{L}^{-1}$ ]	0.161	0.073	0.238	<b>0.171</b>
<b>STIMA CONTEMPORANEA</b>				
$I_0$ [ $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	46	120	150	<b>TOTALE</b>
$\sigma$ [ $\text{g}_{\text{bio}} \text{L}^{-1}$ ]	0.0964	0.107	0.105	<b>0.103</b>

Dall'analisi delle deviazioni standard, si deduce che la stima separata permette di ottenere una riproduzione più accurata per la curva a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mentre la stima contemporanea rappresenta meglio le curve a  $46 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; ciò è confermato dall'osservazione dei grafici. Il confronto dei valori di deviazione standard totali evidenzia il fatto che la stima contemporanea è più precisa della stima separata; si può perciò dedurre che la crescita nella fase esponenziale sia influenzata dalla limitazione che la luce provoca nella fase stazionaria.

Per quanto riguarda i valori dei parametri stimati, si può fare un confronto tra  $\mu_{\text{max}}$  e  $K_I$  ottenuti in gPROMS® rispetto a quelli ricavati dai dati conseguiti dalle prove sperimentali. Il valore di  $\mu_{\text{max}}$  ricavato dagli esperimenti è stato ottenuto introducendo nel grafico a  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (curva che presenta la maggiore crescita massima) una retta interpolante i dati di crescita ottenuti in fase esponenziale e ricavandone il coefficiente angolare; infatti, essendo una crescita esponenziale, l'integrazione porta alla seguente equazione:

$$\ln c_x = \mu_{\text{max}} \cdot t + \ln c_x^0. \quad (4.2)$$

Per quanto riguarda il valore di  $K_I$  ottenuto dai dati sperimentali, si considera che esso esprime l'intensità di luce alla quale si ha la velocità di crescita pari a metà di quella massima; tale parametro si ottiene dividendo  $\mu_{\text{max}}$  per due e valutandone la relativa intensità di luce in Figura 2.8.

In entrambe le stime si ottiene un valore di  $\mu_{\text{max}}$  superiore a quello ottenuto con la procedura appena descritta, pari a  $\sim 0.023 \text{ h}^{-1}$ ; al contrario, il valore di  $K_I$  ottenuto dalla

stima separata ( $67.258 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) è molto più realistico di quello ottenuto dalla stima contemporanea ( $11.8791 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), perché risulta simile al valore ottenuto dalla procedura appena descritta, pari a  $\sim 70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

#### 4.4.2 Modello B

La stima dei parametri per il modello B è stata effettuata modificando le equazioni costitutive perché, benché il modello sia stato creato per rappresentare la crescita di alghe anche quando la luce diventa limitante, le stime effettuate senza modificare le equazioni che lo costituiscono, hanno portato ai risultati in Figura 4.3.

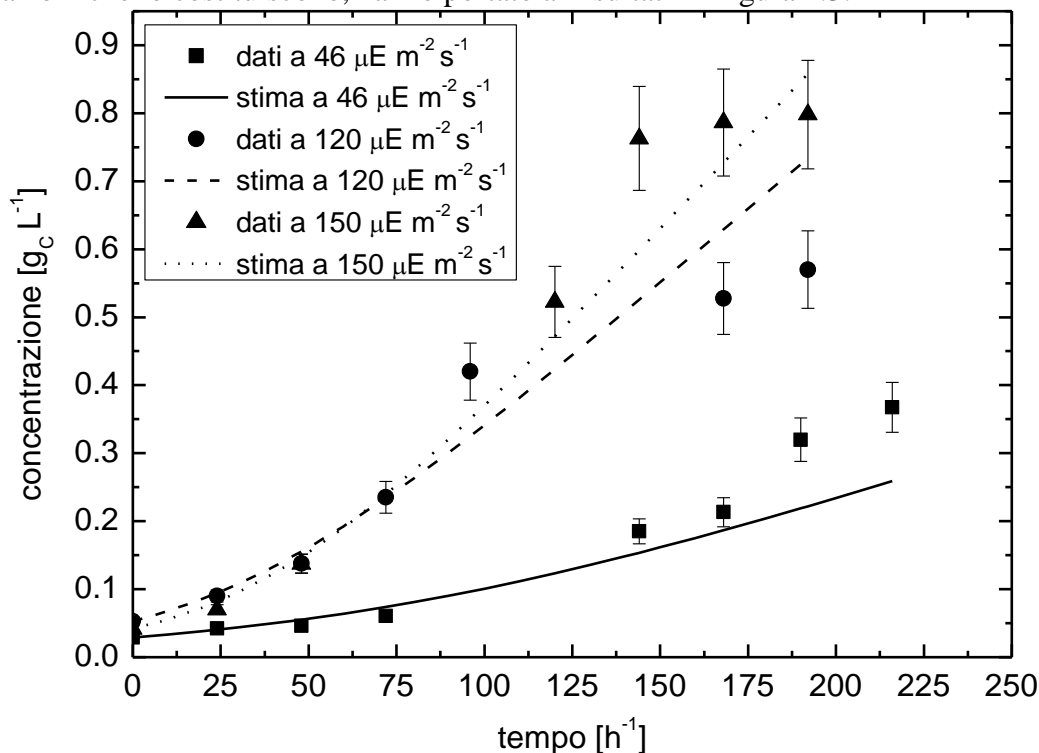


Figura 4.3. Stima dei parametri del modello B senza modifica delle equazioni.

Dall'analisi della Figura 4.3 è evidente che il modello riproduce la fase di crescita esponenziale ma non quella stazionaria; si è deciso perciò di moltiplicare la velocità di fissazione del carbonio per l'equazione (3.5), imponendo la crescita nulla quando la luce diventa limitante. L'equazione risultante è la seguente:

$$P_C = P_{C\_calc} \cdot \left[ 1 - \exp\left(\frac{-\alpha \cdot \phi_m \cdot \bar{I}}{P_{C\_calc}}\right) \right] \cdot \left( 1 - \frac{c_x}{C_1 \cdot I_0} \right)^{C_2} \quad (4.3)$$

Successivamente alla modifica, la stima dei parametri è stata effettuata con la stessa logica seguita per il modello A: inizialmente si fa una stima separata in cui si calcolano

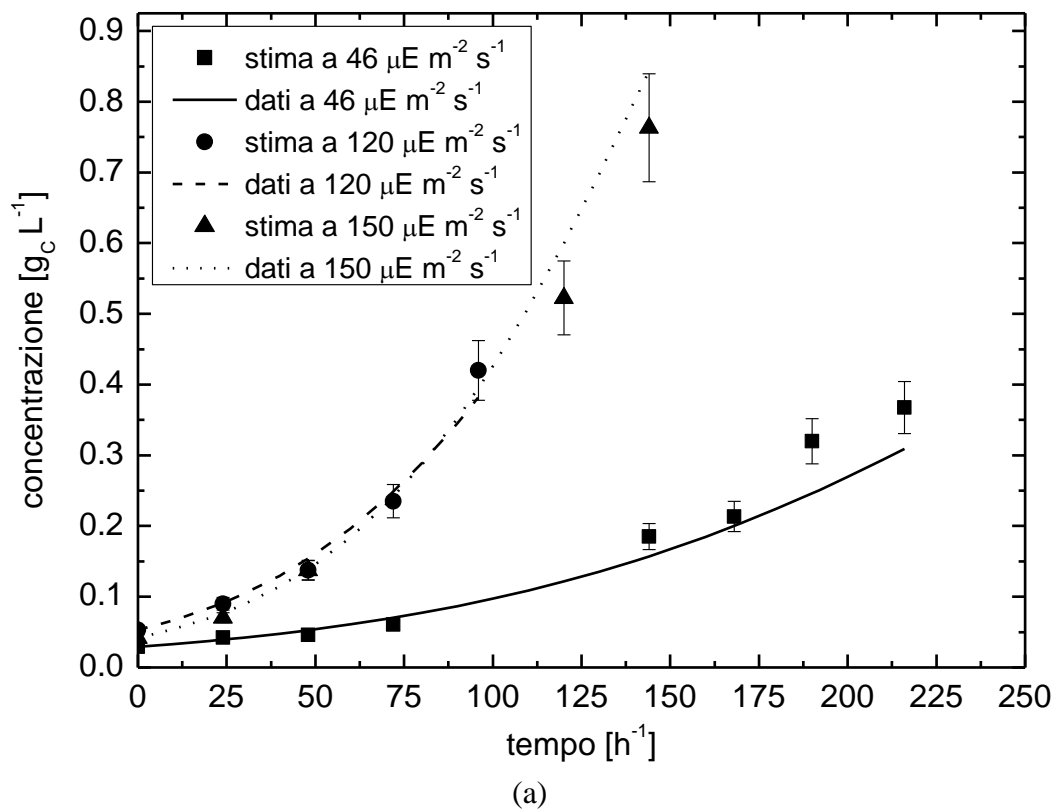
prima i parametri per rappresentare la fase esponenziale e poi la fase stazionaria, successivamente si effettua una stima contemporanea di tutti i parametri.

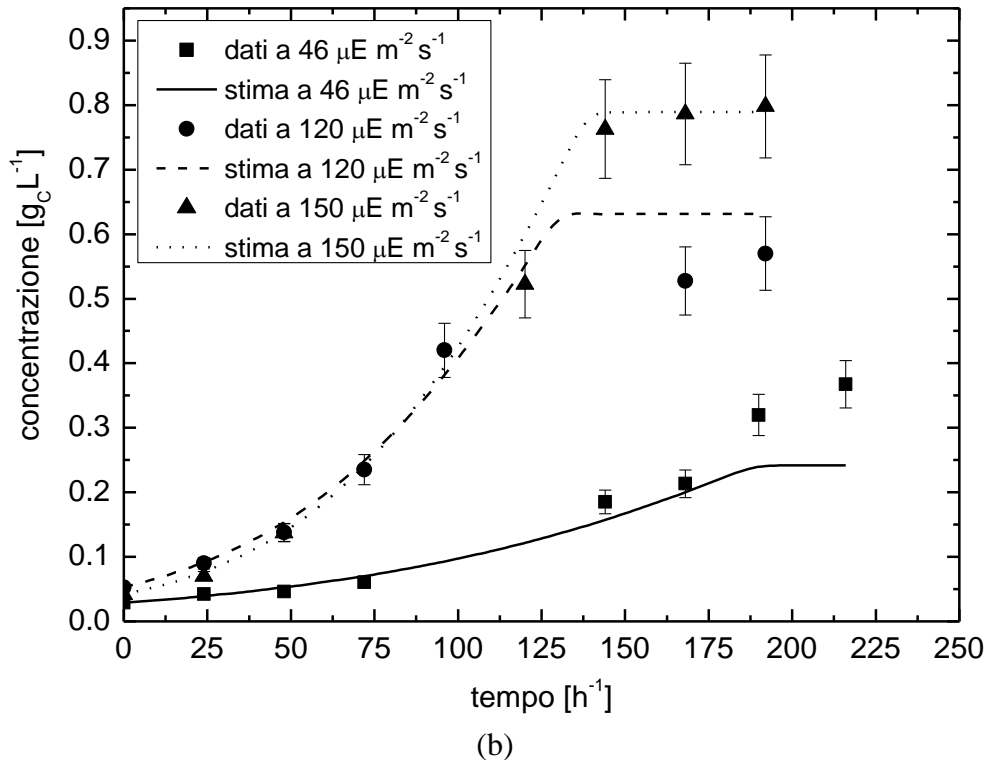
#### 4.4.2.1 Stima separata

La procedura utilizzata nella stima separata è la medesima utilizzata per il modello A in §4.4.1.1: inizialmente si effettua la stima dei parametri  $\mu_{\max}$  e  $\alpha$  per rappresentare i dati della fase di crescita esponenziale assumendo che essa non sia influenzata dalla fase stazionaria; si eliminano perciò i dati di crescita di quest'ultima regione.

Successivamente si aggiungono i dati tolti per la prima stima, si fissano i parametri ottenuti nella rappresentazione della fase esponenziale e si stimano  $C_1$  e  $C_2$ .

I risultati sono rappresentati in Figura 4.4.





**Figura 4.4.** Rappresentazione dei dati sperimentali e della simulazione ottenuta dalla stima separata dei parametri del modello B; in (a) si rappresenta la fase di stima di  $\mu_{max}$  e  $\alpha$  mentre in (b) si rappresenta la fase successiva in cui si fissano i valori di appena ottenuti e si stimano  $C_1$  e  $C_2$ .

Dall'analisi della Figura 4.4a si constata che il modello riproduce in modo accurato la fase di crescita esponenziale mentre; lo step successivo viene invece rappresentato in Figura 4.4b e si nota che l'introduzione di  $C_1$  e  $C_2$  provoca la formazione di un flesso in modo da rappresentare i dati a stazionario; per quanto riguarda quest'ultimo aspetto, la fase stazionaria viene ben rappresentata per le curve a intensità pari a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mentre, per la curva con intensità pari a  $46 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , la stima considera una concentrazione a stazionario inferiore rispetto a quella misurata nelle analisi sperimentali.

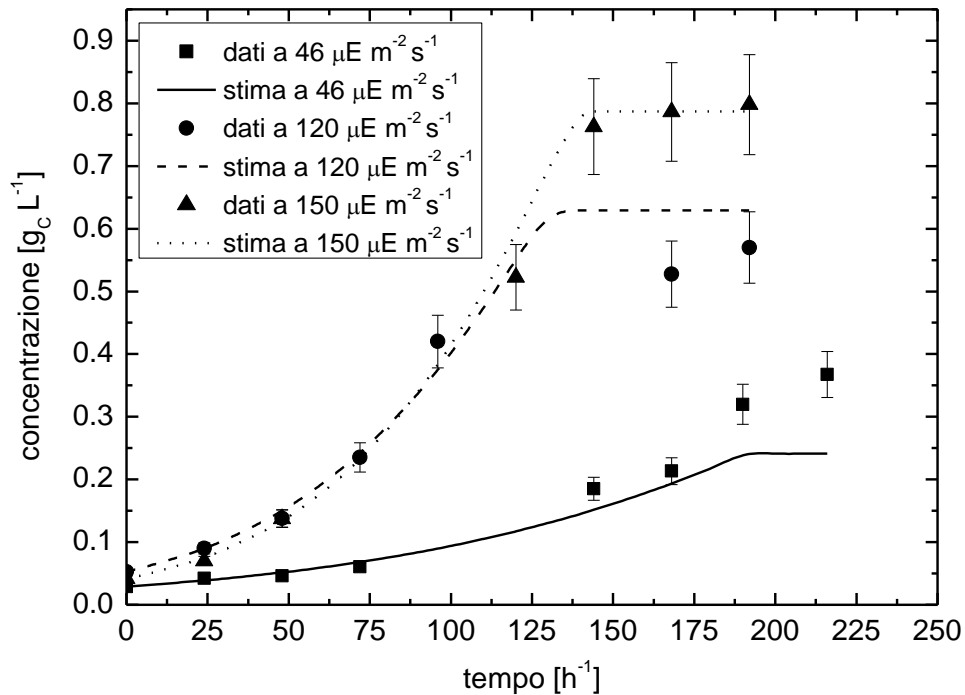
I valori dei parametri stimati sono riportati in Tabella 4.7:

**Tabella 4.7.** Valori stimati dei parametri nella procedura separata per il modello B

PARAMETRO	VALORE	UDM
$\mu_{max}$	0.027	$\text{h}^{-1}$
$\alpha$	0.241	$\text{m}^2 \text{g}_{\text{bio}}^{-1}$
$C_1$	0.011	$\text{m}^2 \text{s g}_C \mu\text{E}^{-1} \text{L}^{-1}$
$C_2$	43.394	-

#### 4.4.2.2 Stima contemporanea

La stima contemporanea di  $\mu_{\max}$ ,  $\alpha$ ,  $C_1$  e  $C_2$  si basa sull'ipotesi che anche la fase di crescita esponenziale sia influenzata da come la luce diventa limitante nella regione stazionaria. Il confronto tra dati sperimentali e le curve stimate viene riportato in Figura 4.5.



**Figura 4.5.** Rappresentazione dei dati sperimentali e della simulazione ottenuta dalla stima contemporanea dei parametri  $\mu_{\max}$ ,  $\alpha$ ,  $C_1$  e  $C_2$  nel modello B.

La Figura 4.5 è simile alla Figura 4.4b, ovvero la stima permette di riprodurre i dati delle fasi di crescita esponenziale e stazionaria per le curve a  $120 \mu E m^{-2} s^{-1}$  e  $150 \mu E m^{-2} s^{-1}$  mentre, per la curva con intensità pari a  $46 \mu E m^{-2} s^{-1}$ , vengono rappresentati i primi dati ma non la stazionarietà.

I valori dei parametri stimati sono riportati in Tabella 4.8:

**Tabella 4.8.** Valori stimati dei parametri nella procedura contemporanea per il modello B.

PARAMETRO	VALORE	UDM
$\mu_{\max}$	0.0262	$h^{-1}$
$\alpha$	0.196	$m^2 g_{\text{bio}}^{-1}$
$C_1$	0.010	$m^2 s g_{\text{bio}} \mu E^{-1} L^{-1}$
$C_2$	119.064	-

#### 4.4.2.3 Confronto tra stima separata e stima contemporanea del modello B

Il confronto tra le simulazioni viene fatto attraverso un'analisi visiva dell'andamento delle curve e attraverso il calcolo della deviazione standard.

Per quanto riguarda l'analisi visiva, è evidente che le curve in Figura 4.4 e 4.5 sono molto simili e, come affermato precedentemente, la stima permette di riprodurre i dati delle fasi di crescita esponenziale e stazionaria per le curve a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mentre, per la curva con intensità pari a  $46 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , vengono rappresentati i primi dati ma non la stazionarietà.

In Tabella 4.9 vengono riportate le deviazioni standard per ogni curva in entrambe le stime; i valori sono stati convertiti (assumendo valida l'ipotesi di Quinn, 2010 secondo cui la biomassa è composta per il 50% da carbonio) da  $[\text{g}_C \text{L}^{-1}]$  a  $[\text{g}_{\text{bio}} \text{L}^{-1}]$  per poter confrontare risultati ottenuti nei diversi modelli.

**Tabella 4.9.** Deviazioni standard per ogni curva in entrambe le stime per il modello B.

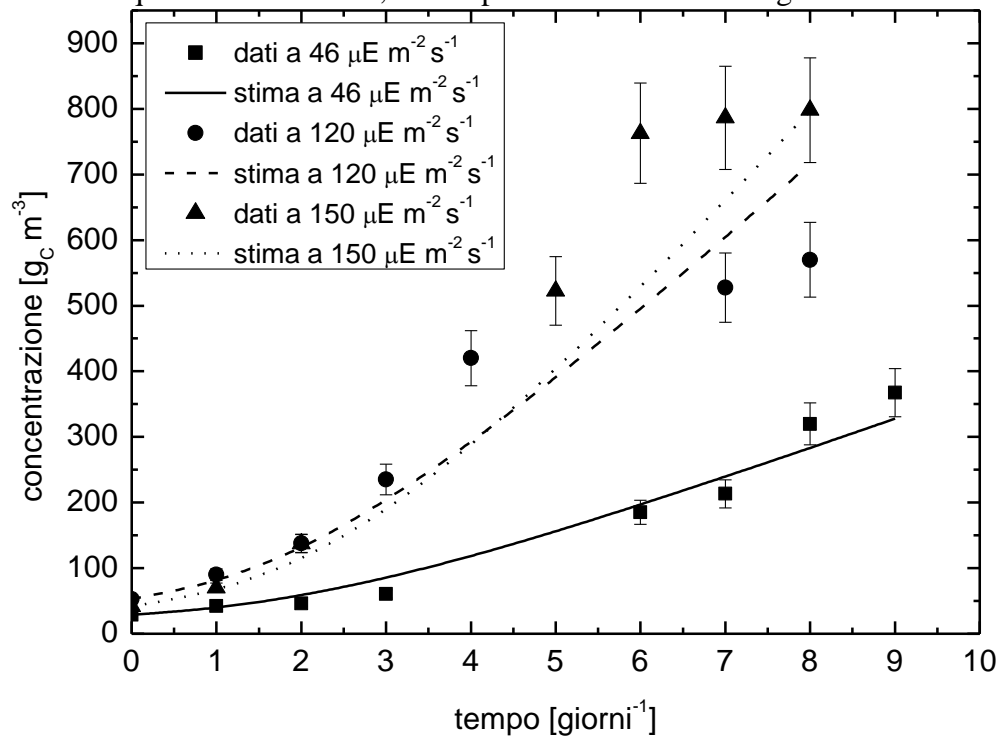
STIMA SEPARATA				
$I_0$ [ $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	46	120	150	<b>TOTALE</b>
$\sigma$ [ $\text{g}_{\text{bio}} \text{L}^{-1}$ ]	0.108	0.097	0.062	<b>0.092</b>
STIMA CONTEMPORANEA				
$I_0$ [ $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	46	120	150	<b>TOTALE</b>
$\sigma$ [ $\text{g}_{\text{bio}} \text{L}^{-1}$ ]	0.110	0.096	0.057	<b>0.092</b>

Anche dall'analisi della deviazione standard totale si conclude che le stime portano allo stesso risultato, diversamente da quanto ottenuto nel modello A. Probabilmente la deviazione standard calcolata per la curva a  $46 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  è simile alle precedenti perché somma l'accuratezza della rappresentazione dei dati all'inizio della crescita (perciò errori piccoli) con l'incapacità di produzione nella fase stazionaria (errori grandi).

Per quanto riguarda i valori dei parametri stimati, in entrambe le stime si ottiene un valore di  $\mu_{\text{max}}$  leggermente superiore a quello ottenuto dalle prove sperimentali, che, come definito per il modello A, risulta pari a  $\sim 0.023 \text{ h}^{-1}$ ; anche il valore di  $\alpha$  risulta superiore al valore indicato dall'articolo ( $0.075 \text{ m}^2 \text{g}_{\text{bio}}^{-1}$ ) e al valore della misura di laboratorio ( $0.05 \text{ m}^2 \text{g}_{\text{bio}}^{-1}$ ) ottenuto valutando con lo spettrofotometro la trasmittanza caratteristica delle colture sottoposte alle prove sperimentali. I valori dei parametri  $C_1$  e  $C_2$  sono rappresentativi del fatto che il modello agisce basandosi su una struttura "on-off"; ciò significa che quando l'intensità di luce diventa tale da portare alla fase stazionaria, l'equazione (3.5) diventa preponderante rispetto alla crescita e ciò porta alla formazione di un flesso particolarmente pronunciato.

#### 4.4.3 Modello C

La stima dei parametri per il modello C ha presentato gli stessi problemi riscontrati nella stima del modello B: benché il modello sia stato creato per rappresentare la crescita di alghe anche quando la luce diventa limitante, le stime effettuate senza modificare le equazioni costitutive, hanno portato ai risultati in Figura 4.6.



**Figura 4.6.** Stima dei parametri del modello C senza modifica delle equazioni.

Dall'analisi della Figura 4.6 si nota che il modello riproduce la fase di crescita esponenziale ma peggiora la stima all'aumentare dell'intensità di luce; inoltre risulta evidente l'incapacità di rappresentare i dati sperimentali nella regione in cui la crescita è stazionaria. Si è deciso perciò di moltiplicare la velocità di crescita (presente nel bilancio di azoto intracellulare, di carbonio intracellulare e nell'equazione dell'intensità di luce) delle microalghe per l'equazione (3.5), imponendo la crescita nulla quando la luce diventa limitante. Il sistema risultante è il seguente:

$$\begin{aligned}
\frac{dc_N}{dt} &= D \cdot c_N^{in} - \bar{\rho} \cdot \frac{c_N}{c_N + K_N} \cdot \left(1 - \frac{q}{Q_l}\right) \cdot c_C - D \cdot c_N \\
\frac{dq}{dt} &= \bar{\rho} \cdot \frac{c_N}{c_N + K_N} \cdot \left(1 - \frac{q}{Q_l}\right) - \bar{\mu} \cdot \left(1 - \frac{c_x}{C_1 \cdot I_0}\right)^{C_2} \cdot (q - Q_0) \\
\frac{dc_C}{dt} &= \bar{\mu} \cdot \left(1 - \frac{c_x}{C_1 \cdot I_0}\right)^{C_2} \cdot \left(1 - \frac{Q_0}{q}\right) \cdot c_C - D \cdot c_C - R_C \cdot c_C \\
\frac{dI^*}{dt} &= \bar{\mu} \cdot \left(1 - \frac{c_x}{C_1 \cdot I_0}\right)^{C_2} \cdot \left(1 - \frac{Q_0}{q}\right) \cdot (\bar{I} - I^*)
\end{aligned} \tag{4.4}$$

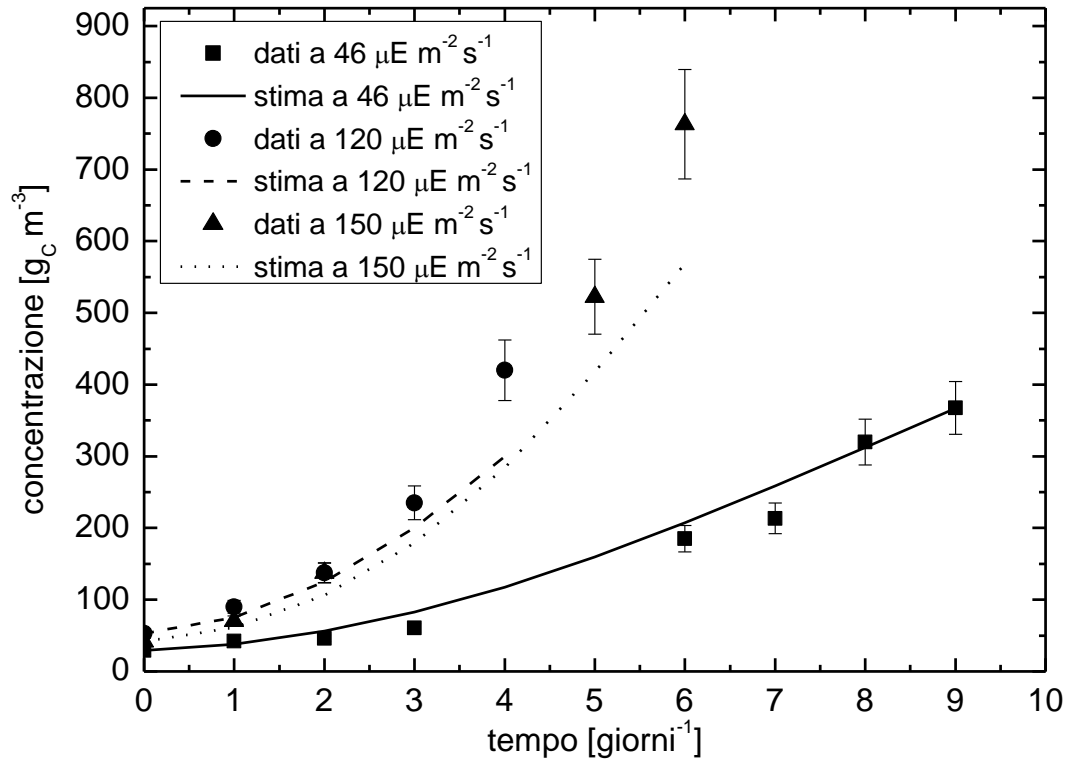
Successivamente alla modifica, la stima dei parametri è stata effettuata con la stessa logica seguita per i modelli A e B: inizialmente si fa una stima separata in cui si calcolano, prima i parametri per rappresentare la fase esponenziale e poi la fase stazionaria, successivamente si effettua una stima contemporanea di tutti i parametri.

#### 4.4.3.1 Stima separata

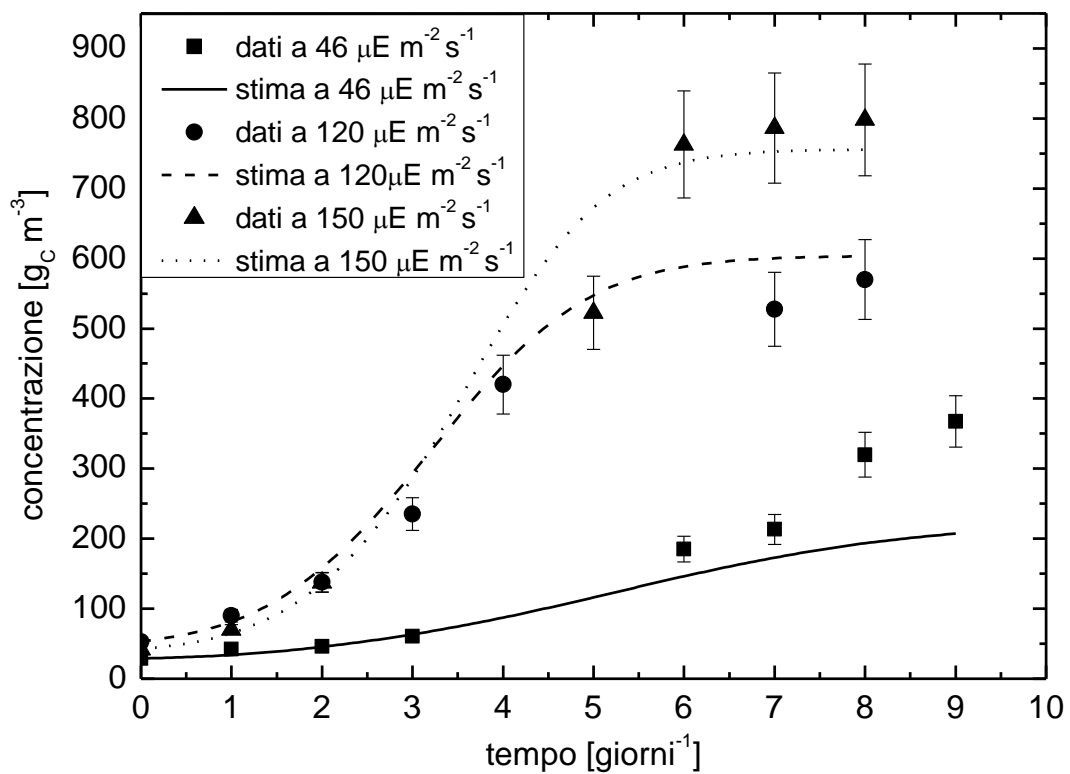
La procedura utilizzata nella stima separata è la medesima utilizzata per i modelli A e B: inizialmente si effettua la stima dei parametri  $\tilde{\mu}$ ,  $K_{sl}^*$ ,  $a$  e  $b$  per rappresentare i dati nella fase di crescita esponenziale assumendo che essa non sia influenzata dalla fase stazionaria; si eliminano perciò i dati di crescita di quest'ultima regione. Successivamente si aggiungono i dati tolti per la prima stima, si fissano i parametri ottenuti nella rappresentazione della fase esponenziale e si stimano  $C_1$  e  $C_2$ .

Le simulazioni conseguenti alle stime sono presentate in Figura 4.7.





(a)



(b)

**Figura 4.7.** Rappresentazione dei dati sperimentali e della simulazione ottenuta dalla stima separata dei parametri del modello C; in (a) si rappresenta la fase di stima di  $\tilde{\mu}$ ,  $K_{sl}^*$ ,  $a$  e  $b$  mentre in (b) si rappresenta la fase successiva in cui si fissano i valori di appena ottenuti e si stimano  $C_1$  e  $C_2$ .

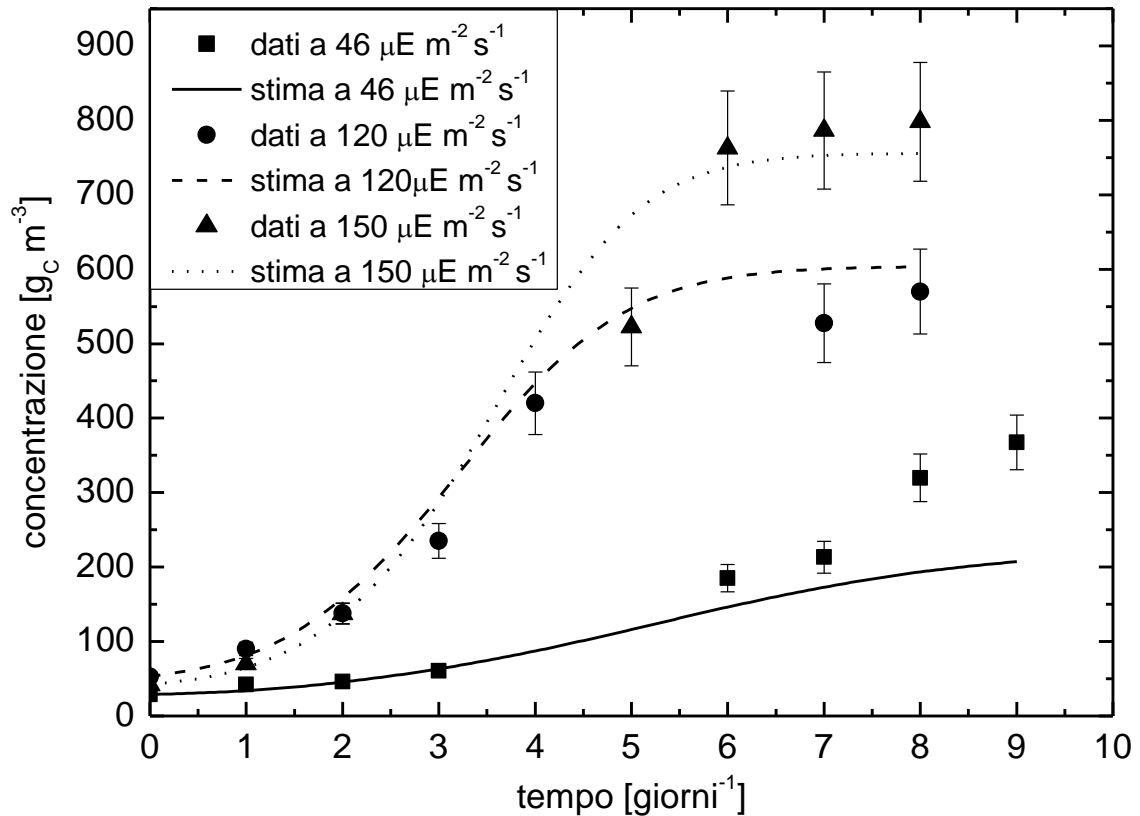
Dall'analisi di Figura 4.7a si nota che il modello tende a sottostimare la crescita nella fase esponenziale all'aumentare dell'intensità di luce, soprattutto per le curve a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; nella Figura 4.7b si nota invece che la modifica delle equazioni costitutive permette di migliorare la riproduzione dei dati nella fase di crescita esponenziale per le curve appena citate e di rappresentare la fase stazionaria; si ha però un peggioramento della riproduzione dei dati a  $46 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . I valori dei parametri stimati sono riportati in Tabella 4.10:

**Tabella 4.10.** Valori stimati dei parametri nella procedura separata per il modello C.

PARAMETRO	VALORE	UDM
$\tilde{\mu}$	111.829	giorni <sup>-1</sup>
$K_{st}^*$	105.607	$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
$a$	66.361	$\text{m}^2 \text{gChl}^{-1}$
$b$	0	$\text{m}^{-1}$
$C_1$	5.061	$\text{m}^2 \text{s g}_C \mu\text{E}^{-1} \text{m}^{-3}$
$C_2$	0.009	-

#### 4.4.3.2 Stima contemporanea

La stima contemporanea di  $\tilde{\mu}$ ,  $K_{st}^*$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $C_1$  e  $C_2$  si basa sull'ipotesi che anche la fase di crescita esponenziale sia influenzata da come la luce diventa limitante nella regione stazionaria. Il confronto tra dati sperimentali e le curve stimate viene riportato in Figura 4.8.



**Figura 4.8.** Rappresentazione dei dati sperimentali e della simulazione ottenuta dalla stima contemporanea dei parametri  $\tilde{\mu}$ ,  $K_{st}^*$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $C_1$  e  $C_2$  del modello C.

Dall'analisi della Figura 4.8, si nota che la simulazione ottenuta dalla stima riproduce in modo accurato i dati della curva a  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sovrastima leggermente la fase stazionaria della curva a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e non rappresenta la parte finale della curva a  $46 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$

I valori dei parametri stimati sono riportati in Tabella 4.11:

**Tabella 4.11.** Valori stimati dei parametri nella procedura contemporanea per il modello C.

PARAMETRO	VALORE	UDM
$\tilde{\mu}$	127.286	giorni <sup>-1</sup>
$K_{st}^*$	194.623	$\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$
$a$	0	$\text{m}^2 \text{gChl}^{-1}$
$b$	2.083	$\text{m}^{-1}$
$C_1$	5.304	$\text{m}^2 \text{s g}_C \mu\text{E}^{-1} \text{m}^{-3}$
$C_2$	0.015	-

#### 4.4.3.3 Confronto tra stima separata e stima contemporanea del modello C

Il confronto tra le simulazioni viene fatto attraverso un'analisi visiva dell'andamento delle curve e attraverso il calcolo della deviazione standard.

Per quanto riguarda l'analisi visiva, si nota che la curva a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  è rappresentata più accuratamente nella stima separata, mentre i dati della curva a  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  vengono simulati meglio dalla stima contemporanea. Per quanto riguarda invece la curva a  $46 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , in entrambi i casi si sottostima la crescita nella parte finale della curva (soprattutto la stima separata).

In Tabella 4.12 vengono riportate le deviazioni standard per ogni curva in entrambe le stime; i valori sono stati convertiti (assumendo valida l'ipotesi di Quinn, 2010 secondo cui la biomassa è composta per il 50% da carbonio) da  $[\text{g}_C \text{m}^{-3}]$  a  $[\text{g}_{\text{bio}} \text{L}^{-1}]$  per poter confrontare risultati ottenuti nei diversi modelli.

**Tabella 4.12.** Deviazioni standard per ogni curva in entrambe le stime per il modello C.

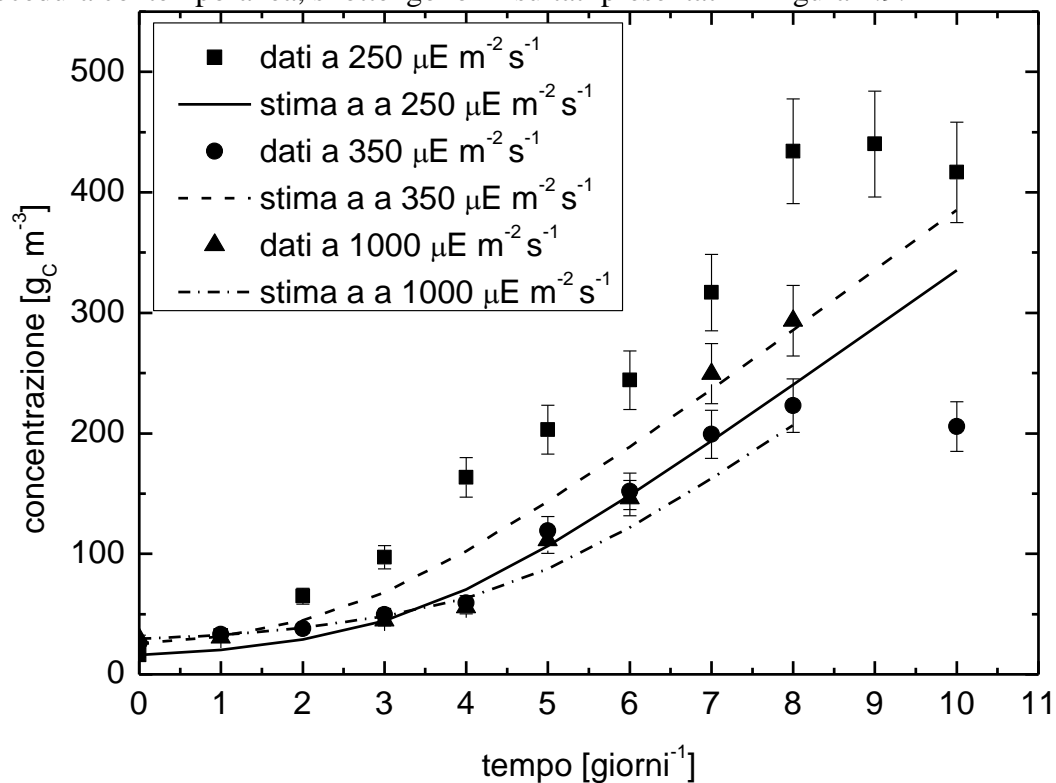
STIMA SEPARATA				
$I_0$ [ $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	46	120	150	<b>TOTALE</b>
$\sigma$ [ $\text{g}_{\text{bio}} \text{L}^{-1}$ ]	0.150	0.079	0.123	<b>0.122</b>
STIMA CONTEMPORANEA				
$I_0$ [ $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	46	120	150	<b>TOTALE</b>
$\sigma$ [ $\text{g}_{\text{bio}} \text{L}^{-1}$ ]	0.123	0.093	0.083	<b>0.102</b>

L'analisi della deviazione standard porta alle stesse considerazioni ottenute nell'analisi visiva; il confronto tra stima separata e contemporanea evidenzia, infatti, una deviazione standard della curva a  $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  superiore rispetto a quella della stima separata, mentre per le altre due curve il risultato è l'opposto. Il confronto dei valori di deviazione standard totale, come nel modello A, evidenzia il fatto che la stima contemporanea è più precisa della stima separata; si può perciò dedurre che la crescita nella fase esponenziale sia influenzata dalla limitazione che la luce provoca nella fase stazionaria.

Per quanto riguarda i valori dei parametri stimati, in entrambe le stime si ottengono valori molto superiori rispetto a quelli presentati in Tabella 4.3, ma probabilmente ciò è perché in quel caso sono parametri definiti per *Isochrysis galbana*, cioè per un'alga completamente diversa.

#### 4.4.3.4 Stima inibizione

Il modello C, contrariamente ai modelli A e B, rappresenta la fotoinibizione attraverso il coefficiente di inibizione  $K_{il}$ , perciò si è stimato tale valore introducendo tra i dati sperimentali anche quelli ottenuti per le curve fotoinibite a  $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; anche in questo caso sono state seguite una procedura in cui si fissano i valori ottenuti e si stima  $K_{il}$  e un'altra in cui i parametri vengono stimati insieme. Per la procedura separata il software non permette di ottenere una stima perché la variazione di un solo parametro non permette di rappresentare i dati; per quanto riguarda invece la procedura contemporanea, si ottengono i risultati presentati in Figura 4.9.



**Figura 4.9.** Rappresentazione dei dati sperimentali e della simulazione ottenuta dalla stima contemporanea dei parametri  $\tilde{\mu}$ ,  $K_{st}^*$ ,  $a$ ,  $b$ ,  $C_1$ ,  $C_2$  e  $K_{il}$  del modello C.

La Figura 4.9 evidenzia l'incapacità del modello di rappresentare le curve fotoinibite ottenute dai dati sperimentali; ciò è confermato dai valori di deviazione standard riportati in Tabella 4.13, calcolati per tutte le intensità di luce.

**Tabella 4.13.** Deviazioni standard per ogni curva per la stima contemporanea considerando anche la fotoinibizione.

STIMA CONTEMPORANEA							
$I_0$ [ $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	46	120	150	250	350	1000	<b>TOTALE</b>
$\sigma$ [ $g_C m^{-3}$ ]	0.112	0.304	0.672	0.193	0.141	0.110	<b>1.532</b>

## 4.5 Confronto tra i modelli

I risultati ottenuti dalle stime descritte nei precedenti paragrafi possono essere confrontati tra loro considerando sia l'andamento della crescita ottenuta dalla stima, sia in termini di deviazione standard. Per quanto riguarda l'andamento visivo, il modello che riproduce nel modo migliore i dati sperimentali è il modello C; infatti il modello A non rappresenta accuratamente lo stazionario mentre il modello B stima un andamento forzato delle curve di crescita, diverso dalla forma a sigmoide che si ottiene dalla misura diretta nelle colture.

Per quanto riguarda invece le deviazioni standard riportate in Tabella 4.14, i valori sono molto simili, sia tra i diversi tipi di stima, sia tra i vari modelli; risulta perciò complicato valutare quale sia il miglior modello semplicemente basandosi sulla valutazione di esse, soprattutto perché, come sottolineato nei paragrafi precedenti, anche se un modello presenta valori di deviazione standard inferiori rispetto ad un altro, non significa che esso riproduca meglio tutti i dati di una curva (infatti il modello B presenta la deviazione standard minima ma riproduce i dati sperimentali in un modo non realistico); si può comunque constatare che nei modelli A e C la stima contemporanea comporta una deviazione standard inferiore, da cui si può dedurre che la fase esponenziale sia influenzata dalla fase stazionaria.

**Tabella 4.14.** Deviazioni standard per entrambe le stime in tutti i modelli.

	MODELLO A		MODELLO B		MODELLO C	
	Stima separata	Stima contemporanea	Stima separata	Stima contemporanea	Stima separata	Stima contemporanea
$\sigma$ totale [g <sub>bio</sub> L <sup>-1</sup> ]	0.171	0.103	0.092	0.092	0.121	0.102

Un aspetto comune a tutti i modelli è la capacità di rappresentare la crescita delle colture a intensità di luce pari a 46  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  solo precedentemente alla modifica delle equazioni costitutive; si deduce perciò che la descrizione della fase stazionaria sia più complessa rispetto a come viene fatto con l'equazione (3.5), e tenga in considerazione fattori non rappresentati nel modello.

Un ulteriore aspetto che risulta necessario considerare è il fatto che i modelli B e C dovrebbero essere in grado di rappresentare la crescita delle microalghe senza le modifiche effettuate in §4.4.2 e in §4.4.3; ciò può non avvenire per due motivi: perché i modelli in considerazione sono inadeguati per rappresentare il sistema studiato oppure perché vengono trascurati altri fattori che potrebbero limitare la crescita. Le prove sperimentali sono state effettuate in eccesso di nutrienti, ma per scartare in via definitiva

la possibilità che essi siano in qualche modo responsabili della diminuzione della crescita, si consiglia di svolgere delle prove sperimentali in cui si mantiene costante l'intensità di luce e si monitora la concentrazione di uno dei nutrienti, mantenendo abbondante la concentrazione degli altri.

In conclusione il modello del Capitolo 3 che rappresenta più accuratamente la crescita delle microalghe è il modello C modificato, anche se non si riescono a rappresentare le colture fotoinibite; risulta però opportuno effettuare delle modifiche sulla rappresentazione dello stazionario per riprodurre la crescita a basse intensità di luce e svolgere un'analisi radicale sul significato dei parametri utilizzati per comprendere se i valori ottenuti dalla stima hanno un significato fisico.





# Conclusioni

L'obiettivo della Tesi è stato quello di studiare come varia la crescita delle microalghe in funzione della luce e di identificare un modello per predire tale comportamento.

L'analisi sperimentale è stata svolta in reattori semi-batch, coltivando colture di *Nannochloropsis salina* in terreni con concentrazione di nutrienti non limitanti. Sono state eseguite due tipologie di prove sperimentali: una a luce continua con intensità variabile (da  $5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e una a luce pulsata, modificando la durata dell'impulso per ogni prova attraverso la variazione della frequenza di pulsazione (da 1 Hz a 30 Hz) e del rapporto luce-buio (da 1:9 a 1:3). Per ogni prova sperimentale sono state inoltre effettuate misure dell'efficienza fotosintetica e della concentrazione di pigmenti (clorofilla *a* e carotenoidi). I risultati evidenziano che per gli esperimenti a luce continua la velocità di crescita e la concentrazione nella fase stazionaria aumentano all'aumentare dell'intensità di luce fino a  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; al di sopra di tale valore, le colture microalgali sono fotoinibite. Per quanto riguarda, invece, le prove sperimentali a luce pulsata, si ottiene che, a parità di intensità di luce, la velocità di crescita e la concentrazione in fase stazionaria aumentano al diminuire della durata dell'impulso, fino a raggiungere i valori ottenuti per le prove a luce continua. Si è inoltre verificato che in condizioni di luce pulsata le microalghe possono resistere e crescere anche se l'intensità di luce è superiore a quella critica di fotoinibizione. Questo risultato può essere rilevante dal punto di vista industriale in quanto può essere sfruttato nella progettazione di fotobioreattori in grado di realizzare livelli di mixing (e quindi di cicli luce-buio) ottimali.

Nell'attività di identificazione di modelli predittivi sulla cinetica di crescita microalgale sono stati studiati ed implementati nel simulatore di processo gPROMS<sup>®</sup> tre modelli: il modello A è stato ottenuto dall'accoppiamento di due equazioni di letteratura e descrive solamente come la crescita varia in funzione della luce, mentre i modelli B e C, pubblicati nel 2011, rappresentano lo stato dell'arte nella descrizione dei fenomeni di crescita delle microalghe. La stima dei parametri maggiormente influenti nella descrizione della relazione tra coltura e luce, è stata eseguita basandosi sui dati ottenuti per l'analisi sperimentale, in particolare per le curve a luce continua a 46, 120 e  $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Le curve fotoinibite, ovvero quelle in cui il sistema è stato sottoposto a intensità di luce pari a 250, 350 e  $1000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sono state utilizzate solo per il modello C, il solo che consideri anche il fenomeno di fotoinibizione. I risultati della stima rivelano una scarsa capacità del modello A di rappresentare i dati sperimentali, dovuta probabilmente all'eccessiva semplicità del modello stesso. Anche i modelli B e C,

benché siano i più recenti e completi, riproducono efficacemente solo i dati sperimentali della fase esponenziale e non quelli della fase stazionaria in cui la luce diventa limitante; è stato perciò necessario effettuare delle modifiche nelle equazioni costitutive. Il modello che riproduce i dati sperimentali nel modo migliore è il modello C, anche se il valore dei parametri stimati differisce notevolmente da quelli proposti nell'articolo dai cui è derivato e in alcuni casi è difficile fornire un'interpretazione fisica adeguata. I dati con foto inibizione non sono rappresentati in modo adeguato.

Per quanto riguarda gli sviluppi futuri è indispensabile effettuare un'analisi di tipo fondamentale sui parametri del modello di C per approfondirne il significato fisico e assicurare la fondatezza fisica dei parametri stimati; inoltre, è necessario modificare ulteriormente la relazione che descrive la fase stazionaria per rappresentare adeguatamente le curve di crescita a basse intensità di luce. Si propone, inoltre, di eseguire ulteriori prove sperimentali imponendo un'intensità di luce ottimale e analizzando come varia la crescita delle microalghe in funzione di altre variabili operative (per esempio la concentrazione di azoto) per valutare se i modelli sono in grado di riprodurre i dati sperimentali.

# Riferimenti bibliografici

- Alexandrov G. A., Y. Yamagata (2007). A peaked function for modeling temperature dependence of plant productivity. *Ecological Modelling.*, **200**, 189-92.
- Ambrose R. B. (2006). Wasp 7 benthic algae-model theory and users guide. *USEPA, office of research and development*. Athens, Georgia (U.S.A)
- Benemann J. (1997). CO<sub>2</sub> mitigation with microalgae system. *Energy Conversion and Management*, 475-479.
- Bailey J., D. F. Ollis (1986). *Biochemical engineering fundamentals*. McGraw-Hill Book Co., New York (U.S.A.).
- Bernard O. (2011). Hurdles and challenges for modelling and control of microalgae for CO<sub>2</sub> mitigation and biofuel production, *Journal of Process Control*, **3**, 1378-89.
- Bernard O., P. Masci, A. Sciandra (2009). A photobioreactor model in nitrose limited conditions. Presentato a: *Proceeding of the 6<sup>th</sup> Conference on Mathematical Modelling*, Vienna (Austria).
- Bozbas K. (2008). Biodiesel as an alternative motor fuel: Production and policies in the European Union. *Renewable and Sustainable Energy Review*, **12**, 542-52.
- Burmester D (1979). The unsteady continuous culture of phosphate-limited *monochrysis lutheri* droop: Experimental and theoretical analysis. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, **39** (2), 167-186.
- Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, **25**, 294-306.
- Clemens P. (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*, **9**, 165-177.
- Cornet J. F., C. G. Dussap, G. Dubertret (1992). A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina-platensis* in photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **40**, 817-825.
- Cornet J. F., C. G. Dussap, J. B. Gros, C. Binos, C. Lasseur (1995). A Simplified Monodimensional Approach for Modeling Coupling between Radiant Light Transfer and Growth-Kinetics in Photobioreactors. *Chemical Engineering Science*, **50**, 1489-1500.
- Dewful J., H. Van Langenhove (2006). *Renewables-based technology: sustainability assessment*. John Wiley & Sons, Hoboken (U.S.A).
- Droop M. R. (1968). Vitamin B12 and marine ecology.IV. The kinetics of uptake growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. **48** (3), 689-733.

- Droop M.R. (1983). 25 years of algal growth kinetics, a personal view. *Botanica Marina*, **16**, 99-112.
- Dubinsky Z., R. Matsukawa, I. Karube (1995). Photobiological aspects of algal mass culture. *Journal of Marine Biotechnology*, **2**, 61-65.
- Falkowski P. G. e T. G. Owens (1980). Light-shade adaptation: Two strategies in marine phytoplankton. *Plant physiology*, **66**, 592-95
- Fernández F. G. A., F. G. Camacho, J. A. S. Pérez, J. M. F. Sevilla, E. M. Grima (1997). A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnology and Bioengineering*, **55**, 701-14.
- Fisher T., J. Minnard, D. Iluz e Z. Dubinsky (1998). The kinetics of the photoacclimation of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyte): A study of change in ultrastructure and PSU density. *Journal of Phycology*, **34**, 818-24.
- Flynn K. J., K. Davidson, J. W. Leftley (1993). Carbon-nitrogen relations during batch growth of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) under alternating light and dark. *Journal of Applied Phycology*, **5**, 465-475.
- Fyfe D. (2011). Oil market report. *Technical report*, International Energy Agency.
- Geider R. J., B. A. Osborne (1991). *Algal photosynthesis: the measurement of gas exchange and related processes*. Chapman and Hall, New York. (U.S.A.).
- Geider R. J., H. L. MacIntyre, T. M. Kana (1997). Dynamic model of phytoplankton growth and acclimation: responses of the balanced growth rate and the chlorophyll a: carbon ratio to light, nutrient-limitation and temperature. *Marine Ecology Progress Series*, **148**, 187-200.
- Geider R., H. MacIntyre, T. Kana (1998). A dynamic regulatory model of phytoplanktonic acclimation to light, nutrients, and temperature. *Limnology and Oceanography*, **43**, 679-694.
- Gentile M. P. e H. W. Blanch (2001). Physiology and xanthophyll cycle activity of *Nannochloropsis gaditana*. *Biotechnology and Bioengineering*, **57**, 1-12.
- Hoffmann M., K. Marxen, R. Schulz, K. H. Vanselow (2010). TFA and EPA Productivities of *Nannochloropsis salina* Influenced by Temperature and Nitrate Stimuli in Turbidostatic Controlled Experiments. *Marine Drugs*, **8**, 2526-2545.
- Huisman J., H. C. P. Matthijs, P. M. Visser, H. Balke, C. A. M. Sigon, J. Passarge, F. J. Weissing, L. R. Mur (2002). Principles of the light-limited chemostat: theory and ecological applications. *Antoine Van Leeuwenhoek*, **81**, 117-133.
- Huisman J. e F. J. Weissing (1994). Light-limited growth and competition for light in well-mixed aquatic environments: an elementary model. *Ecology*, **75**, 507-520.

- Janssen M., L. de Bresser, T. Baijens, J. Tramper, L. R. Mur, J.F.H. Snel, R. H. Wijffels (2000b). Scale-up aspects of photobioreactors: effects of mixing-induced light/dark cycles. *Journal of Applied Phycology* **12**, 225–237.
- Ley A. C., D. C. Mauzeral (1982). Absolute absorption cross-sections for photosystem II and the minimum quantum requirement for photosynthesis in *Chlorella Vulgaris*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **680**, 95-106.
- Li Y., M. Horsman, N. Wu, C.Q. Lan, N. Dubois-Calero (2008). Biofuels from microalgae. *Biotechnoogy*, **24**, 815-20.
- Long S. P., S. Humphries, G. P. Falkowski (1994). Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiology, Plant Molecular Biology*, **45**, 633-62.
- Mairet F., O. Bernard, P. Masci, T. Lacour, A. Sciandra (2010). Modelling neutral lipid production by the microalga *Isochrysis affinis galbana* under nitrose limitation, *Bioresource Technology*, **102**, 142-149.
- Merchuk, J. C., Ronen, M., Giris, S., Arad (Malis) S. (1998). Light/dark cycles in the growth of the red microalga. *Biotechnology and Bioengineering* **59**, 705-713.
- Metting F. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **17**, 477-89.
- Meyers J., J. R. Graham (1971). The photosynthetic unit in *Chlorella* measured by repetitive short flashes. *Plant Physiology*, **48**, 282-86.
- Neale P. J., A. Melis (1986). Algal photosynthesis membrane complexes and the photosynthesis-irradiance curve: A comparison of light-adaptation responses in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, **22**, 531-38.
- Nedbal, L., V. Tichý, F. Xiong, J. U. Grobbelaar, (1996b). Microscopic green algae and cyanobacteria inv high-frequency intermittent light. *Journal of Applied Phycology*, **8**, 325-333.
- Oemerod W.G., P Freund, A. Smith, J. Davison (2002). Ocean storage of CO<sub>2</sub>. *IEA greenhouse gas R&D programme*. International Energy Agency (U.K.).
- Pawlowski L. (2004). Modélisation de l'incorporation du carbone photosynthétique en environnement marin contrôlé par ordinateur. *PhD thesis*, Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Perry M. J., M. C. Larsen, R. S. Alberte (1981). Photoadaptation in marine phytoplankton: Response of the photosynthetic unit. *Marine Biology*, **62**, 91-101.
- Prezelin B. (1976). The role of peridin-chlorophyll *a*-proteins in the photosynthetic light adaptation of the marine dinoflagellate. *Glenidinium sp. Planta*, **130**, 225-33.
- Prezelin B. e B. M. Sweeney (1979). Photoadaptation of photosynthesis in two bloom-forming dinoflagellates. In: *Toxic Dinoflagellate Blooms* (D. Taylor e H.Seliger), Eds. Elsevier North Holland, Inc. 10-106 (Paesi Bassi).

- Quinn J., L. D. Winter, T. Bradley (2011). Microalgae bulk growth model with application to industrial scale system. *Bioresource Tecnology*, **102**, 5083-92.
- Ramus J. (1981). The capture and transduction of light energy. In: *The biology of Seaweeds Botanical Monographs*, Vol 17 (C. S. Lobban e M. J. Wynne), 458-92. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Richmond A. (2004). *Handbook of microalgae culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd, Oxford (UK).
- Riley G. A. (1946). Factors controlling phytoplankton populations on George Bank. *J. Marine Resource*, **6**, 54-73.
- Smith A. L. (1997). *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*, Oxford University Press, 1997.
- Smith S., Y. Yamanaka (2007). Quantitative comparison of photoacclimation models for marine phytoplankton. *Ecological Modelling*, **201**, 547-552.
- Spolaore P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert (2006a). Commercial applications of microalgae, *Journal of Bioscience and Bionengineering*, **101**, 87-96.
- Spolaore P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambert (2006b). Optimization of *Nannochloropsis oculata* growth using the response surface method. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **81**, 1049-1056.
- Sukenik A., P. G. Falkowski, J. Bennett (1987). Potential enhancement of photosynthetic energy conversion in algal mass culture. *Biotechnology and Bioengineering* **30**, 970-77.
- Terry, K.L., (1986). Photosynthesis in modulated light: quantitative dependence of photosynthetic enhancement on flashing rate. *Biotechnology and Bioengineering* **28**, 988-995.
- Turazza, D. (2010). Report semestre 1. *Produzione sostenibile di biocarburanti: sviluppo di processi e ottimizzazione di filiera*. Dipartimento di Principi e Impianti di Ingegneria Chimica, Università degli Studi di Padova.

#### Siti web

<http://www.ipcc.ch/> (ultimo accesso: 23/10/2011)

<http://www.esrl.noaa.gov/> (ultimo accesso: 23/10/2011)

# Appendice

Nell'Appendice sono riportati i programmi dei modelli di crescita (modello A, modello B e modello C) come implementati in gPROMS®.

## MODELLO A

### Model

PARAMETER

B AS REAL

VARIABLE

Iav AS intensita\_luce

I0 AS intensita\_luce

muMAX AS costante

kI AS costante

C1 AS costante

C2 AS costante

alfa AS costante

EQUATION

#Calcolo intensità media volumetrica luce

Iav = I0 \* ((1 - EXP(-alfa \* cXbio \* 1000 \* B))/(alfa \* cXbio \* 1000 \* B));

#Bilancio massa

\$cXbio = muMAX \* (Iav / (kI + Iav)) \* CXbio \* ((1 - (cXbio / (C1 \* I0)))^C2);

---

### Process

UNIT

M101 AS batch

SET

M101.B := 0.008;#(m)

ASSIGN

M101.I0 := 150;#(uE/(s\*m^2))

M101.kI := 70;#(uE/(s\*m^2))

M101.muMAX:= 0.02;#(1/h)

M101.C1 :=1;#((g\*m^2)/(uE\*L))

M101.C2 :=1;#(-)

M101.alfa := 0.0752;#(m^2/g)

```
INITIAL
M101.cXbio = 0.083;#g/L
```

```
SCHEDULE
CONTINUE FOR 216
```

## MODELLO B

### Model

#### PARAMETER

```
Ek      AS REAL
rRc     AS REAL
qN_Xmin AS REAL
qN_Xmax AS REAL
Kn      AS REAL
B       AS REAL
PhiT    AS REAL
rNmax   AS REAL
```

#### VARIABLE

```
Iav      AS intensita_luce
cXbio    AS concentrazione
cCX      AS concentrazione
Pc       AS velocita
Pc_calc  AS velocita
rN       AS velocita
Phi_qNXint AS efficienza
qN_X     AS quota
Phi_qNext AS efficienza
rN_calc  AS velocita
cN       AS concentrazione
mu       AS velocita
alfa     AS concentrazione
zeta     AS concentrazione
Pc_max   AS notype
PhiM     AS notype
I0       AS intensita_luce
muMAX    AS notype
C1       AS notype
C2       AS notype
```

#### EQUATION

```
#EQUAZIONI INTEGRATIVE
```

```
#-----
```

```
#Calcolo Maximum photosynthetic rate
```

```
Pc_max = (muMAX + rRc) / (1 - zeta * qN_Xmax * 0.5);
```

```
#0.5 perché zeta [gBIO/gN] e qN_Xmax [gN/gC]
```



```

#Calcolo Photon efficiency
PhiM = (Pc_max / (alfa * 0.5 * 3600 * Ek) * 30 * 10E-6 );
#3600 perché Pc_max [1/h] e Ek [umol phot/(s*m2)]

#EQUAZIONI LUCE
#-----
#Calcolo intensità media volumetrica luce
Iav = IO * ((1 - EXP(-alfa * cXbio * 1000 * B))/(alfa * cXbio *
1000 * B));

#Calcolo velocità di fissazione del carbonio
Pc_calc = Pc_max * PhiT * Phi_qNXint ;
Pc = Pc_calc * (1 - EXP((-alfa * 2 * PhiM * Iav) * 3600 ) /
Pc_calc) ;

#EQUAZIONI BIOMASSA
#-----
mu = (Pc - rRc - zeta * rN * 0.5); #*(1 - (cXbio / (C1 * IO))^C2)
;
$cCX=cCX * mu;
cXbio = 2 * cCX ;

#CALCOLO DIPENDENZA AZOTO
#-----
qN_X * Phi_qNXint = qN_X -qN_Xmin ;
Phi_qNext = cN / (cN + Kn) ;
rN_calc = rNmax * Phi_qNXint * Phi_qNext * PhiT ;
$qN_X = rN ;
#qN_X *rN = rN_calc - (rRN * qN_X);
qN_X *rN = rN_calc ;
$cN = - ((rN * cCX) + (cCX * mu * qN_X)) ;

```

---

**Process**

UNIT

M101 AS batch

SET

M101.B := 0.008;# (m)  
M101.rRc := 4.32E-4;# (1/h)  
M101.qN\_Xmin := 0.010;# (g/g)  
M101.Kn := 0.005;# (g/L)  
M101.PhiT := 1;# (-)  
M101.qN\_Xmax := 0.150;# (g/g)  
M101.rNmax := 1.5E-6;

ASSIGN

M101.muMAX := 0.02;# (1/h)  
M101.IO := 120;# (uE/(s\*m^2))  
M101.alfa := 0.0752;# (m^2/g)  
M101.zeta := 4;# (g/g)  
M101.C1 :=1;# ((g\*m^2)/(uE\*L))  
M101.C2 :=1;# (-)

```
INITIAL
M101.cCX      = 0.053;# (g/L)
M101.qN_X     = 0.06 ;# (g/g)
M101.cN       = 0.247;# (g/L)
```

```
SCHEDULE
CONTINUE FOR 1000
```

## MODELLO C

### Model

#### PARAMETER

```
Q0           AS REAL
Q1           AS REAL
rho_MED      AS REAL
Ks           AS REAL
R            AS REAL
KI_AST       AS REAL
L            AS REAL
```

```
DISTRIBUTION_DOMAIN
z AS [0:L]
```

#### VARIABLE

```
I0           AS intensita_luce
tempo        AS temporal
Cs           AS concentrazione
q            AS concentrazione
Cx           AS concentrazione
I_AST        AS intensita_luce
mi_MED       AS notype
lambda       AS notype
Iopt         AS intensita_luce
KsI          AS notype
theta        AS notype
chl          AS notype
xi           AS notype
I_MED        AS intensita_luce
CxL          AS concentrazione
KiI          AS intensita_luce
KsI_AST      AS notype
mi_ONDA      AS notype
a            AS notype
b            AS notype
C1           AS notype
C2           AS notype
gammaMAX     AS notype
```

```

Integrand AS DISTRIBUTION(z) OF notype

SET
z := [ CFDM, 2, 50 ] ;

EQUATION
$tempo = 1;

#SISTEMA
#Bilancio substrato
$Cs = - rho_MED * (Cs / (Cs + Ks)) * (1 - (q / Q1)) * Cx;

#Bilancio quota
$q = rho_MED * (1 - (q / Q1)) - mi_MED * (1 - (Cx / (C1 * I0))^C2) * (Cs / (Cs + Ks)) * (q - Q0);

#Bilancio biomassa
$Cx = mi_MED * (1 - (Cx / (C1 * I0))^C2) * (1 - (Q0 / q)) * Cx - R * Cx;
CxL = Cx / 1000;

#Calcolo I concettuale
$I_AST = mi_MED * (1 - (Cx / (C1 * I0))^C2) * (1 - (Q0 / q)) * (I_MED - I_AST);

#EQUAZIONI INTEGRATIVE

FOR j := 0 TO L DO
    Integrand(j) = mi_ONDA * ((KiI * I0 * EXP(-xi * j)) / (KiI * I0 * EXP(-xi * j) + (Iopt^2) + (I0^2) * EXP(-2 * xi * j)));
END
mi_MED = (1 / L) * INTEGRAL( j := 0:L; Integrand(j) );

#Definizione Iopt, KsI, theta, chl, xi
Iopt = SQRT(KiI * KsI);
KsI = KsI_AST / theta;
theta = chl / Cx;
chl = gammaMAX * (KI_AST / (I_AST + KI_AST)) * Cx * q;
lambda = xi * L;
xi = a * chl + b * Cx ;

#Definizione I_MED
I_MED = ((I0 / lambda) * (1 - EXP(-lambda)));

```

---

**Process**

```

UNIT
M101 AS batch

SET

```

```
M101.Q0      := 0.010;#(g/g)
M101.Q1      := 0.150;#(g/g)
M101.rho_MED := 0.1296;#(g/(g*day))
M101.Ks      := 5;#(g/m^3)
M101.R       := 0.0081;#(1/day)
M101.KI_AST  := 63;#(uE/(s*m^2))
M101.L       := 0.008;#(m)

#EQUATION
#IF M101.I >= 0
#   then M101.I0 = 100;
#else
#   M101.I0=0;
#end

ASSIGN
M101.I0      := 120;#(uE/(s*m^2))
M101.mi_ONDA := 1.7;#(1/day)
M101.KsI_AST := 1.4;#(uE/(s*m^2))
M101.KiI     := 295;#(uE/(s*m^2))
M101.a       := 16.2;#(m^2/g)
M101.b       := 0.087;#(1/m)
M101.C1      :=1;#((g*m^2)/(uE*L))
M101.C2      :=1;#(-)
M101.gammaMAX := 0.57; #gCh1/gN BERNARD

INITIAL
M101.tempo   = 1E-20;#(day)
M101.Cs      = 247;#(g/L)
M101.q       = 0.06;#(g/g)
M101.Cx      = 53.04;#(g/L)
M101.I_AST   = M101.I0;#(uE/(s*m^2))

SOLUTIONPARAMETERS
  ReportingInterval := 0.03
  DASolver := "DASOLV" [
    "AbsoluteTolerance" := 1.0E-9,
    "EffectiveZero" := 1.0E-9,
    "RelativePerturbationFactor" := 1.0E-8,
    "RelativeTolerance" := 1E-010
  ]

SCHEDULE
CONTINUE FOR 8
```



