

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

Ottimizzazione delle performance dei fotobioreattori al fine di aumentare la produttività di microalghe



Relatori

Prof.ssa Francesca Bosco
Prof. Bernardo Ruggeri
Dr. Jean-Philippe Steyer
Prof. Nabil Grimi

Candidato

Angela Rosa Angelica Maragno

Luglio 2020

*Alla mia famiglia,
la mia squadra del cuore*

Sommario

1	Introduzione	1
1.1	La fisiologia e la coltura delle microalghe.....	2
1.1.1	Nutrienti	3
1.1.2	Fotosintesi.....	4
1.1.3	Microalghe e cianobatteri.....	6
1.2	I fotobioreattori	8
1.2.1	Fotobioreattori chiusi	8
1.2.2	Fotobioreattori aperti.....	9
1.2.3	Caratteristiche principali.....	10
2	Scopo del lavoro	15
2.1	Attività sperimentale con fotobioreattori di laboratorio	15
2.2	Attività sperimentale con fotobioreattori industriali	15
3	Materiali e metodi.....	17
3.1	Microalghe utilizzate nel lavoro di tesi	17
3.2	Fase 1: colture in fotobioreattori di laboratorio	17
3.2.1	Fotobioreattore tubolare.....	17
3.2.2	Fotobioreattore aperto.....	19
3.2.3	Condizioni iniziali per l'analisi sperimentale	19
3.2.4	Riempimento dei fotobioreattori ed avvio delle colture	22
3.3	Fase 2: colture in fotobioreattori industriali.....	22
3.3.1	Costruzione e attivazione del prototipo di riferimento	23
3.3.2	Costruzione del pilota e della vasca secondaria	27
3.3.3	Condizioni iniziali per l'analisi sperimentale	28
3.3.4	Riempimento dei fotobioreattori ed avvio delle colture (con e senza Nénuphar)	33
3.4	Metodi di misura	34
3.4.1	Densità ottica	35
3.4.2	Solidi totali sospesi	36
3.4.3	Azoto, fosforo, COD.....	36
3.4.4	Cromatografia ionica	37
3.4.5	Sonde utilizzate	38
4	Risultati e discussione.....	39
4.1	Fase 1: colture in fotobioreattori di laboratorio	39
4.1.1	Terreno di coltura.....	39
4.1.2	Inoculo	41
4.1.3	Fotobioreattore tubolare.....	43
4.1.4	Fotobioreattore aperto.....	47
4.2	Fase 2: colture in fotobioreattori industriali.....	49
4.2.1	Validazione del terreno di coltura	49
4.2.2	Inoculo	54
4.2.3	Prototipo di riferimento.....	55
4.2.4	Pilota e vasca secondaria	59
5	Conclusioni e prospettive future	69
6	Lista dei simboli	71
7	Riferimenti bibliografici.....	75

8	<i>Appendici</i>	81
	Appendice 1: Soluzione di Hutner	81
	Appendice 2: Medium Zarrouk	82
	Appendice 3: Linee di correlazione	83
	Appendice 4: Sistema carrousel	84
	Appendice 5: Sistema di agitazione della vasca pilota	85
	Appendice 6: Correlazione tra DOthermo e DOtecan	86
	Appendice 7: pH	87
	Appendice 8: ZM _{modificato} e BBM _{modificato}	88

1 Introduzione

Le microalghe, note anche come fitoplancton, sono organismi microscopici, unicellulari che vivono singolarmente o in colonie, in acque dolci e salate. Sono inoltre tra i componenti più importanti nelle catene alimentari degli ecosistemi acquatici.

La biomassa microalgale è una ricca fonte di composti biologicamente attivi, quali: polisaccaridi, proteine/enzimi, acidi grassi, steroli, pigmenti, vitamine, alcaloidi, aminoacidi, antiossidanti e tossine.

La maggior parte delle specie di microalghe presenta un contenuto in proteine superiore al 50% del suo peso secco. Le proteine, oltre ad avere proprietà ipolipidemiche ed ipoglicemiche, contribuiscono alla riduzione dei livelli di colesterolo e dei trigliceridi (Jacob-Lopes et al., 2019). Inoltre, alcune proteine di origine microalgale, vengono utilizzate per la produzione di alimenti contro l'obesità. Esistono specie di microalghe in grado di produrre le cosiddette proteine antigelo (*Antifreeze proteins*, AFP). Gli AFP estratti dalle alghe possono essere utilizzati per la crioconservazione e la conservazione di alimenti congelati (Graham et al., 2020).

Le microalghe producono anche elevate quantità di lipidi, tra cui acidi grassi ω -3 e ω -6 (Ribeiro et al., 2019). Tra gli acidi grassi ω -6 abbiamo l'acido gamma linolenico (GLA) importante per applicazioni terapeutiche e per la formulazione di cosmetici. Il GLA, insieme all'acido linoleico è considerato un nutriente essenziale utile per processi legati alla rigenerazione dei tessuti. Tra i più importanti acidi ω -3 abbiamo invece l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA). Essi sono associati alla riduzione dei problemi cardiovascolari, artrite e ipertensione (Jacob-Lopes et al., 2019). L'acido DHA agisce anche sullo sviluppo e sul funzionamento del sistema nervoso.

In termini di pigmenti, le microalghe sintetizzano composti appartenenti a tre classi differenti (clorofille, carotenoidi e ficobiliproteine). L'applicazione primaria dei pigmenti microalgali, in particolare β -carotene e astaxantina, si estrinseca nella produzione di coloranti alimentari.

Oltre alla vitamina A, le microalghe sono ricche di vitamina C, E, K, tiamina, piridossina, riboflavina, niacina, biotina e tocoferolo. Questi composti rafforzano il sistema immunitario e sono indispensabili per diverse reazioni chimiche che avvengono nel nostro organismo (Behl et al., 2020). Regolano inoltre il funzionamento del sistema nervoso e la crescita di tessuti e cellule. Alcune vitamine hanno anche una funzione antiossidante, altre risultano fondamentali per la coagulazione del sangue.

In conclusione, questi composti bioattivi hanno proprietà positive e importanti per gran parte delle creature viventi. Essi vengono utilizzati nell'industria farmaceutica, nutraceutica, cosmetica e alimentare come medicine naturali, additivi alimentari e agenti di protezione dai raggi UV (Molino et al., 2020). Le microalghe sono quindi un interessante punto di partenza per ottenere questi composti naturali.

Si cerca inoltre, di ottimizzare le tecniche di coltura della biomassa algale ed incentivare le ricerche in questo campo per incrementare la produzione di biocarburante, idrogeno e metano, con un approccio sostenibile. Per la crescita delle microalghe, considerate *una risorsa energetica di terza generazione*, si tende inoltre a sfruttare acque eutrofiche, di origine agricola o civile, ottenendo così anche la loro depurazione (Ochsenreither et al., 2016).

A seconda della specie, le dimensioni delle microalghe possono variare da pochi micrometri a qualche centinaio. L'attività fotosintetica delle microalghe è fondamentale per la vita sulla terra; si stima che esse producano il 30-50% dell'ossigeno atmosferico assorbendo contemporaneamente anidride carbonica, ovvero il maggior gas ad effetto serra per poter crescere e sintetizzare nuova sostanza organica (Orofino, 2017). La biodiversità delle microalghe è enorme, le specie esistenti sono all'incirca tra 200.000 e 800.000.

Le microalghe più utili appartengono a 5-6 classi principali distinguibili per la loro morfologia, pigmentazione, ciclo biologico e struttura cellulare (Sathasivam *et al.*, 2017).

1.1 La fisiologia e la coltura delle microalghe

Le microalghe sono microrganismi eucariotici aventi un'elevata capacità adattativa alle diverse condizioni ambientali. Le alghe pluricellulari si dividono principalmente in alghe verdi (*Chlorophyta*), alghe rosse (*Rhodophyta*) e alghe brune (*Phaeophyta*). Quelle unicellulari comprendono alghe giallo-brune (*Chrysophyta*) alle quali vi appartengono le diatomee (*Bacillariophyceae*), e alghe dinoflagellate (*Dinophyta*) (Sadava *et al.*, 2008).

I cianobatteri (*Cyanophyceae*) sono organismi procarioti, fotoautotrofi, possono vivere come cellule singole o riuniti in colonie, sono di forme diverse, da tondeggianti a filamentose. Essi vengono anche chiamati impropriamente alghe azzurre o verdi-azzurre a causa della presenza della ficocianina, pigmento verdognolo o bluastro che riesce a coprire il colore verde brillante della clorofilla (Böcker *et al.*, 2020). Di conseguenza, nel lavoro di tesi, indichiamo con il termine microalghe sia i microrganismi eucariotici che quelli procariotici (cianobatteri).

Le microalghe partecipano al processo di fotosintesi, durante il quale, le molecole organiche vengono sintetizzate a partire da sostanze inorganiche disciolte, usando la radiazione solare come fonte di energia. Tali microrganismi sono in grado di crescere rapidamente in presenza di nutrienti sufficienti e in condizioni climatiche adeguate (Yao *et al.*, 2018). In un bioreattore discontinuo, la curva di crescita presenta il seguente andamento (Figura 1.1):

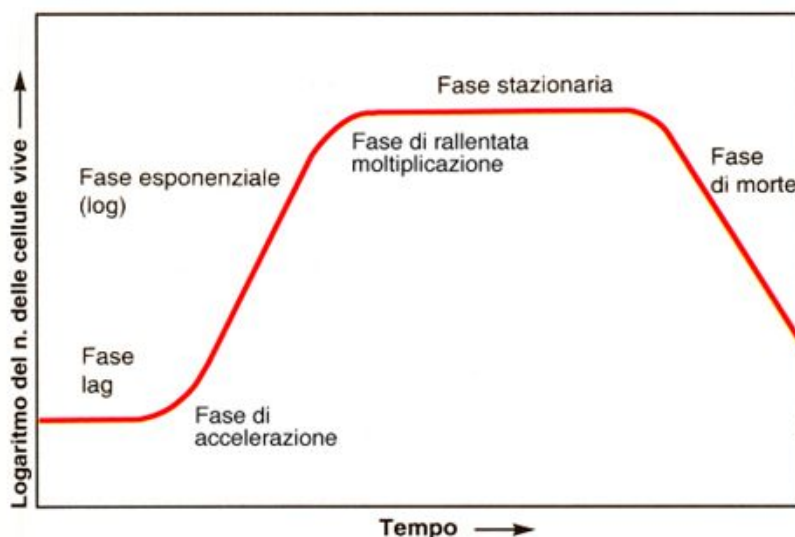


Figura 1.1: Rappresentazione schematica della curva di crescita delle microalghe in un reattore discontinuo. Figura tratta da: <https://slideplayer.it/slide/10971322/>

Nella curva di crescita caratteristica delle microalghe possiamo distinguere sei fasi principali:

- *Fase di latenza*: fase di adattamento delle microalghe al terreno di coltura (sintesi proteica, ATP, enzimi) e alle altre condizioni imposte quali luce e temperatura (T). Il tasso di crescita è zero; la durata della fase di latenza dipende dall'età dell'inoculo e dalla composizione del terreno di coltura.
- *Fase di accelerazione*: fase più o meno rapida dipendente dal tipo di inoculo e di microalghe presenti. In questa fase si ha un aumento del tasso di crescita delle microalghe ed un rapido consumo dei nutrienti.
- *Fase log o esponenziale*: fase in cui si registra una velocità di crescita dei microrganismi massima. La concentrazione di biomassa tende ad aumentare in modo esponenziale in condizioni di substrato non limitante. Questa fase è rappresentata dal tratto di curva con pendenza maggiore. La crescita è costante e dipende dalla disponibilità di nutrienti, dalla luce e dalle condizioni di temperatura.
- *Fase di rallentamento*: fase in cui la mancanza di nutrienti o l'accumulo di metaboliti tossici rallentano la velocità di crescita delle microalghe. Le cellule iniziano a sospendere il processo di divisione e a morire, non si ha quindi un aumento significativo della concentrazione.
- *Fase stazionaria*: fase in cui il tasso di crescita è zero e il numero di organismi è costante. La velocità di divisione delle cellule eguaglia quella di morte, di conseguenza la concentrazione assume un valore costante.
- *Fase di morte*: fase in cui il numero di cellule vitali diminuisce notevolmente; la coltura si esaurisce in seguito ad un aumento della lisi cellulare. Questo di solito si verifica a causa dell'eccessiva concentrazione di alghe in volumi ridotti, dell'esaurimento dei nutrienti nel terreno di coltura e del verificarsi di condizioni di crescita avverse quali temperature inadeguate, presenza di sostanze tossiche ed illuminazione insufficiente.

La crescita delle microalghe dipende da diversi fattori:

- *fattori abiotici*: luce (intensità e lunghezza d'onda), temperatura, concentrazione di nutrienti, ossigeno, anidride carbonica, pH, salinità e sostanze tossiche;
- *fattori biotici*: agenti patogeni (batteri, funghi, virus), competizione con altre microalghe, protozoi (amebe e rotiferi);
- *fattori operativi*: miscelazione, rapporto tra portata volumica e volume del reattore, profondità del reattore rispetto alla superficie interessata dalla luce ed ai m² di suolo occupato, coltura continua o discontinua.

1.1.1 Nutrienti

La crescita delle alghe richiede come fonte principale di elementi nutritivi carbonio (C), azoto (N) e fosforo (P) (Costa *et al.*, 2018). Presenti in quantità minori ma in ogni caso essenziali sono lo zolfo (S), il potassio (K) ed il magnesio (Mg).

1.1.1.1 Carbonio inorganico

L'elemento principale che consente la formazione di tutti i composti organici è il carbonio. La crescita della biomassa algale è garantita tramite fonti di carbonio organico (urea) ed inorganico quali anidride carbonica o bicarbonato (Uggetti *et al.*, 2018).

Il carbonio è l'elemento principale presente nelle microalghe e può rappresentare fino al 65% del peso secco, anche se il suo contenuto varia notevolmente a seconda della specie.

1.1.1.2 Azoto inorganico

L'azoto è il secondo elemento più abbondante nella biomassa algale, essenziale per la sintesi di biomolecole come amminoacidi, pigmenti e acidi nucleici.

Il contenuto di azoto all'interno delle microalghe varia tra 1% ed il 14%. Ragionando in termini di peso secco, si osserva che la quantità di azoto all'interno della biomassa non è limitante se è tra il 5 e il 10% del peso secco (Okonkwo *et al.*, 2020). Le microalghe hanno un alto contenuto proteico (30-60%) rispetto alle piante terrestri e quindi richiedono grandi quantità di azoto. L'azoto viene principalmente assimilato in forma inorganica (NO_3^- , NO_2^- , NO , NH_4^+) tuttavia in alcuni casi le microalghe tendono ad utilizzare azoto sotto altre forme come N_2 , urea e amminoacidi (Li *et al.*, 2008). Nel momento in cui sono presenti contemporaneamente diverse forme di azoto nel terreno di coltura, le cellule utilizzano preferibilmente l'ammonio (la forma più ridotta) e di seguito le altre forme presenti nell'ordine $NH_4^+ \rightarrow NO \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^- \rightarrow CH_4N_2O$ (Markou, Vandamme and Muylaert, 2014).

NO_3^- è la forma più usata per la coltivazione di microalghe e cianobatteri, più comunemente come $NaNO_3$ o KNO_3 (Moon *et al.*, 2013). Le concentrazioni di nitrato per le cellule microalgali non possono essere superiori a 100 mM. Concentrazioni maggiori influenzano negativamente la crescita microbica e causano un aumento dell'attività dell'enzima nitrato reductasi. La reazione catalizzata dall'enzima porta a sua volta ad un aumento delle concentrazioni di nitrito e di ammonio, appartenenti ad un *range* potenzialmente tossico per le cellule (Yousuf, 2019).

1.1.1.3 Fosforo

Il fosforo in natura è presente nei minerali di roccia, ma la sua disponibilità è limitata. Il contenuto di fosforo nella biomassa varia dallo 0,05% al 3,3% ed è assimilato dalle cellule principalmente sotto forma di ortofosfato; tuttavia, per la crescita delle microalghe esso può essere utilizzato anche in altre forme organiche e inorganiche (Zhang, Caldwell and Sallis, 2019). Con l'aumento del pH dovuto alla fotosintesi e all'alcalinizzazione del mezzo di coltura, i cationi polivalenti come calcio e magnesio, tendono a precipitare con i fosfati, questo può ridurre la disponibilità di fosforo.

1.1.1.4 Potassio, zolfo e micronutrienti

Per favorire la crescita delle microalghe, il terreno di coltura deve contenere non solo carbonio, azoto e fosforo (macronutrienti), ma anche molti altri micronutrienti, come: K, Mg, S, Ca, Na, Cl, Fe, Zn, Cu, Mo, Mn, Co e B. Per facilitare l'aggiunta degli oligoelementi al terreno di coltura viene preparata una soluzione detta soluzione di Hutner (Hutner *et al.*, 1950), in seguito miscelata, conservata e aggiunta al medium di coltura al momento della preparazione di quest'ultimo.

1.1.2 Fotosintesi

Le microalghe sono organismi fotosintetici più efficienti delle piante nella conversione dell'energia solare, in quanto vivendo in acque dolci o salate hanno una grande disponibilità di anidride carbonica e nutrienti. Per produrre 1 kg di biomassa microalgale sono richiesti circa 1,8 kg di CO_2 (Zullaikah *et al.*, 2019).

La reazione generale della fotosintesi è la seguente:



Il processo fotosintetico si svolge in organelli chiamati cloroplasti ed avviene principalmente in due tappe:

- Fase luminosa: può avvenire solo alla luce e converte l'energia solare in energia chimica; i suoi prodotti principali sono ATP e composti riducenti (NADPH). In questa fase viene liberato ossigeno molecolare (Luan, Zhang and Lu, 2020).
- Fase oscura: quest'ultima può avvenire alla luce o al buio. Grazie alle molecole prodotte durante la fase luminosa l'anidride carbonica viene organizzata in zuccheri.

Tra le molecole più importanti della fase luminosa della fotosintesi vi sono ATP, NADP⁺, e pigmenti fotosintetici. I pigmenti fotosintetici (Figura 1.2) sono molecole organiche complesse in grado di assorbire la luce visibile, presentano doppi legami coniugati. A parità di altri caratteri del pigmento, maggiore è il numero dei doppi legami coniugati e maggiore è la lunghezza d'onda assorbita. Una delle categorie principali di pigmenti è quella delle clorofille.

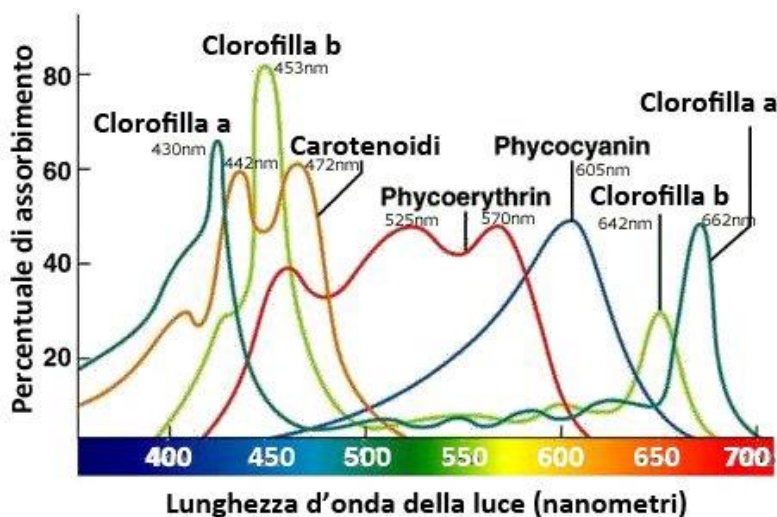


Figura 1.2: Spettro di assorbimento dei principali pigmenti contenuti nelle microalghe. Figura tratta da: <https://acquariofilia.org/tecnica-acquario/led-acquario/5/?cn-reloaded=1>

La clorofilla a, di colore verde-azzurro, presenta un gruppo metilico legato ad un anello porfirinico ed è il principale pigmento fotosintetico in quanto presente nei centri di reazione (Bernardi *et al.*, 2017). La clorofilla b, di colore giallo-verde, e gli altri pigmenti, sono “pigmenti accessori” o “pigmenti antenna” che raccolgono una parte dell'energia luminosa e la trasferiscono ai centri di reazione. In sintesi, la maggior parte delle molecole di pigmento possono assorbire radiazioni ma, soltanto alcune molecole di clorofilla, quelle presenti nei centri di reazione, sono in grado di indurre la trasformazione dell'energia luminosa in energia chimica. Importanti sono anche la ficocianina e la ficoeritrina: pigmenti specifici per cianobatteri e alghe rosse (Mukherjee, Madhu and Wangikar, 2020).

L'energia luminosa utilizzata dalle microalghe per la fotosintesi fa parte dello spettro elettromagnetico. Esso indica l'insieme di tutte le possibili frequenze delle radiazioni elettromagnetiche. A seconda delle lunghezze d'onda e dell'energia associata a ciascun fotone possiamo distinguerne i diversi tipi.

La luce visibile costituisce la maggior parte della radiazione elettromagnetica che arriva sulla terra e corrisponde a quella parte dello spettro che ha lunghezza d'onda compresa tra 380 e 750 nm (Figura 1.3).

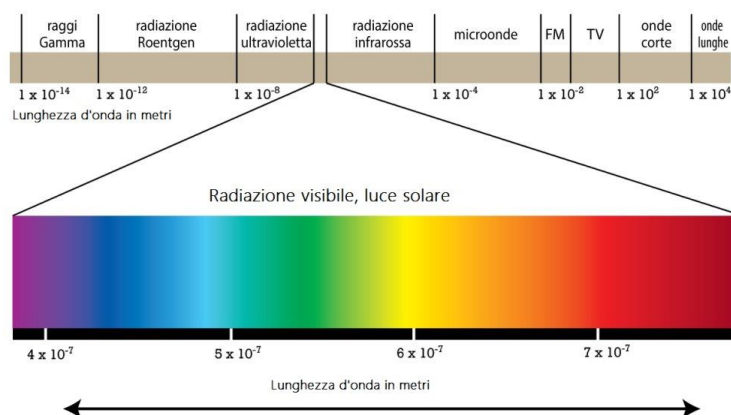


Figura 1.3: Spettro elettromagnetico evidenziante la radiazione visibile. Figura tratta da: <https://www.tes.com/lessons/OvCEVvCC0e-1FQ/universo>

La radiazione fotosinteticamente attiva (PAR) corrisponde alla radiazione visibile ed è pari al 41% della radiazione solare totale. Essa si concentra tra le bande blu e rosse ed ha dei picchi massimi a 430 e 680 nm. Rappresenta l'energia effettivamente disponibile per la fotosintesi ed è inferiore all'energia totale del sole perché dipende dallo spettro di assorbimento della clorofilla. La PAR è espressa in $[\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}]$ sapendo che 1 *Einstein* (E) è pari all'energia associata ad una mole di fotoni (de Mooij *et al.*, 2016).

1.1.3 Microalghe e cianobatteri

Tra i microrganismi eucariotici e procariotici esistenti abbiamo *Arthrospira*, *Scenedesmus*, *Desmodesmus*, *Chlorella*, *Pediastrum* e *Chlamydomonas*; le microalghe maggiormente utilizzate per la produzione di biomassa fanno parte dei generi elencati.

La Spirulina (*Arthrospira platensis*) è la microalga più diffusa nel mercato dell'industria alimentare. Essa è un'alga unicellulare blu-verde (Figura 1.4) presente nei laghi salini con acque calde e alcaline, di forma stretta e allungata, a spirale, (Martínez-Sanz *et al.*, 2020) appartenente alla classe dei cianobatteri.

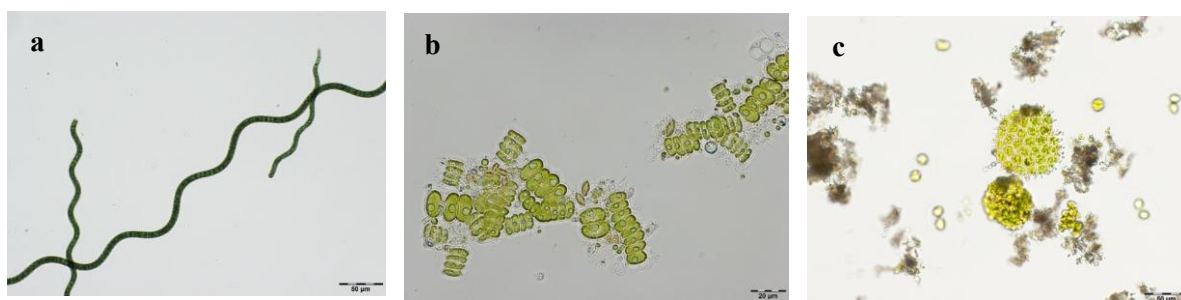


Figura 1.4: Esempi di *Arthrospira platensis* (a), *Desmodesmus* (b), *Pediastrum* e *Chlamydomonas* (c)

La resa massima di *Arthrospira platensis* si ottiene a temperature comprese tra i 32 e i 37 °C. Un abbassamento della temperatura porta ad un aumento delle probabilità di contaminazione del sistema (Pulgarin *et al.*, 2020). La Spirulina richiede una quantità maggiore di nutrienti e alte concentrazioni di sale rispetto ad altre microalghe come *Scenedesmus* e *Chlorella*. È importante far crescere la Spirulina in terreni di coltura ad alta alcalinità e con fornitura costante di ioni bicarbonato (G. Usharani, Saranraj and Kanchana, 2012).

Una notevole quantità di bicarbonato nella coltura algale contribuisce a mantenere valori di pH elevati, compresi tra 9-11. Tuttavia, a causa delle difficoltà incontrate per garantire l'assenza di contaminazioni in grandi volumi di coltura, gli esperimenti con ceppi algali selezionati sono stati fatti solo a scala di laboratorio.

Scenedesmus e *Desmodesmus*, (Figura 1.5) sono generi di alghe lacustri appartenenti alla famiglia *Scenedesmaceae* con ampia distribuzione in acque dolci di climi temperati. Le alghe del genere *Scenedesmus* sono formate da 4 cellule o multipli di 4 con una disposizione a pacchetto ed incapaci di movimento autonomo, si muovono grazie alla corrente. Esistono moltissime specie differenti e tra le più comuni possiamo evidenziare le cellule ellittiche fusiformi dotate di alcune protuberanze (Pugazhendhi *et al.*, 2020). I fattori ambientali, come ioni metallici e pH, sono importanti anche per la flocculazione delle microalghe. Le alghe del genere *Scenedesmus* vivono in ambienti alcalini con pH compreso tra 8 e 11. Quando i valori di pH superano 8,5 è possibile che si verifichino precipitazioni di fosfato di calcio nella soluzione. Si hanno invece precipitazioni di idrossido di magnesio quando i valori di pH superano 10-10,5 (Lv *et al.*, 2019).

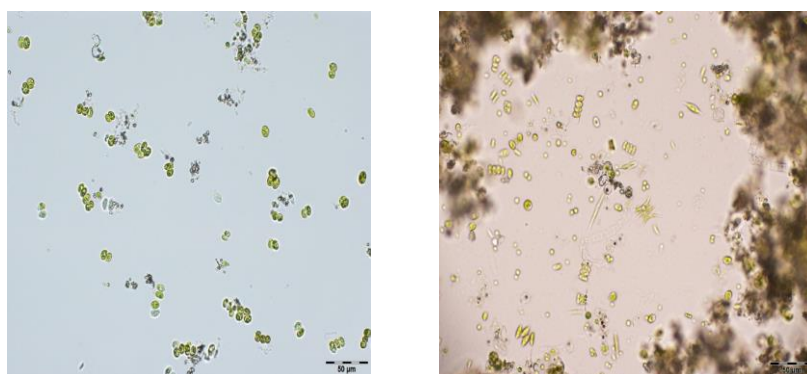


Figura 1.5: Esempi di *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Chlamydomonas* e *Desmodesmus*

Le alghe del genere *Desmodesmus* sono molto simili alle *Scenedesmus* ma variano nel fenotipo, nel numero di cellule della colonia, nella forma, nella tipologia e nel numero di spine (Hegewald, 1997). Esse sono composte da 2 fino a 8 cellule ellissoidali od ovoidali e, a differenza di *Scenedesmus*, hanno l'apice più arrotondato. Le cellule terminali possono avere due spine nelle zone angolari e ciuffi o setole che conferiscono galleggibilità.

Chlorella è un'alga verde unicellulare d'acqua dolce che favorisce l'eliminazione di metaboliti tossici, inquinanti ambientali e metalli pesanti. Svolge un'azione preventiva contro infiammazioni ed allergie ed è inoltre una potenziale fonte di cibo ed energia. Ha una forma sferica, con un diametro compreso tra 2-10 µm, contiene i pigmenti fotosintetici verdi (clorofilla a e b). Attraverso la fotosintesi, si moltiplica rapidamente richiedendo solo l'anidride carbonica, l'acqua, la luce solare e una piccola quantità di minerali per riprodursi. *Chlorella* è solitamente coltivata in un terreno di coltura chiamato *Bold's Basal Medium* (BBM) (Swapnil *et al.*, 2014).

adattabile anche ad altri tipi di microalghe; alla fine della preparazione del medium è molto importante che il pH sia compreso tra 6,4 e 7,0.

Pediastrum è un genere di alghe verdi della famiglia *Hydrodictyaceae*, anch'esse prive di movimento autonomo e spostate dalle correnti, costituiscono una gran parte del fitoplancton d'acqua dolce. Crescono a partire da una temperatura di 12 °C e per lo più a pH che variano tra 8 e 9 (Paształeniec and Poniewozik, 2004); si trovano sia in habitat di acque stagnanti che in habitat di acque correnti.

Chlamydomonas è un genere di alghe unicellulari che si muovono liberamente in acque dolci ma anche nelle salmastre e marine. È inoltre possibile individuare questo genere di alghe in ambienti nevosi, la presenza di pigmenti plastidiali provoca il fenomeno della cosiddetta “neve rossa”. Sono cellule sferoidali, ovali o subovalari, hanno una parete glicoproteica non cellulosa, e due flagelli nell'estremità anteriore (Halim and Ruma, 2018) che possono essere isoconti (della stessa lunghezza) o eteroconti (di lunghezza diversa). Queste specie possono crescere in ampi range di pH, a partire da 3,4 fino ad 8,4 con una crescita ottimale a 7,4 (Visviki and Santikul, 2000).

1.2 I fotobioreattori

Le tecniche di coltura delle microalghe si basano essenzialmente sull'utilizzo di fotobioreattori (PBR) aperti e chiusi (Figura 1.6).



Figura 1.6: Esempi di fotobioreattori aperti (Raceway INRAE - LBE) e chiusi (PBR tubolari)

Gran parte dell'interesse per la coltivazione di microrganismi fotosintetici nei PBR è stato guidato dalle preoccupazioni ambientali ed economiche causate dai combustibili fossili. Gli organismi fotosintetici rappresentano una potenziale via di produzione alternativa per molti prodotti chimici (Mata, Martins and Caetano, 2010).

1.2.1 Fotobioreattori chiusi

Per la crescita dei microrganismi fotosintetici, i fotobioreattori chiusi sono i sistemi di coltura ottimali.

Tali sistemi necessitano di un adeguato rifornimento di *energia radiante* e garantiscono un processo controllato nel quale è possibile produrre biomasse microbiche e/o metaboliti. In essi, la coltura non entra in contatto con l'atmosfera ed è molto meno probabile che venga contaminata (Bellucci *et al.*, 2020). Non sono presenti inoltre le problematiche dovute all'evaporazione dell'acqua e a fenomeni di fotoinibizione. È consigliabile procedere alla coltivazione all'interno di fotobioreattori chiusi quando si vuole controllare l'accrescimento

della biomassa e ottimizzare i parametri di crescita di ceppi algali selezionati (Cho and Pott, 2019). Questo tipo di coltivazione è altamente utilizzata per scopi alimentari dove è necessario un elevato controllo di qualità. Dalla loro prima apparizione negli anni '40, i fotobioreattori vengono testati sperimentalmente, al fine di valutare i vantaggi e gli svantaggi per la crescita della biomassa algale. Questo ci ha permesso di classificarli a seconda della loro geometria, del tipo di materiale e delle loro *performance*.

I fotobioreattori chiusi sono per lo più reattori in vetro o in plastica trasparente di varie forme: tra i più conosciuti abbiamo PBR tubolari, *flat panel*, elicoidali, conici e ad albero. Essi sono spesso visti come alternative favorevoli alle *open ponds*; la scelta del reattore dipende, come già accennato, dalle specie da coltivare e dall'applicazione (Mata, Martins and Caetano, 2010). A causa degli eccessivi costi di manutenzione, operativi e di produzione, oggi la coltura dei microrganismi fototrofi avviene per lo più in sistemi aperti *raceway*. In essi, la resa è estremamente limitata a causa della scarsa capacità di controllo delle colture e dei parametri quali pH, T, O₂, CO₂, velocità di miscelazione, pressioni parziali del gas, densità cellulare e prevenzione alla contaminazione.

1.2.2 Fotobioreattori aperti

La crescita in fotobioreattori aperti avviene solitamente coltivando le alghe alla luce del sole. La maggior parte dei *raceway* esistenti hanno un'altezza massima di 50 cm, questa è condizionata dalla penetrazione della luce solare che è pressoché nulla oltre gli 8 cm di profondità. Facendo crescere le alghe all'aria aperta, queste colture hanno due problemi principali:

- l'esposizione alle contaminazioni da parte di batteri, protozoi o altre microalghe che possono proliferare competendo con la crescita del ceppo di interesse;
- l'eccessiva evaporazione del liquido.

L'ambiente di crescita è un ambiente acquoso in grado di evaporare anche a temperatura ambiente. Con climi caldi, e quindi a temperature molto elevate, l'evaporazione, se non controllata, tende a far variare la concentrazione dei nutrienti nel tempo. È inoltre importante evitare un'eccessiva riduzione del volume della soluzione trattata e mantenere una salinità adeguata del terreno di coltura (Duchène and Cotteux, 2002).

I fotobioreattori da esterno sono condizionati dal ciclo giorno-notte mentre quelli da interno sono illuminati da luce continua. In assenza di luce o di un substrato organico, le cellule metabolizzano componenti cellulari per ottenere energia determinando una diminuzione della biomassa prodotta (González-Camejo *et al.*, 2020). Per risolvere questo problema sono stati sviluppati prototipi che permettono l'accensione e lo spegnimento di un sistema di illuminazione artificiale al fine di garantire un'illuminazione continua anche all'esterno.

Ulteriori progressi nell'ottimizzazione della distribuzione della luce, all'interno della coltura, sono stati fatti sia utilizzando fibre ottiche, sia attraverso la diluizione della radiazione solare (de Mooij *et al.*, 2016).

È importante ricordare l'esistenza di sistemi ibridi per la produzione di microalghe. Essi consistono nell'utilizzo di PBR chiusi per lo *step* di sviluppo dell'inoculo, e nel trasferimento della coltura in vasche aperte quando il ceppo algale è ormai resistente e dominante. Questo tipo di sistema è tutt'ora in disuso a causa degli eccessivi costi riguardanti lo *step* iniziale.

1.2.3 Caratteristiche principali

1.2.3.1 Agitazione

I sistemi di agitazione maggiormente utilizzati nei fotobioreattori dipendono dalla geometria e dal tipo di fotobioreattore.

Per quanto riguarda i classici reattori *raceway*, il sistema di agitazione utilizzato oggi è di estrema semplicità strutturale, esso è costituito da rotori cilindrici, ad asse orizzontale, muniti di pale (*paddle-wheel*). Il movimento delle pale garantisce lo scambio di materia con l'atmosfera e la miscelazione della coltura, riducendo il problema della sedimentazione (Béchet et al., 2018). Tuttavia, a causa della contaminazione delle colture e dei cambiamenti climatici, la produttività dell'impianto è limitata, la quantità di biomassa presente all'interno di reattori *raceway* è circa 0,3-0,4 g/l.

I costi di funzionamento dei fotobioreattori aperti sono però molto bassi in quanto, la scarsa densità della soluzione, minimizza l'energia richiesta per mantenere il fluido in agitazione.

Nei fotobioreattori chiusi, i sistemi di agitazione delle colture sono senz'altro più cari e sofisticati. Al loro interno è molto difficile avere un adeguato sfruttamento della CO₂ a causa dell'assenza di contatti della biomassa microalgale con l'atmosfera. Si tende quindi a insufflare anidride carbonica in modo da arricchire la soluzione, facendo gorgogliare il gas direttamente nel liquido e agitando di conseguenza l'intera coltura.

Gran parte dei fotobioreattori sono dotati di un sistema di ricircolo d'aria insufflata dal basso attraverso bolle finissime in grado di movimentare la massa algale (Figure 1.7, 1.8) e garantire un corretto rimescolamento evitando la sedimentazione delle alghe e la formazione di zone d'ombra (Cho and Pott, 2019).

L'aria nel reattore può essere insufflata a diverse velocità dipendenti dal diametro del PBR e da quanto si vuole movimentare la coltura. Il sistema consta quindi nel mescolamento della biomassa algale attraverso diffusione d'aria, esso prende il nome di *air-lift*. Tale sistema è molto utilizzato nei reattori tubolari.



Figura 1.7: Bolle fini in PBR tubolare



Figura 1.8: *Air-lift* in vasca pilota (VP)

Una tecnologia simile è adottata anche nei reattori *flat-panel* nei quali la soluzione è mantenuta in movimento da un generatore di flusso d'aria. Questi ultimi sono reattori composti

da pareti piane verticali il cui ridotto spessore e l'ampia superficie massimizzano la produttività (Liu *et al.*, 2020).

La miscelazione della biomassa algale può essere condotta, non solo con pompe ed agitatori meccanici ma anche con la tecnica dell'*air/gas sparging*. L'*air sparger* permette di ovviare alla mancanza di ossigeno nella coltura; in essa gorgoglia aria compressa o pressurizzata. Lo stesso sistema può essere utilizzato per introdurre CO₂ nel reattore o gas inerte, che è in grado di sovrasaturare il fluido e ridurre il contenuto di ossigeno disciolto (Lakaniemi *et al.*, 2015).

Le spese di aerazione e di agitazione possono rappresentare circa l'80% dei costi di produzione, esse riducono l'efficienza complessiva e la resa del processo. Si tende quindi a sviluppare PBR con sistemi di agitazione ed aerazione efficaci ed al tempo stesso poco costosi al fine di ottenere un aumento della produttività della biomassa.

Un sistema di agitazione efficiente permette di migliorare il trasferimento di massa e la sospensione delle cellule, eliminare i gradienti di luce, inoltre, garantisce un'omogenea miscelazione dei nutrienti.

1.2.3.2 Fonte luminosa

La luce influenza le attività metaboliche dei microrganismi fotosintetici, all'interno dei PBR. Affinché siano garantiti migliori risultati produttivi, oggi si utilizzano dei sistemi di illuminazione artificiali. Si ha la possibilità di scegliere lo spettro luminoso più adatto al tipo di coltivazione e di aumentare la quantità di luce disponibile alle microalghe. Frequente è l'uso di lampade a stretto contatto con i microrganismi e ad energia e potenza variabile, in modo da evitare fenomeni di stress da alte temperature. Ancora più innovativi sono i sistemi di illuminazione con ciclo circadiano o con simulazione della profondità marina (Mukherjee, Madhu and Wangikar, 2020).

Questi sistemi richiedono una grande disponibilità economica e sono quindi per lo più diffusi per esperimenti di laboratorio. Per produrre microalghe a scala industriale bisogna cercare delle soluzioni meno dispendiose che però portino ad aumentare la produttività e l'efficienza dei sistemi odierni (Amaral *et al.*, 2020). L'ideale sarebbe concentrare una grande quantità di luce e poi diffonderla nel terreno di coltura cercando però di contenere la spesa energetica. Essendo troppo costoso l'utilizzo di led e fibre ottiche all'interno di reattori di migliaia di litri, le ricerche si sono spostate verso l'utilizzo di materiali più economici e metodi alternativi per garantire che tutte le microalghe presenti nel reattore siano in contatto con la fonte luminosa.

Nel seguente lavoro, come già detto, viene presentata una soluzione alternativa al classico reattore *raceway* utilizzato per la produzione di microalghe su scala industriale. Si propongono grandi volumi di coltura con all'interno un certo numero di *Nénuphar* (Figura 1.9).



Figura 1.9: Nénuphar all'interno della vasca pilota di 10,1 m³

Attraverso l'utilizzo dei Nénuphar si cerca di aumentare la quantità di luce assorbita dalla coltura algale all'interno della vasca e ridurre al minimo i fenomeni di fotoinibizione e auto ombreggiamento, che si creano in sistemi di coltura troppo profondi. Inoltre l'aggiunta dei Nénuphar nel reattore contribuisce a guidare passivamente la miscelazione della coltura, riducendo potenzialmente il fabbisogno energetico per l'aerazione e l'agitazione; creando un processo economicamente più fattibile.

1.2.3.3 La tecnologia Nénuphar

I PBR convenzionali devono essere costruiti con materiali resistenti ad alta temperatura, di trasparenza elevata, non tossici o corrosivi, il che implica costi più elevati spesso non compatibili con la quantità di microalghe prodotte.

Al fine di incrementare questo tipo di tecnologie si cerca di analizzare e studiare nuovi tipi di PBR ed ottimizzare quelli già esistenti. In particolare, per poter diluire e diffondere la luce fino ad una certa profondità all'interno di colture algali, è stata introdotta la tecnologia Nénuphar. Quest'ultima è stata brevettata da Frédéric Duong (ex direttore dei sistemi energetici - Suez). La tecnologia Nénuphar è composta da tubi concentrici in polimetilmetacrilato (PMMA) collegati ad una manica flessibile ad altezza variabile (Figura 1.10). Più precisamente, la manica è un film di polietilene a bassa densità (LDPE). Una testa emisferica con un foro centrale (Figura 1.11) consente la concentrazione della luce che, in seguito, diffonde nel tubo interno rigido in PMMA (Figura 1.12) e nella manica flessibile.

Questo avviene attraverso un meccanismo di riflessione influenzato dal tipo di materiale e dal liquido presente nel Nénuphar (acqua). I “pozzi di luce” così costruiti, inseriti nelle grandi vasche contenenti la coltura algale, permettono la diffusione della luce anche nella parte bassa del reattore e con il loro movimento contribuiscono alla miscelazione delle alghe.

Pipette per i prelievi di biomassa nella vasca pilota



Nénuphars con maniche bianche e trasparenti per diffondere la luce all'interno dei PBR aperti

Figura 1.10: Dispositivo Nénuphar completo



Figura 1.11: Ghiaia sul fondo



Figura 1.12: Nénuphar, 1° versione

2 Scopo del lavoro

L'obiettivo del presente lavoro è quello di valutare e quantificare la produttività delle colture di microalghe attraverso lo studio di fotobioreattori e l'apporto di nuove tecnologie, minimizzando i costi operativi e di produzione. Questo permette di migliorare il processo di coltura ed incrementare la velocità di crescita dei microrganismi fototrofi.

Ci si è concentrati, in particolar modo, sul perfezionamento del sistema di agitazione utilizzato, oggi, per colture algali in fotobioreattori e sui metodi di insufflamento d'aria. Per analizzarne più facilmente i vantaggi e gli svantaggi, sono stati spesso trascurati i problemi di contaminazione della coltura.

2.1 Attività sperimentale con fotobioreattori di laboratorio

- Studio approfondito dei terreni di coltura utilizzati per la crescita dei ceppi algali.
- Confronto del funzionamento di due PBR di laboratorio contenenti lo stesso volume di coltura (120 l).
- Monitoraggio del comportamento delle microalghe al variare del sistema di agitazione presente e dell'intensità di luce.

Lo studio di ottimizzazione eseguito, in un primo momento, con esperimenti in laboratorio, ci ha permesso di individuare i vantaggi e gli svantaggi dei PBR chiusi ed aperti, dei sistemi di agitazione utilizzati e della quantità di luce necessaria per la crescita della biomassa.

Grazie ai risultati ottenuti è stato possibile definire le condizioni iniziali per colture in reattori di dimensioni maggiori. Questi ultimi vengono collocati all'esterno del laboratorio, di conseguenza, la coltura algale è fortemente condizionata dalle condizioni climatiche del territorio.

2.2 Attività sperimentale con fotobioreattori industriali

- Installazione di due fotobioreattori industriali (10,1 m³ e 2,4 m³) aventi la stessa area di base.
- Inserimento dei Nénuphar nel fotobioreattore più profondo.
- Perfezionamento del sistema di agitazione dei PBR e della tecnologia Nénuphar.
- Studio comparativo delle *performance* dei reattori e della produttività delle microalghe.
- Analisi dell'efficienza dei Nénuphar e del loro contributo ad un eventuale aumento di produttività rispetto ad una tecnologia standard.

Durante i due *batch* di coltura, conclusivi del lavoro sperimentale, le microalghe entrano in contatto con un fascio luminoso più o meno intenso dipendente non solo dalle condizioni meteorologiche, ma anche dall'angolazione del sole nei diversi momenti della giornata. Per monitorare la quantità di luce effettivamente presente nelle vasche, sono stati registrati i valori di PAR a vari livelli di profondità del reattore. È importante ricordare che, l'efficienza dei reattori dipende non solo dalla quantità di luce entrante in essi, ma anche dal sistema di agitazione validato con gli esperimenti eseguiti.

3 Materiali e metodi

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in condizioni autotrofiche, ovvero utilizzando come unica fonte di carbonio per la crescita delle microalghe il carbonio inorganico (CO_2 proveniente dall'atmosfera e NaHCO_3 aggiunto nel medium di coltura).

3.1 Microalghe utilizzate nel lavoro di tesi

Al fine di ottimizzare la produttività della biomassa algale è stata valutata la crescita dei microrganismi fototrofi al variare di molteplici condizioni, quali luce, pH, T, fonte luminosa, sistema di agitazione.

Nei primi test eseguiti in laboratorio è stata utilizzata *Arthrospira platensis*. È stato invece ritenuto opportuno, validare il funzionamento dei fotobioreattori da esterno utilizzando un inoculo misto.

L'inoculo misto contiene microalghe dei generi: *Desmodesmus*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Chlamydomonas* e *Pediastrum*. Esso proviene da un *raceway* classico di 18 m^3 alimentato in continuo presso il laboratorio di biotecnologia dell'ambiente (INRAE-LBE) a Narbona (Francia).

3.2 Fase 1: colture in fotobioreattori di laboratorio

La prima fase del lavoro di tesi si concentra sull'analisi del comportamento delle microalghe all'interno di fotobioreattori da laboratorio: un PBR tubolare ed una vasca circolare, entrambi dotati di illuminazione artificiale.

3.2.1 Fotobioreattore tubolare

Il fotobioreattore tubolare è costituito da una successione di moduli elementari che formano il cosiddetto circuito *airlift*.

Si tratta di 36 tubi lunghi 1 m e con un raggio di 30 mm, assemblati e compattati il più possibile per creare un dispositivo a forma di parallelepipedo ($1,20 \text{ m} \times 0,9 \text{ m} \times 1,65 \text{ m}$). I tubi, disposti ad U, sono connessi tramite 36 flange; inoltre, la loro disposizione è stata progettata per occupare il minor spazio possibile.

Le flange in policarbonato (PC) forniscono il collegamento tra ciascun tubo verticale in polimetilmetacrilato (Plexiglas®). Più precisamente, ogni flangia (Figura 3.1) è composta da due parti che si incastrano l'una sull'altra, una superiore e una inferiore, fissata ai tubi. Esse sono autoclavabili ma molto fragili, dotate inoltre di una guarnizione in silicone che favorisce la chiusura ermetica.

La corretta miscelazione è un elemento essenziale per rendere omogenea la coltura e per le varie reazioni che si verificano all'interno del fotobioreattore. Di conseguenza, ogni sei tubi vengono inviate al reattore portate d'aria comprese tra 0-5 l/min, regolate attraverso sei flussimetri a valvola (Figura 3.2). Per facilitare la pulizia del reattore ed il recupero della biomassa prodotta, vi è la possibilità di ruotarlo in senso antiorario.



Figura 3.1: Flange superiori



Figura 3.2: Flussimetri per l'iniezione dell'aria

Il sistema di illuminazione, installato tra i tubi del fotobioreattore (Figure 3.3, 3.4) è composto da 20 tubi fluorescenti da 28 W. L'intensità della luce è regolabile. All'inizio della coltura, si raccomanda di imporre un'intensità luminosa di $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e diminuirla, se necessario, per evitare fenomeni di fotoinibizione.



Figura 3.3: PBR tubolare 120



Figura 3.4: Miscelazione della coltura

Nel PBR è presente anche un elettrodo di pH dotato di una guarnizione interna in teflon per evitare l'intasamento dovuto all'accumulo di microalghe. L'elettrodo permette di monitorare le variazioni di pH improvvise; un eccessivo aumento o una repentina diminuzione sono collegati al predominare di ceppi algali diversi da quello di interesse, alla presenza di biomassa morta, e ad un maggior numero di batteri, amebe e rotiferi.

Prima e dopo ogni *batch* di coltura è necessario lavare accuratamente il fotobioreattore. I prodotti utilizzati per il lavaggio sono stati: acido citrico (6 g), tiosolfato di sodio (15 g), detersivo (200 ml), candeggina (200 ml) diluiti in 120 l di H_2O .

3.2.2 Fotobioreattore aperto

Il fotobioreattore aperto si presenta come una vasca circolare alta 50 cm ed avente un diametro di 57,5 cm (Figura 3.5). La vasca è stata utilizzata per monitorare il comportamento delle alghe in un volume di coltura pari a 120 l.

In essa vi è un sistema di agitazione costituito da un tubo circolare perforato, fissato sul fondo, attraverso il quale viene inviata aria (0-5 l/min). La vasca è dotata di un sistema di riscaldamento esterno (tubi collegati ad un bagno termostato, Figura 3.6) che permette di mantenere la coltura ad una temperatura maggiore di 25°C.

Una lampada a LED 35 W, posta sul reattore, illumina la superficie della vasca giorno e notte.



Figura 3.5: PBR aperto



Figura 3.6: Sistema di riscaldamento del PBR

3.2.3 Condizioni iniziali per l'analisi sperimentale

Essendo l'*Arthrospira platensis* una delle microalghe che suscita maggior interesse da parte dei produttori industriali si è deciso di utilizzarla per lo studio comparativo nei reattori di laboratorio.

Per far crescere l'*Arthrospira platensis* in reattori da 120 litri è necessario:

- scegliere il terreno di coltura adatto al cianobatterio
- validare il terreno di coltura
- preparare l'inoculo (8-10 l)
- preparare il medium

3.2.3.1 Scelta del terreno di coltura:

Il medium più usato per le colture di *Arthrospira platensis* è il medium Zarrouk (ZM) (Zarrouk, C. 1966). La produttività dell'*Arthrospira platensis* è condizionata dalla fonte di azoto (urea, ammonio o nitrato) e dalla sua concentrazione nel terreno di coltura (ottimale: 2,5 g/l). La produzione di biomassa è inoltre favorita quando la quantità di fosforo, sotto forma di K_2HPO_4 , è maggiore di 250 mg/l.

Il terreno di coltura usato per far crescere l'*Arthrospira platensis* contiene, in media, concentrazioni generalmente elevate di nutrienti. La quantità di composti chimici utilizzata ha quindi un impatto non trascurabile sull'economicità del processo di produzione.

Al fine di ridurre la quantità di composti chimici utilizzata per la produzione della *Arthrospira platensis* si è deciso di ottimizzare il medium *Zarrouk*.

È stato ritenuto opportuno, prendendo spunto dall'articolo (Delrue *et al.*, 2017) analizzare il comportamento della *Spirulina* a diverse diluizioni di *ZM* in beute da 125 ml. Sono state eseguite misurazioni giornaliere del peso secco e della densità ottica (DO) della biomassa algale. In questo modo è stato possibile valutare la concentrazione di biomassa nelle diverse beute, ed il contenuto di clorofilla.

In tutti i terreni di coltura che abbiamo preparato è presente la soluzione di Hutner (1 ml per ogni litro di medium) (Hutner *et al.*, 1950). Quest'ultima contiene oligoelementi e minerali essenziali per la crescita delle alghe ed è stata preparata secondo il protocollo sperimentale validato da Robert Val Lis (ricercatore specializzato in bioraffineria ambientale e metabolismo delle microalghe, presso LBE-INRAE, Narbona, Francia).

I protocolli sperimentali per la soluzione di Hutner e per il medium *Zarrouk* sono disponibili nelle Appendici 1 e 2.

3.2.3.2 Validazione del terreno di coltura

Per validare il terreno di coltura *ZM* sono state allestite 3 colture di *Arthrospira platensis* in beute da 125 ml. Ogni beuta contiene rispettivamente un volume di coltura di 50 ml con *ZM*_{100%}, *ZM*_{50%}, *ZM*_{20%} (Figura 3.7).



Figura 3.7: *Arthrospira platensis*

Il medium *Zarrouk* è stato preparato più volte; dopo aver constatato la presenza di precipitati di ferro, nel primo lotto di coltura, il $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ è stato sostituito dal FeNa-EDTA . Quest'ultimo è un agente complessante a base di ferro utilizzato nelle colture algali come composto chelante ed utile per migliorare la solubilità dell'ossido di azoto (Pelizer *et al.*, 2003).

Il volume iniziale di inoculo di *Spirulina* introdotto nel terreno di coltura è stato deciso attraverso la formula 3.1.

$$DO_i \times V_i = DO_f \times V_f \quad (3.1)$$

La V indica il volume dell'inoculo (V_i) e della soluzione contenuta nelle beute (V_f). La DO indica la densità ottica o assorbanza, ovvero l'energia luminosa che viene assorbita dalla biomassa algale (DO a 750 nm) e dai pigmenti fotosintetici (DO a 680 nm).

Per avere una DO_f nelle beute di 0,05 con un $V_f = 50$ ml è necessario aggiungere un volume di inoculo dipendente dalla densità ottica delle microalghe. Nel caso in esame, l'inoculo di *Spirulina* ha una densità ottica circa unitaria, il volume di inoculo da aggiungere alla soluzione sarà quindi 2,5 ml in ogni beuta.

Per una crescita più uniforme e più rapida, le soluzioni sono poste su un agitatore (130 RPM) davanti ad una fonte luminosa di $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a $T = 25^\circ\text{C}$. Il comportamento delle microalghe nelle tre beute è stato monitorato per un totale di 17 giorni. In seguito, dopo aver analizzato i risultati ottenuti, è stato possibile convalidare il medium ZM e le modifiche apportate a quest'ultimo.

3.2.3.3 Preparazione dell'inoculo

Per poter avere la quantità di inoculo necessaria per monitorare la crescita delle microalghe in un volume di 120 l, abbiamo deciso di preparare 10 l di soluzione con $ZM_{20\%}$.

Anche qui la coltura è stata seguita per 17 giorni effettuando misure di peso secco e densità ottica. Le analisi sono state effettuate in triplicato, riproducendo le stesse condizioni di coltura in tre beute Erlenmeyer da cinque litri (Figura 3.8) nelle quali è stata ripartita la soluzione preparata ($V_{\text{coltura in ogni beuta}} = 3,33$ l).

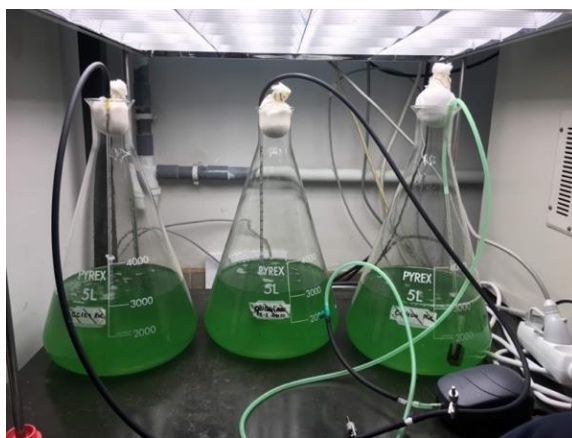


Figura 3.8: *Arthrospira platensis* in beute da 5 litri

La quantità di inoculo introdotta nelle beute è stata calcolata attraverso la Formula 3.1: per avere una DO_f della biomassa algale di 0,05 sono stati introdotti circa 0,2 l di inoculo in ogni beuta.

La luce viene trasmessa dall'alto grazie a un pannello luminoso (LED 35 W), e non dai lati, come per le beute più piccole. Inoltre, le beute Erlenmeyer non vengono posizionate sull'agitatore, la miscelazione della coltura avviene con la tecnica dell'*air sparging*. Le bolle d'aria all'interno della coltura algale diffondono ad una velocità che non danneggia la struttura dell'*Arthrospira platensis*.

Lo *scale-up* finale consiste nell'utilizzare le microalghe, prodotte nelle beute da 5 l, come inoculo per i PBR di laboratorio. L'inoculo di 10 litri viene preparato due volte mantenendo le

stesse condizioni di luce, temperatura ed agitazione della biomassa algale. Una volta raggiunta la fase esponenziale, la maggior parte dell'inoculo viene versato nel fotobioreattore tubolare (Yang et al., 2018). Il restante (~ 0,5 l) viene utilizzato per la preparazione di una nuova coltura in beute, che funge da inoculo per l'avvio della coltura microalgale nel fotobioreattore aperto.

Introducendo il concetto di *scale-up*, si ha la possibilità di monitorare la velocità di crescita delle microalghe in volumi di piccole e medie dimensioni. Viene inoltre studiata la crescita della biomassa al variare delle tecniche di miscelazione della coltura e della fonte luminosa con cui la biomassa è a contatto.

3.2.3.4 Preparazione del medium

La necessità di utilizzare un $ZM_{50\%}$ si presenta solo nel PBR tubolare e non nelle beute da 5 l, utilizzate per preparare l'inoculo. Al fine di paragonare il comportamento dell'*Arthrospira platensis* nei due fotobioreattori da laboratorio, il medium $ZM_{50\%}$ è stato preparato secondo le stesse modalità (Appendici 1 e 2). Per preparare il terreno di coltura i componenti vengono disciolti in 12 litri di acqua distillata, il tutto viene miscelato grazie ad un agitatore a pale.

La soluzione di Hutner, realizzata separatamente, viene aggiunta solo dopo aver verificato che tutti i composti chimici si siano ben disciolti nel terreno di coltura. Dopo circa 24 ore, l'inoculo viene versato nel recipiente contenente il medium creato.

3.2.4 Riempimento dei fotobioreattori ed avvio delle colture

Per riempire il fotobioreattore tubolare è stata utilizzata una pompa che permette di introdurre la soluzione contenente l'inoculo ed il terreno di coltura nel reattore stesso. In contemporanea, è stata aggiunta acqua per arrivare al volume finale di 120 l. La stessa procedura è stata utilizzata per l'avvio della coltura nel fotobioreattore aperto. Dopo aver avviato i due *batch* nei reattori di laboratorio sono stati registrati giornalmente i valori di PAR, temperatura, pH, densità ottica e peso secco. È stato possibile ottenere le curve di crescita in funzione del tempo e confrontare i differenti risultati.

3.3 Fase 2: colture in fotobioreattori industriali

Dopo aver analizzato il comportamento dell'*Arthrospira platensis* nei reattori di laboratorio è stato possibile capire quali sono effettivamente le condizioni ottimali per la crescita della biomassa algale. Per poter arrivare ad una produzione dell'*Arthrospira platensis* su scala industriale, è stato ritenuto opportuno avviare un ulteriore confronto in reattori più grandi.

Sono state avviate due colture, in parallelo, in due grandi vasche (fotobioreattori aperti) aventi la stessa area superficiale ma differente altezza. I Nénuphar sono stati introdotti nella vasca avente volume maggiore.

Al fine di eseguire un'analisi del tasso di crescita delle microalghe, dell'efficienza dei Nénuphar, del sistema di miscelazione e del tipo di reattore ideale, è stato necessario:

- costruire ed attivare il prototipo di riferimento
- costruire il pilota e la vasca secondaria
- stabilire le condizioni iniziali per l'analisi sperimentale
- riempire i fotobioreattori ed avviare le colture (con e senza Nénuphar)

Sono stati avviati in totale 4 *batch* di coltura: due nella vasca secondaria e due nella vasca pilota. Il primo *batch* di coltura nella vasca secondaria, è stato avviato in parallelo con il primo *batch* di coltura nella vasca pilota. Lo stesso vale per gli altri due *batch*.

Durante lo studio comparativo delle colture nei primi due *batch* ci si concentra soprattutto su un'analisi delle caratteristiche fisico-meccaniche del sistema. Si cerca, in particolare, di migliorare il sistema di agitazione e la tecnologia Nénuphar. Nei *batch* successivi, dopo esser riusciti a definire una versione soddisfacente del sistema di agitazione e dei Nénuphar, si passa ad analizzare l'efficienza di questi ultimi e l'aumento di produttività della biomassa nella vasca secondaria e nella vasca pilota. Si è studiato il sistema dal punto di vista chimico e biologico.

3.3.1 Costruzione e attivazione del prototipo di riferimento

Prima di avviare i *batch* di coltura nei fotobioreattori aperti è essenziale costruire il seguente prototipo di riferimento.

Si tratta di un fotobioreattore chiuso di forma cilindrica (Figura 3.9), rivestito di cellophane nero, di altezza 2 m e diametro 57,5 cm.

La luce penetra all'interno della vasca grazie ad un Nénuphar fissato alla superficie del prototipo di riferimento. Costruendo questo dispositivo è possibile esaminare le proprietà del Nénuphar, verificare il suo funzionamento ed apportare le modifiche necessarie per rendere tale tecnologia più efficiente, e testarla nei fotobioreattori aperti.

Nella vasca è presente un sensore che può essere posizionato a diverse altezze (Figura 3.10) e permette di misurare in μA la quantità di fotoni presenti nel liquido in un determinato istante (PAR).



Figura 3.9: Prototipo di riferimento



Figura 3.10: Sonda PAR e testa del Nénuphar

Il Nénuphar può essere spostato solamente lungo la traiettoria orizzontale, per essere più o meno vicino al sensore. Il sensore è, a sua volta, collegato ad un software (*silex*) dove è possibile leggere tutti i valori della PAR misurati, al variare dell'altezza del sensore e della distanza del Nénuphar da esso. Questo ci permette di quantificare la luce che arriva nella vasca grazie alla presenza dei Nénuphar.

La luce si concentra all'interno della cupola circolare, viene riflessa sulla plastica rigida del Nénuphar e poi continua a diffondersi nella manica seguendo le principali leggi dell'ottica:

le leggi di Snell-Descartes (Schott and Beaudoin, 2005). Esse ci permettono di capire effettivamente qual è l'angolo di rifrazione e di riflessione dei raggi luminosi nel Nénuphar stesso.

Per quantificare la luce effettivamente presente nel liquido sono stati fatti numerosi test. Le modifiche effettuate a seguito di ogni test ci hanno permesso di capire quali sono i miglioramenti di cui il Nénuphar ha bisogno.

Per cercare di capire qual è la massima quantità di luce in grado di raggiungere il fondo di una vasca alta due metri, è stato, ad esempio, necessario effettuare prove con:

- coloranti a differenti concentrazioni
- maniche del Nénuphar di diverso spessore e materiale
- cupola del Nénuphar di diverse dimensioni

I test che abbiamo effettuato sono riportati nella Tabella 3.1.

Tabella 3.1: Misure della PAR nel prototipo di riferimento

Fonte luminosa	Tipo di manica	Liquido nella vasca	Liquido nel Nénuphar	Rivestimento interno del Nénuphar (parte rigida)
<i>sole</i>	trasparente (150 μ m)	H ₂ O	H ₂ O	-
<i>sole</i>	bianca (4 %)	H ₂ O	H ₂ O	-
<i>sole</i>	trasparente (150 μ m)	H ₂ O	H ₂ O	nastro adesivo di alluminio
<i>sole</i>	trasparente (150 μ m)	H ₂ O + colorante (70 g)	H ₂ O	nastro adesivo di alluminio
<i>sole</i>	trasparente (150 μ m)	H ₂ O + colorante (230 g)	H ₂ O + latte (100 ml)	nastro adesivo di alluminio e biglia riflettente sul fondo
<i>sole</i>	trasparente (150 μ m)	H ₂ O + colorante (230 g)	H ₂ O	nastro adesivo di alluminio e biglia riflettente sul fondo
<i>sole</i>	parafilm riflettente in alluminio	H ₂ O	H ₂ O	nastro adesivo di alluminio e biglia riflettente sul fondo
<i>LED (50 W)</i>	parafilm riflettente in alluminio	H ₂ O	H ₂ O	nastro adesivo di alluminio e biglia riflettente sul fondo
<i>LED (50 W)</i>	trasparente (150 μ m)	H ₂ O	H ₂ O	nastro adesivo di alluminio
<i>LED (50 W)</i>	trasparente (150 μ m)	H ₂ O + colorante (70 g)	H ₂ O	nastro adesivo di alluminio

LED (50 W)	trasparente (150 μm)	H ₂ O	H ₂ O + latte (100 ml)	nastro adesivo di alluminio
LED (50 W)	trasparente (150 μm)	H ₂ O + colorante (230 g)	H ₂ O + latte (100 ml)	nastro adesivo di alluminio e biglia riflettente sul fondo
LED (50 W)	bianca (4 %)	H ₂ O	H ₂ O	-

Per effettuare le misure con il LED da 50 W (3400 lm) è stata costruita una base rivestita con del nastro adesivo di alluminio (Figura 3.11).



Figura 3.11: Supporto per LED

Essa permette di centrare perfettamente il fascio luminoso proveniente dal LED sulla testa del Nénuphar.

Registrando la data, l'ora e la durata di ogni prova è stato possibile risalire alla posizione del sole durante i diversi test eseguiti. Oltre ad una sonda PAR interna alla vasca (PAR_{in}), è indispensabile la presenza di una sonda esterna (PAR_{ext}) di riferimento. Essa è posizionata accanto al prototipo, in un secondo Nénuphar, privo di manica e riempito con acqua distillata. I due sensori PAR sono dello stesso modello ma sono posizionati in modo diverso. Il sensore esterno è orientato verso l'alto, mentre quello interno è orientato verso il Nénuphar, quindi è parallelo al terreno.

Per ogni campagna di misura è necessario:

- fissare una distanza X tra la sonda ed il Nénuphar, muovendo orizzontalmente il Nénuphar tra 1 e 6 cm, passo dipendente dal test eseguito
- variare la posizione del sensore verticalmente, lungo y, tra 15 e 195 cm, passo = 10 cm (a 195 cm, la sonda è sul fondo del prototipo)
- trascrivere sul foglio di misura (Tabella 3.2) i valori della PAR_{in} e PAR_{ext} registrati su silex ogni volta che la sonda della PAR_{in} viene spostata
- raggruppare i dati raccolti attraverso la costruzione di grafici in funzione della quantità di luce (PAR in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) che entra nella vasca.

Tabella 3.2: Foglio di calcolo per la registrazione dei valori della PAR

Lumière						
Liquide considéré						
Tind (°C)						
Date						
Heure à l'aparté campagne de mesure						
Heure fin campagne de mesure						
PAR (μA)	y (cm)	x (cm)				
					Moyenne	Écart type
PARin	15					
PARext						
PARin	25					
PARext						
PARin	35					
PARext						
PARin	45					
PARext						
PARin	55					
PARext						
PARin	65					
PARext						
PARin	75					
PARext						
PARin	85					
PARext						
PARin	95					
PARext						
PARin	105					
PARext						
PARin	115					
PARext						
PARin	125					
PARext						
PARin	135					
PARext						
PARin	145					
PARext						
PARin	155					
PARext						
PARin	165					
PARext						
PARin	175					
PARext						
PARin	185					
PARext						
PARin	195					
PARext						

Questo ci permette di confrontare le diverse prove tra loro, valutare l'influenza della posizione del sole e l'angolo di incidenza dei raggi sulla testa a cupola del Nénuphar. Per ogni punto (x, y) vengono registrati 4-5 valori di PAR in modo da evitare il più possibile errori sperimentali. Alla fine di ogni prova i valori di PAR sono convertiti da μA in $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$.

Grazie alle diverse intensità luminose che si hanno durante la giornata e all'impiego di una lampada a LED da 50 W, è stato possibile misurare la PAR con la sonda installata sul prototipo e, contemporaneamente, con la sonda di riferimento. Con i dati raccolti si riesce ad ottenere una linea di calibrazione (Appendice 3) per la conversione dei valori. La lampada a LED è stata inoltre utilizzata per stabilire una correlazione tra la PAR e la concentrazione di colorante. La curva PAR-concentrazione di colorante (Appendice 3) è ottenuta ponendo una sonda portatile su un recipiente contenente acqua e colorante a base di clorofilla (Figura 3.12). Si varia la concentrazione di colorante e l'intensità luminosa della lampada.

Questo ci permette di collegare le concentrazioni di colorante utilizzate nei test con il prototipo di riferimento, con la quantità di biomassa algale presente nei fotobioreattori. Ad ogni valore della PAR corrisponde non solo un valore di concentrazione di colorante, ma anche un valore di concentrazione della biomassa algale (in termini di TSS, solidi totali sospesi).

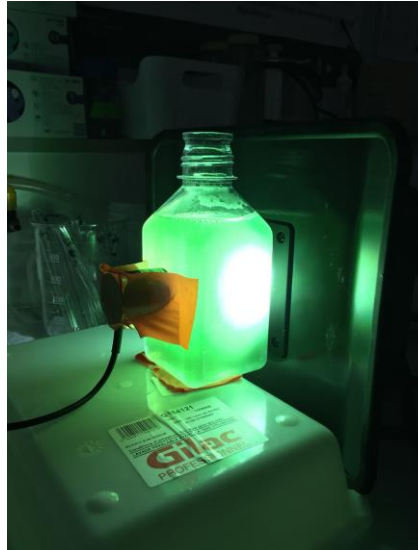


Figura 3.12: Misurazione della PAR effettuata a scala di laboratorio al fine di determinare una correlazione tra PAR e concentrazione di colorante

3.3.2 Costruzione del pilota e della vasca secondaria

Dopo aver messo a punto il dispositivo per analizzare i vantaggi della tecnologia Nénuphar, è stato possibile passare alla costruzione dei due fotobioreattori aperti.

Essi si presentano come grandi vasche aventi la stessa superficie (diametro 2,48 m). La vasca pilota (VP) ha un'altezza di 2,1 m (volume utile = 9,7 m³ senza Nénuphar).

La vasca secondaria (VS) ha un'altezza di 50 cm (volume utile = 1,45 m³), viene utilizzata per simulare le colture in reattori di tipo *raceway*. Avviando la crescita della biomassa algale nelle due vasche è possibile analizzare i vantaggi e gli svantaggi dei metodi di coltura e dei sistemi innovativi proposti.

Di seguito sono riportate le immagini dei due reattori (Figure 3.13, 3.14).

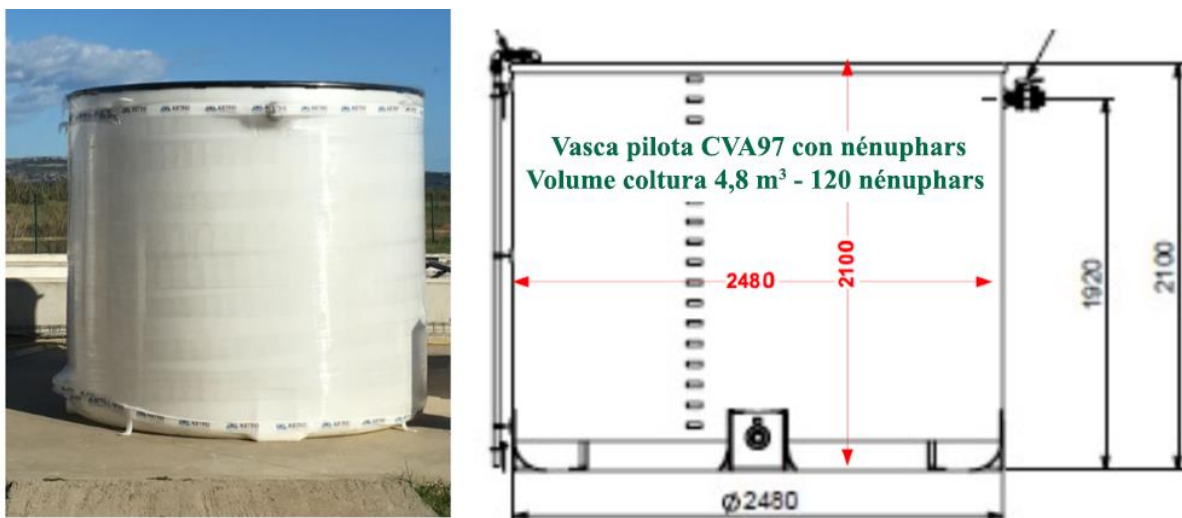


Figura 3.13: Vasca pilota con i Nénuphar all'interno: foto (a), sezione con misure in millimetri (b)

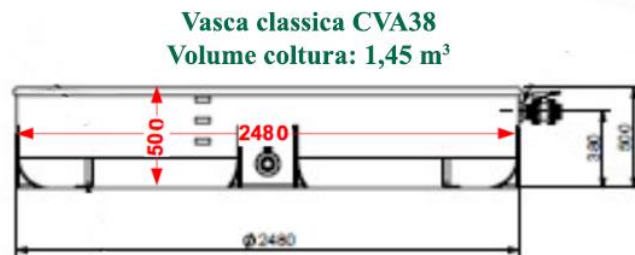


Figura 3.14: Vasca secondaria che simula un *raceway* classico: foto (a), sezione della vasca secondaria con misure in millimetri (b)

I due reattori sono stati installati nella parte esterna del laboratorio, ad essi sono stati collegati sensori per il controllo della temperatura, del pH e della PAR. I dispositivi per favorire l'agitazione della coltura sono stati aggiunti al momento della definizione delle condizioni sperimentali.

3.3.3 Condizioni iniziali per l'analisi sperimentale

Per lo studio comparativo nei reattori industriali è stato necessario fare particolarmente attenzione al sistema di miscelazione delle colture. Esso è un parametro fondamentale, utile a garantire un aumento di produttività di un qualsiasi tipo di biomassa.

Per far crescere la biomassa algale nelle due vasche aventi la stessa area di base, risulta necessario:

- scegliere il sistema di miscelazione
- scegliere il terreno di coltura adatto a diversi tipi di microalghe
- validare il terreno di coltura
- preparare l'inoculo (1100 l-1600 l)
- preparare il medium

3.3.3.1 Scelta del sistema di miscelazione

Al fine di riprodurre le stesse condizioni di coltura nei due fotobioreattori è stato necessario pensare ad un sistema di miscelazione adeguato a tutte e due le vasche in esame.

All'interno della vasca pilota sono state inserite, inizialmente, due pompe a immersione; nella vasca secondaria, ne è stata inserita una sola. Avendo il reattore pilota un volume 4,2 volte maggiore rispetto al reattore secondario, la presenza di sole due pompe nella vasca non rende omogenea la soluzione. Da qui l'esigenza di costruire un sistema di areazione che permetta di inviare l'aria all'interno del reattore. Esso è costituito da una pompa (*air blower* da 1200 W) a portata variabile collegata ad una rete di tubi (tipo PVC rigido) posizionati sul fondo del PBR (Figure 3.15, 3.16). Il funzionamento del sistema di miscelazione è stato inizialmente testato con acqua.



Figura 3.15: *Air blower* da 1200 W

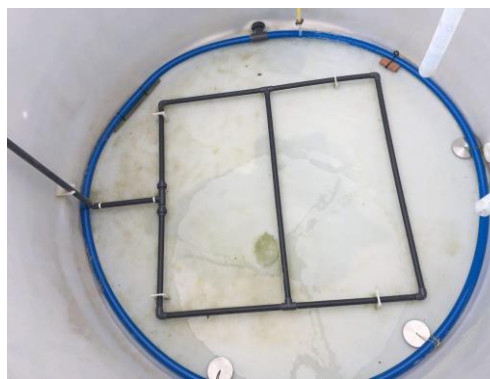


Figura 3.16: rete di tubi in PVC rigido (neri), PVC morbido (blu)

Al momento dell'introduzione dei *Nénuphar*, è stato necessario progettare un sistema che permettesse il loro movimento all'interno del pilota. Questo sistema è chiamato *carrousel* (Appendice 4). Esso è un dispositivo ad azionamento meccanico, dotato di braccia con dita flessibili che guidano i *Nénuphar* in un movimento circolare.

Il *carrousel* ed il sistema di aerazione non funzionano contemporaneamente. Per evitare danni ai *Nénuphar*, la pompa *air blower* viene inizialmente attivata per 15 minuti ogni 45 minuti, quando essa è in azione il *carrousel* è fermo. Tuttavia, in seguito ai risultati ottenuti dopo i primi *batch* di coltura nei due reattori, è stato necessario apportare ulteriori modifiche al sistema di agitazione ed al tempo di attivazione di quest'ultimo. Le modifiche vengono descritte di seguito e testate nei *batch* di coltura successivi.

Per rendere la miscelazione nelle due vasche più efficiente, le pompe ad immersione sono state rimosse e sostituite da una pompa di ricircolo. Essa permette il ricircolo della soluzione ed è collegata ad un tubo in PVC morbido, esterno ai reattori, che permette la reintroduzione della soluzione nelle vasche (Figura 3.17).



Figura 3.17: Quadro generale: vasca pilota ($10,1 \text{ m}^3$), vasca secondaria ($2,4 \text{ m}^3$)

Nel PBR pilota il ricircolo della soluzione avviene dall'alto verso il basso, essa è immessa attraverso una rete di tubi forati disposti sul fondo della vasca, lungo la circonferenza. Nel PBR secondario, essendo più basso, non è presente una rete di tubi ma un unico tubo che è posizionato in modo da generare un movimento circolare della coltura stessa.

Le modificazioni dettagliate effettuate alla rete di tubi del sistema di aerazione e della pompa di ricircolo sono riportate in appendice 5.

La pompa di ricircolo nella vasca secondaria è attivata ogni 30 minuti per 30 minuti. Nella vasca pilota si cerca di stabilire il giusto equilibrio tra l'attivazione del *carrousel*, della pompa *air blower* e della pompa di ricircolo. Al fine di creare un *air-lift*, la pompa di ricircolo e la pompa *air blower* vengono attivate contemporaneamente per 5 minuti ogni 10 minuti; al momento della loro attivazione, il *carrousel* viene stoppato.

3.3.3.2 Scelta del terreno di coltura adatto a diversi tipi di microalghe

Prima di iniziare i *batch* di coltura nella vasca pilota e nella vasca secondaria, oltre alla costruzione e validazione del sistema di miscelazione e della tecnologia Nénuphar, risulta importante scegliere e validare il terreno di coltura, al fine di garantire una crescita ottimale della biomassa algale.

Per scegliere il medium adatto alle colture nei PBR industriali siamo partiti da quello utilizzato nei PBR di laboratorio (120 l).

L'obiettivo è quello di ottimizzare il medium *Zarrouk* utilizzato nella prima fase del mio lavoro di tesi, al fine di adattarlo a differenti tipi di microalghe e a volumi maggiori. Si cerca soprattutto, di ridurre la quantità di prodotti utilizzati per la preparazione del medium e quindi le spese di gestione e di acquisto dei materiali. Sapendo che il medium *Zarrouk* è stato usato per colture pure di *Arthrospira platensis*, si cerca di trovare un nuovo medium, molto più economico ed adatto a differenti tipi di microalghe. Ne è un esempio il *Bold's Basal* medium (*BBM*). Quest'ultimo è utilizzato soprattutto per colture miste, ha un pH compreso tra 7 ed 8, ed una composizione simile al *ZM*. Tuttavia, nelle stesse condizioni sperimentali, la quantità di biomassa prodotta in colture con medium *BBM* è inferiore rispetto a quella prodotta in colture con medium *ZM*.

Di conseguenza partendo dai classici terreni di coltura: *ZM* e *BBM* si cerca:

- di modificare *ZM* in modo da diminuirne il costo, ma non influenzare negativamente la quantità di biomassa prodotta $\left(\frac{g_{biomassa}}{l_{soluzione}}\right)$.
- di modificare *BBM* in modo da aumentare la produttività di microalghe in tale terreno di coltura.

A seguito delle modifiche effettuate, il *BBM_{modificato}* verrà scelto per colture miste. Il *ZM_{modificato}* verrà invece scelto per colture di *Arthrospira platensis*, che saranno avviate solo dopo aver validato il sistema di agitazione e la tecnologia Nénuphar.

I medium trovati in letteratura sono stati modificati e validati tramite dei test in micropiastre a 24 pozzetti. Per stabilire quali sono esattamente le concentrazioni molari di ogni composto chimico nei terreni di coltura studiati siamo partiti da un'analisi del medium *BBM*.

A partire da esso, abbiamo calcolato che, se utilizziamo 60 mmol/l di bicarbonato, sono necessari 9 mmol/l di azoto e 0,57 mmol/l di fosforo.

Tali concentrazioni molari vengono calcolate rispettando il rapporto molare medio (rapporto di Redfield). Il rapporto di Redfield è un indice essenziale per la crescita delle

microalghe, indica il rapporto tra C:N:P della biomassa algale corrispondente a 106:16:1 (Redfield, 1934).

Tuttavia, poiché il carbonio inorganico è presente, non solo nel bicarbonato ma anche nell'anidride carbonica (nell'aria), è meglio sovrastimare la quantità di N e P per assicurarsi che non siano presenti in concentrazioni limitanti la crescita della biomassa.

Di conseguenza, abbiamo deciso di impostare la quantità di N a 10 mmol/l e la quantità di P a 1 mmol/l e di correggere tale valore solo se la quantità di bicarbonato utilizzata è superiore a 60 mmol/l.

Sappiamo, grazie ai test effettuati con le beute da 125 ml (Paragrafo: 3.2.3), che la crescita delle microalghe è garantita non solo con $ZM_{100\%}$, ma anche con $ZM_{50\%}$ e $ZM_{20\%}$, ovvero diluendo il medium *Zarrouk* con $F_d = 2$ e $F_d = 5$.

Per avere un medium *Zarrouk* con all'incirca 10 mmol/l di N e 1 mmol/l di P, è necessario effettuare una diluizione con $F_d = 2,94$ (*Zarrouk* 34%). Dopo aver calcolato $ZM_{34\%}$, le concentrazioni molari dei suoi componenti risultano circa uguali a quelle di $BBM_{modificato}$; è stato solo necessario adattare le quantità di NaCl e $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. L'obiettivo dei seguenti calcoli è quello di riuscire a validare un medium *Zarrouk*, opportunamente diluito, che ci permetta di ottenere una rilevante crescita delle microalghe, utilizzando una quantità minore di prodotti chimici.

Abbiamo così scelto i due medium ottimali: $ZM_{modificato}$ e $BBM_{modificato}$. La quantità di bicarbonato necessaria per la crescita della biomassa viene stabilita attraverso i risultati ottenuti nella fase di validazione dei terreni di coltura.

3.3.3.3 Validazione del terreno di coltura

La fase di validazione del medium è indispensabile per testare i vantaggi dei terreni di coltura scelti. Essa consiste nel monitorare per 8 giorni la crescita della biomassa algale.

Più precisamente, sono state eseguite quattro prove, due in micropiastre con $BBM_{modificato}$ e due in micropiastre con $ZM_{modificato}$. Le micropiastre utilizzate sono piastre sterili ThermoFisher da 24 pozzetti (Figura 3.18), 1 ml di soluzione è stata aggiunta in ciascun pozzetto.

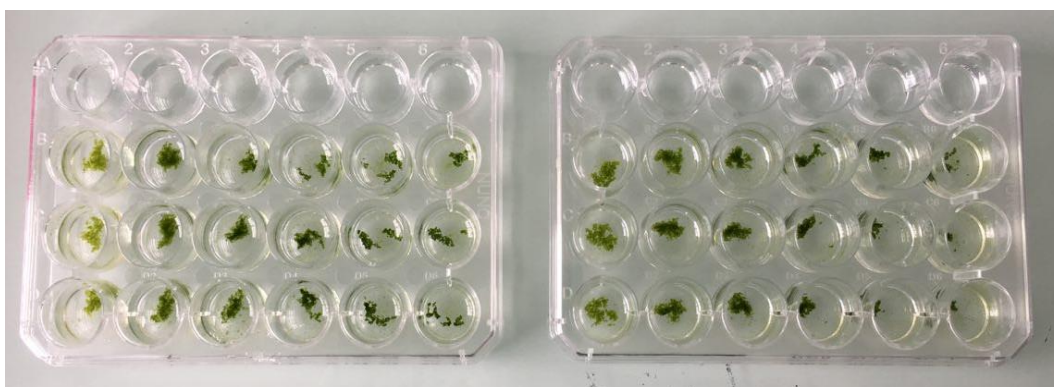


Figura 3.18: Micropiastre con terreno di coltura $ZM_{modificato}$ (sinistra) e $BBM_{modificato}$ (destra)

Le micropiastre sono costituite da 4 righe e 6 colonne. Per ogni colonna è stata modificata unicamente la quantità di NaHCO_3 ; in un primo momento tra 0 e 40 mmol/l e, nelle ultime due prove, tra 30 e 80 mmol/l.

La prima riga è riservata al bianco (terreno di coltura senza inoculo), mentre le altre fungono da triplicati per ogni condizione (medium a differenti concentrazioni di bicarbonato + inoculo).

L'inoculo introdotto nei pozzetti ha un peso secco di 0,3 mg/l, contiene diverse microalghe quali *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Desmodesmus*, *Chlamydomonas*, e *Pediastrum*. Esso permette di avere in ogni pozzetto delle colture la cui quantità iniziale di biomassa algale, in termini di peso secco, è all'incirca pari a 0,02 g/l. L'inoculo è stato prelevato dal *raceway* presente al laboratorio (INRAE-LBE) e gestito dal *Postdoctoral Researcher* Gaetano Zuccaro. È lo stesso usato per iniziare la coltura nei due grandi bacini, rispettivamente di 10,1 m³ e 2,4 m³.

L'esperimento consiste nel misurare, giornalmente, la densità ottica delle colture presenti in ognuno dei 24 pozzetti della micropiastre. Da essa è possibile risalire al peso secco (Appendice 6), e monitorare la crescita della biomassa in funzione del tempo.

In alcuni casi è stato necessario effettuare più di una misura al giorno per ridurre gli errori sperimentali. Prima di inserire la micropiastre nello spettrofotometro è importante miscelare con l'aiuto di una pipetta il volume di liquido in ogni pozzetto, per poter avere una sospensione omogenea delle microalghe ed aumentare la precisione del dato registrato dal macchinario.

Dopo aver effettuato la misura di DO giornaliera, le micropiastre vengono messe all'interno di un incubatore, in agitazione (100 RPM), ad una temperatura di 25 °C e sotto illuminazione continua ($100 \pm 10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

Il primo e l'ultimo giorno di ogni test sono stati misurati i valori di pH (Appendice 7) in ciascun pozzetto; un'eccessiva variazione di pH, durante gli otto giorni di coltura, può inibire o limitare la crescita delle microalghe e la resa di trasformazione del substrato nel prodotto finale. Grazie agli esperimenti eseguiti sarà possibile dedurre con quale concentrazione molare di bicarbonato la produttività della biomassa è massima.

I medium $ZM_{\text{modificato}}$ e $BBM_{\text{modificato}}$ (Appendice 8) vengono validati non solo grazie alle misure giornaliere di DO e TSS, ma anche attraverso una stima della velocità di crescita della biomassa algale. Per stimare il tasso di crescita μ_{max} della biomassa utilizziamo la seguente equazione (Formula 3.2):

$$\mu_{\text{max}} = \frac{\ln(C_f) - \ln(C_i)}{t_f - t_i} \quad (3.2)$$

C_f e C_i indicano le concentrazioni di biomassa ($\text{g}_{\text{TSS}}/\text{l}$) rispettivamente ai tempi (giorni⁻¹, d⁻¹). I tempi t_i e t_f corrispondono all'inizio e alla fine della fase esponenziale. Questi tempi sono determinati graficamente attraverso la curva ottenuta dalla formula seguente (Formula 3.3):

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = f(t) \quad (3.3)$$

C_t e C_0 indicano le concentrazioni di biomassa (g_{TSS}/l) rispettivamente all'istante t o all'istante iniziale. La fase esponenziale corrisponde alla parte lineare di questa curva, il che consente di determinare i tempi t_f e t_i .

3.3.3.4 Preparazione dell'inoculo

La preparazione dell'inoculo occupa alcuni giorni, essa avviene nella vasca secondaria.

Tramite pompe ad immersione, una certa quantità di microalghe, presenti nel *raceway* di 18 m^3 , è trasferita nella vasca adiacente. L'inoculo viene monitorato e miscelato per alcuni giorni finché, durante la fase di crescita esponenziale, viene prelevato ed utilizzato per l'avvio, in parallelo, dei due *batch* di coltura.

La miscelazione dell'inoculo avviene: con pompe ad immersione per le prime due colture avviate, con una pompa di ricircolo per le successive.

Per il primo *batch* di coltura sono stati preparati, in totale, circa 1594 l di inoculo. Per i *batch* successivi, la quantità totale di inoculo preparata è minore (1174 l); tale quantità è calcolata secondo la Formula 3.1 (Paragrafo 3.2.3).

I litri di inoculo da utilizzare dipendono dalla densità ottica, dal peso secco delle microalghe, dal tipo (*Desmodesmus*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Chlamydomonas* e *Pediastrum* presenti in quantità differenti) e dal volume del reattore. Nella vasca pilota, la quantità di inoculo da introdurre è condizionata anche dal numero di Nénuphar presenti e quindi, dal volume occupato da essi.

I Nénuphar aggiunti nel pilota durante il primo *batch* (avviato in data 15/09/19) sono 120, essi occupano circa il 50% della superficie disponibile. Questi ultimi, essendo troppo vicini, tendono a danneggiarsi, scontrandosi tra loro, soprattutto quando il *carrousel* è in azione. Di conseguenza, nei *batch* di coltura successivi solo il 33,5% della superficie disponibile è occupata dai Nénuphar, il loro numero è stato ridotto a 80.

3.3.3.5 Preparazione del medium

La preparazione del medium da utilizzare nelle due vasche avviene nel reattore pilota. Tutti i componenti vengono inizialmente mescolati in una vasca da 500 l, e poi introdotti nel reattore pilota. Essi vengono miscelati ulteriormente grazie alle pompe ad immersione ed al sistema di areazione, al fine di evitare la presenza di sali non disciolti.

Dopo aver aggiunto la soluzione di Hutner ed una quantità d'acqua tale da riempire circa i 2/3 del volume del reattore, la soluzione è lasciata per circa 12 ore nella vasca pilota.

Questo garantisce il degasaggio e la completa dissoluzione dei composti chimici utilizzati.

3.3.4 Riempimento dei fotobioreattori ed avvio delle colture (con e senza Nénuphar)

L'avvio delle colture si ha solo dopo aver miscelato l'inoculo con il medium contenuto nel pilota. A questo punto è possibile ripartire nei due fotobioreattori industriali, il volume di coltura preparato nella vasca pilota, attraverso l'uso di pompe ad immersione.

Per ripartire tale volume in maniera proporzionale, tenendo quindi conto delle dimensioni di ciascun reattore, si seguono i calcoli sottostanti (Formule 3.4, 3.5, 3.6).

$$V_{f,VS} + V_{f,VP} = V_{f,tot} \quad (3.4)$$

$$V_1 = \frac{V_{tot}^*}{V_{f,tot}} \times V_{f,VP} \quad (3.5)$$

$$V_2 = \frac{V_{tot}^*}{V_{f,tot}} \times V_{f,VS} \quad (3.6)$$

Ricordiamo che:

V_{tot}^* = volume del medium + H₂O + inoculo da ripartire nelle due vasche

$V_{f,VS}$ = volume di coltura finale nella vasca secondaria

$V_{f,VP}$ = volume di coltura finale nella vasca pilota

$V_{f,tot}$ = volume finale, totale

V_1 = volume restante nella vasca pilota

V_2 = volume da spostare nella vasca secondaria

Prima dell'avvio delle colture, entrambe le vasche sono state foderate con del cellophane nero per evitare l'entrata della luce dai lati. In questo modo è possibile effettivamente capire se, grazie ai Nénuphar (aggiunti nella vasca pilota), le microalghe ricevono una maggiore quantità di luce in profondità.

3.4 Metodi di misura

Per monitorare la crescita delle microalghe nei PBR di laboratorio sono state eseguite, giornalmente, misurazioni della densità ottica e del contenuto di sostanza secca (solidi totali sospesi: TSS). Sono stati registrati i valori di temperatura e pH della coltura algale in modo da controllare brusche variazioni di pH e mantenere la soluzione ad una temperatura non inferiore a 25 °C. È stata inoltre valutata la radiazione fotosinteticamente attiva (PAR), uno studio più dettagliato dell'incidenza della luce sulla coltura algale è stato fatto nel fotobioreattore tubolare.

La PAR è stata misurata sui 4 tubi esterni del PBR e nello spazio tra essi ed il tubo adiacente. I punti dove i valori vengono registrati sono indicati da numeri (Figure 3.19, 3.20) che partono da 1 e, con un passo di 0,5 arrivano ad 8. I dati sono stati raccolti per più giorni al fine di registrare la variazione della luce ricevuta dalla biomassa algale, dipendente della quantità di biofilm formatasi sui tubi del reattore.

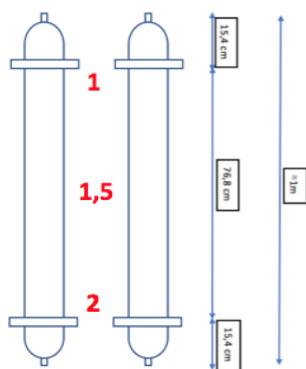


Figura 3.19: Schema della posizione della sonda PAR tra i tubi

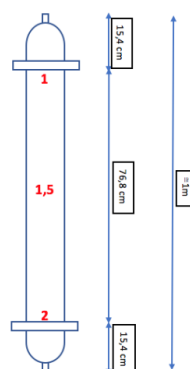


Figura 2.20: Schema della posizione della sonda PAR sui tubi

Per valutare l'assenza o la presenza di contaminazioni nella coltura algale, la quantità di biomassa morta, la lunghezza della Spirulina, il colore ed il tipo di eliche, vengono prelevati numerosi campioni di biomassa algale dai due PBR di laboratorio. Le microalghe sono osservate al microscopio ottico e a quello stereoscopico per controllare la presenza di batteri, biomassa morta ed altri microrganismi.

Per monitorare invece la crescita delle microalghe nei PBR industriali, sono state fatte le seguenti misurazioni:

- valutazione dell'impatto del clima sulle colture algali attraverso i dati raccolti dalla stazione meteorologica disponibile presso l'INRAE-LBE
- misurazione continua di pH, temperatura, PAR
- misurazione della conduttività e dell'ossigeno disciolto nella coltura (3 volte al giorno)
- campionamento manuale per determinare:
 - la densità ottica ed il contenuto di sostanza secca (solidi totali sospesi: TSS)
 - la cinetica di crescita delle microalghe
 - la natura delle specie presenti al microscopio, al fine di verificare l'eventuale presenza di batteri e altri tipi di microalghe
 - il contenuto di azoto (NH_4 , NO_2 , NO_3 , N_{totale} , $\text{N}_{\text{solubile}}$) e fosforo (P_{totale} e $\text{P}_{\text{solubile}}$) per conoscere la loro cinetica di consumo
 - il COD (domanda chimica di ossigeno) in mgO_2/l .

Le seguenti analisi ci aiutano a comprendere i contributi apparentemente positivi della tecnologia Nénuphar rispetto ad un processo convenzionale, nonché i suoi costi di installazione.

3.4.1 Densità ottica

La crescita cellulare, in ogni tipo di coltura, è stata quantificata misurando la densità ottica a 750 nm e 680 nm . La differenza tra la DO misurata a 680 e quella misurata a 750 consente di stimare la quantità di alghe presenti nella coltura (Pelizer *et al.*, 2003).

La DO viene misurata con lo spettrofotometro convenzionale *FT-IR Nicolet™ iS™5 di Thermo Scientific™*. Circa 1 ml di coltura viene introdotto in una cuvetta da 1 cm . Prima di misurare la densità ottica della coltura, una cuvetta contenete acqua Milli-Q (bianco) viene utilizzata per ricalibrare lo strumento. Tutte le misure vengono fatte con lo spettrofotometro convenzionale ad eccezione di quelle per le colture in micropiastre.

Per gli esperimenti su micropiastre, la DO viene misurata mediante lo spettrofotometro *Infinite Nanoquant M200* (Tecan®). La lettura avviene ponendo le piastre multiwell 24 pozzetti direttamente nello spettrofotometro. Lo spettrofotometro lavora 2-3 minuti, agitando, per qualche secondo, la micropiastre prima di ogni misura; i dati sono automaticamente registrati su un foglio Excel. Tramite questo macchinario è possibile anche ricavare lo spettro di assorbimento della coltura, e capire a quale lunghezza d'onda la luce viene assorbita dalla biomassa e/o dai pigmenti presenti all'interno.

La DO a 680 nm non è stata misurata per le colture di *Arthrospira platensis* perché a questa lunghezza d'onda, la maggior parte della luce viene assorbita dalla ficocianina (pigmento predominante) (Pandey, Pathak and Tiwari, 2010). Questa misura non è in questo caso necessaria per quantificare la crescita della biomassa.

3.4.2 Solidi totali sospesi

La misura del contenuto di sostanza secca (peso secco o TSS) è una delle analisi più significative per la valutazione del tasso di produttività di microalghe. Viene determinata attraverso la filtrazione di un volume di coltura stabilito (10 ml). La filtrazione avviene mediante l'utilizzo di filtri in microfibra di vetro costituiti al 100% da fibre di vetro borosilicato senza leganti (filtri da 1,2 μm (GF/C) Whatman^(R)). Il filtro dopo la filtrazione viene posizionato su dei piattini in alluminio (monouso) e lasciato in forno per 24 ore a 105 °C.

Il piattino in alluminio ed il filtro vengono pesati prima della filtrazione e dopo essere stati in forno. Il totale dei solidi sospesi viene ricavato come segue (Formula 3.7).

$$TSS (mg/l) = \frac{(M_1 - M_0) \times 1000}{V_{campione}} \quad (3.7)$$

M_1 = peso in mg del piattino + filtro + residuo del campione dopo essiccamento;

M_0 = peso in mg del piattino + filtro prima di essere usato;

$V_{campione}$ = volume in ml del campione sottoposto a filtrazione.

I valori di TSS vengono calcolati per monitorare i diversi stadi di crescita della coltura e stabilire una correlazione con la densità ottica.

Le misurazioni di DO e TSS sono state sempre eseguite in triplicato (tre misurazioni utilizzando uno stesso campione e/o tre misurazioni utilizzando tre campioni diversi). Questo ci permette di calcolare la deviazione standard e di raccogliere dati più precisi.

3.4.3 Azoto, fosforo, COD

Per monitorare al meglio la crescita delle microalghe risulta essenziale misurare il contenuto di azoto, fosforo e ossigeno (sotto forma di COD) presente nella coltura (Hu *et al.*, 2020). Tutte le misure vengono effettuate sulla coltura algale non appena prelevata dai reattori (N_{totale} , $PO_4\text{-P}_{totale}$ e COD_{totale}), e sulla stessa centrifugata e filtrata ($N_{solubile}$, $PO_4\text{-P}_{solubile}$ e $COD_{solubile}$).

Per il calcolo di $N_{solubile}$, $PO_4\text{-P}_{solubile}$ e $COD_{solubile}$ è necessario centrifugare il campione ad una velocità minima di 9600 RPM per 15 minuti a 4 °C e filtrarlo attraverso un filtro da 0,45 μm .

Le misure di azoto come N_{totale} e N_{solubile} e fosforo come $PO_4\text{-P}_{\text{totale}}$ e $PO_4\text{-P}_{\text{solubile}}$ vengono eseguite, settimanalmente, per le colture nei fotobioreattori industriali utilizzando degli appositi Kit (Figura 3.21).

Kit azoto: LCK 338 Laton. (*range* di misura 20-100 mg/l TN_b)

Kit fosforo: LCK 348 (*range* di misura 0,5-5,0 mg/l $PO_4\text{-P}$).

Una quantità nota di campione viene aggiunta in provette contenenti reagenti predosati. Avviene così una reazione colorimetrica. In seguito, uno spettrofotometro a lunghezza d'onda variabile è utilizzato per misurare l'assorbanza della soluzione.

Ogni provetta è dotata di un codice a barre, il quale permette allo strumento di identificare qual è l'analisi che deve essere eseguita. In funzione della luce assorbita è possibile conoscere la concentrazione di azoto e fosforo nella biomassa algale.



Figura 3.2: Kit di azoto, fosforo e COD

Le misure di COD in mgO_2/l sono anch'esse eseguite settimanalmente, attraverso l'apposita procedura descritta nel Kit e l'analisi spettrofotometrica. Il *range* di misura da rispettare in questo caso, è molto più ampio (0-1500 mg/l).

Il COD (domanda chimica di ossigeno) rappresenta la quantità di ossigeno necessaria per la completa ossidazione per via chimica dei composti organici ed inorganici presenti nella soluzione. Permette quindi una valutazione indiretta della concentrazione di sostanze organiche chimicamente ossidabili presenti nel liquido in questione.

Sottraendo al COD_{totale} il COD_{solubile} , è possibile capire qual è la quantità di ossigeno “fissata” sulla biomassa. Così come, sottraendo al $PO_4\text{-P}_{\text{totale}}/N_{\text{totale}}$ il $PO_4\text{-P}_{\text{solubile}}/N_{\text{solubile}}$ è possibile capire quali sono le quantità di azoto e fosforo assorbite dalle microalghe.

3.4.4 Cromatografia ionica

La quantità di nitrati, nitriti e ioni ammonio ($NO_2\text{-}NO_3\text{-}NH_4$) viene analizzata mediante cromatografia ionica (IC o DIONEX). Si tratta di una tecnica analitica utilizzata per la determinazione dei principali costituenti sotto forma ionica all'interno di campioni acquosi.

Il metodo analitico si basa sullo scambio ionico tra una fase mobile costituita dall'eluente (campione) e una fase stazionaria, allo stato solido (resine a scambio ionico). Ogni campione richiede dai 30 ai 40 minuti per essere analizzato. Anche in questo caso è importante seguire accuratamente tutti i passaggi del protocollo e prestare attenzione alla quantità di campione da

utilizzare ed al fattore di diluizione applicato. Per preparare le soluzioni da utilizzare per la cromatografia ionica è necessario centrifugare il campione ad una velocità minima di 9600 RPM per 15 minuti a 4 °C e filtrarlo attraverso un filtro da 0,2 µm.

3.4.5 Sonde utilizzate

Temperatura, pH e PAR sono registrati grazie alle sonde disponibili presso il laboratorio (INRAE-LBE). Le sonde utilizzate per la raccolta dei dati in continuo sono collegate al *software* silex e calibrati attraverso sensori portatili di riferimento.

Oltre a sonde per la misurazione di PAR, pH e temperatura, è disponibile una sonda per la misurazione della conduttività (mS/cm) ed una per la misurazione della quantità di ossigeno presente nella coltura algale. Quest'ultima viene utilizzata per monitorare, durante il giorno, la variazione di O₂ (mg/l) all'interno delle vasche e la percentuale a saturazione. Durante la notte si ha naturalmente una diminuzione dell'ossigeno solubile e una produzione di CO₂ (Toro-Huertas *et al.*, 2019).

La sonda pH ci permette di sapere se è necessario correggere il pH per migliorare l'attività delle alghe. Il livello di pH è correlato alla quantità di carbonio inorganico presente nelle vasche.

La sonda della PAR stima la quantità di fotoni disponibili per la fotosintesi, ovvero la radiazione fotosinteticamente attiva. Le sonde disponibili al laboratorio ci forniscono valori della PAR in µA o mV.

4 Risultati e discussione

4.1 Fase 1: colture in fotobioreattori di laboratorio

Di seguito presenteremo i risultati principali relativi alla crescita delle microalghe in PBR di laboratorio. L'obiettivo resta quello di comparare il funzionamento di due fotobioreattori contenenti lo stesso volume di coltura algale. Attraverso lo *scale-up* eseguito, partendo dalle beute di 125 ml, vengono stabilite le condizioni ottimali per l'avvio delle colture nei reattori.

4.1.1 Terreno di coltura

Il medium *Zarrouk* è il medium ottimale per la crescita dell'*Arthrospira platensis*, tuttavia contiene una grande quantità di prodotti chimici che ne aumenta i costi di produzione (Delrue *et al.*, 2017).

Per ridurre i costi di produzione, il medium *Zarrouk* è stato testato a differenti diluizioni in beute da 125 ml (Figura 4.1).

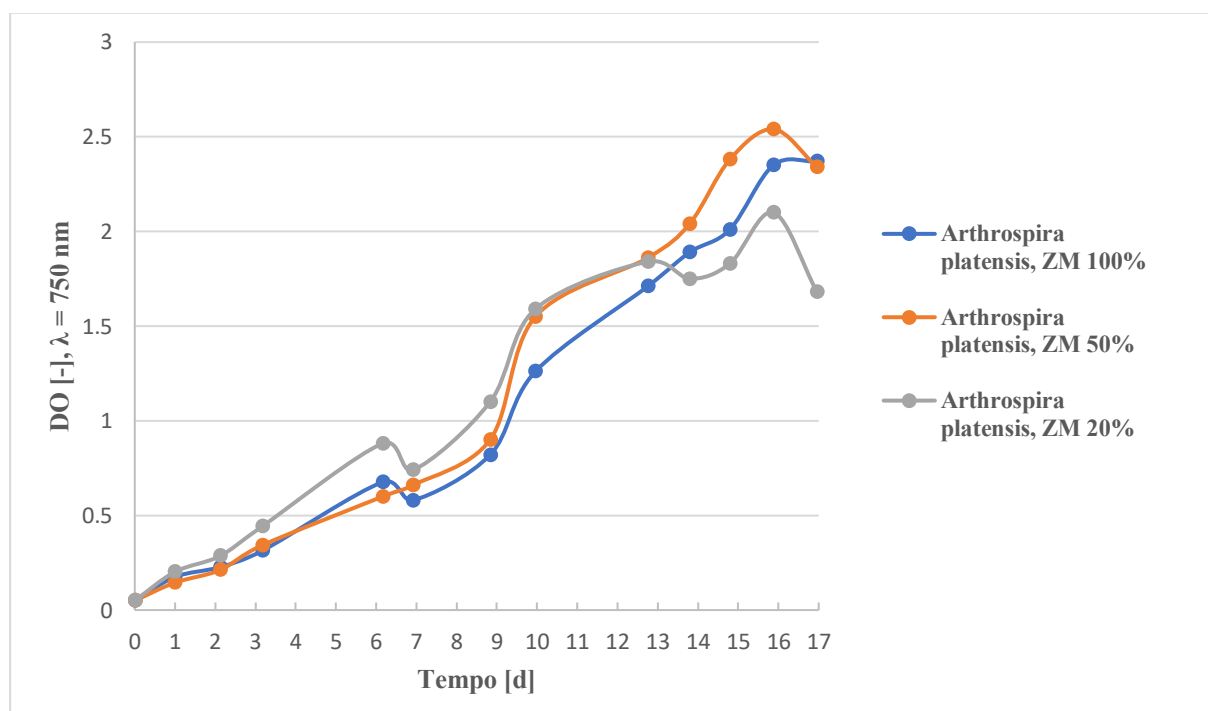


Figura 4.1: Curva di crescita DO-tempo, beute 125 ml

Le curve di densità ottica, misurata a $\lambda = 750$ nm, hanno un andamento simile. Prendendo in considerazione la fase esponenziale dal giorno 2 al giorno 13, si nota che il tasso di crescita dell'*Arthrospira platensis* coltivata con $ZM_{20\%}$ è pari a $0,149 \text{ d}^{-1}$.

Il dato è compreso tra $0,157 \text{ d}^{-1}$ e $0,136 \text{ d}^{-1}$, rispettivamente i tassi di crescita dell'*Arthrospira platensis* in soluzioni con $ZM_{50\%}$ e $ZM_{100\%}$. A partire dal 14° giorno di monitoraggio della coltura, la velocità di crescita della biomassa algale, in beute con medium $ZM_{20\%}$ diminuisce, questo fa pensare a lievi carenze di nutrienti con un medium troppo diluito. Un $ZM_{50\%}$ garantisce una maggiore stabilità della coltura (Figura 4.2).

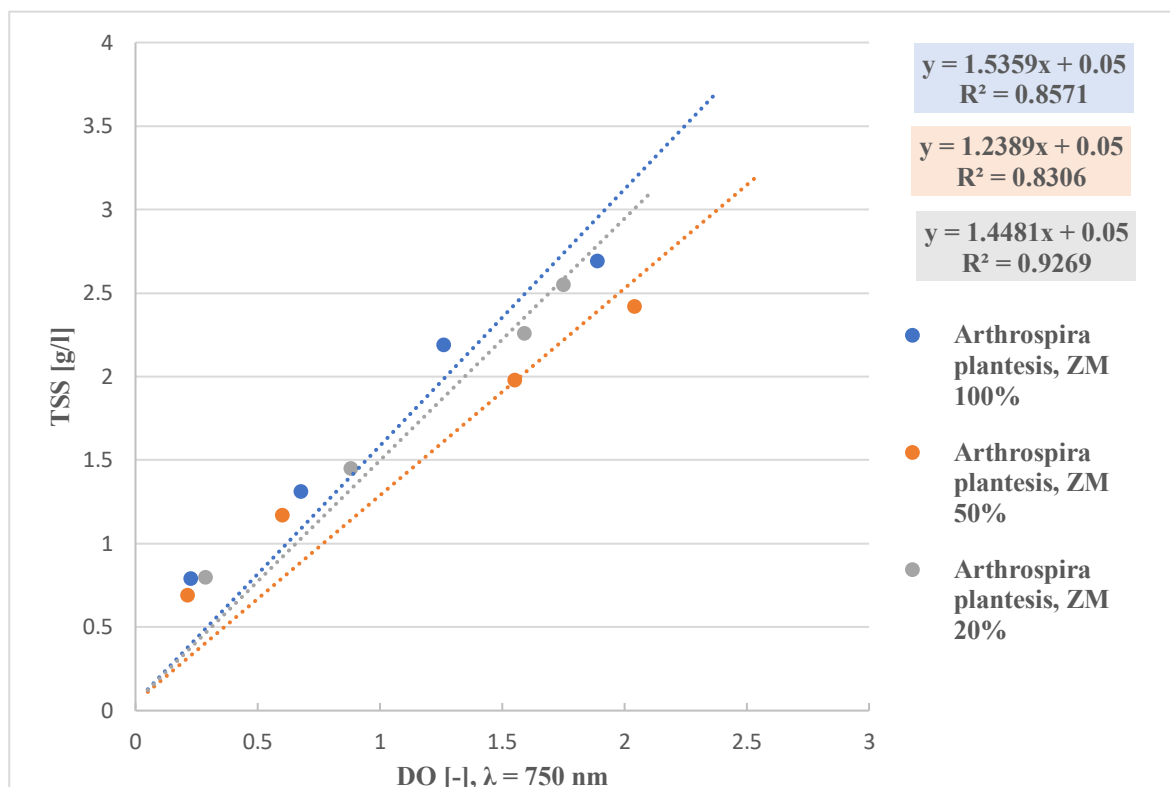


Figura 4.2: Correlazione tra TSS e DO, beute 125 ml

Dalle linee di correlazione TSS-DO, è possibile notare che la quantità di *Arthrospira plantesis* in g/l, presente nelle beute, aumenta linearmente con la densità ottica misurata. Comparando i valori di TSS, si nota come la biomassa algale cresce giornalmente seguendo quasi lo stesso andamento nelle condizioni $ZM_{20\%}$ e $ZM_{100\%}$, la pendenza della retta è invece minore con $ZM_{50\%}$.

Utilizzando volumi di coltura di 50 ml, non è stato possibile effettuare molte misurazioni in termini di TSS. Le ultime misure di TSS effettuate per la soluzione con $ZM_{50\%}$, sono probabilmente affette da errori sperimentali, a causa della presenza di precipitati di ferro sul fondo della beuta.

Nei PBR, si opera con volumi di coltura molto maggiori. La geometria del reattore tubolare, è diversa da quelle viste finora, di conseguenza, non sapendo come le alghe reagiscano ad una nuova condizione, si è preferito utilizzare $ZM_{50\%}$.

Il tasso di crescita della coltura algale ottenuto con $ZM_{50\%}$ ($0,157 \text{ d}^{-1}$) è più elevato rispetto a quello ottenuto con $ZM_{20\%}$ e $ZM_{100\%}$ (rispettivamente $0,149 \text{ d}^{-1}$ e $0,136 \text{ d}^{-1}$), si dimostra quindi che la quantità di nutrienti presenti in $ZM_{50\%}$ è senz'altro positiva per la crescita dell'*Arthrospira plantesis*. In particolare, bicarbonato di sodio e nitrati, contribuiscono ad un aumento dell'alcalinità del terreno di coltura e favoriscono le condizioni ottimali per la crescita dell'*Arthrospira plantesis*, riducendo la probabilità di una contaminazione biologica (Pulgarin *et al.*, 2020).

4.1.2 Inoculo

Dai risultati ottenuti dopo l'esperimento in beute da 125 ml, abbiamo deciso di preparare l'inoculo per i fotobioreattori con un medium $ZM_{20\%}$ ($F_d = 5$).

La decisione è stata per lo più legata ad un fattore economico: le microalghe nelle beute da 5 litri vengono utilizzate, per l'avvio delle colture in PBR, subito dopo aver raggiunto la fase esponenziale. Non risulta quindi necessario preoccuparsi della carenza di nutrienti che, in beute da 125 ml, si verifica a partire dal 14° giorno di coltura.

Il grafico (Figura 4.3) mostra la curva di crescita della biomassa algale, ottenuta attraverso la media aritmetica con deviazione standard, dei valori di DO misurati in 3 beute (A, B, C) da 5 l.

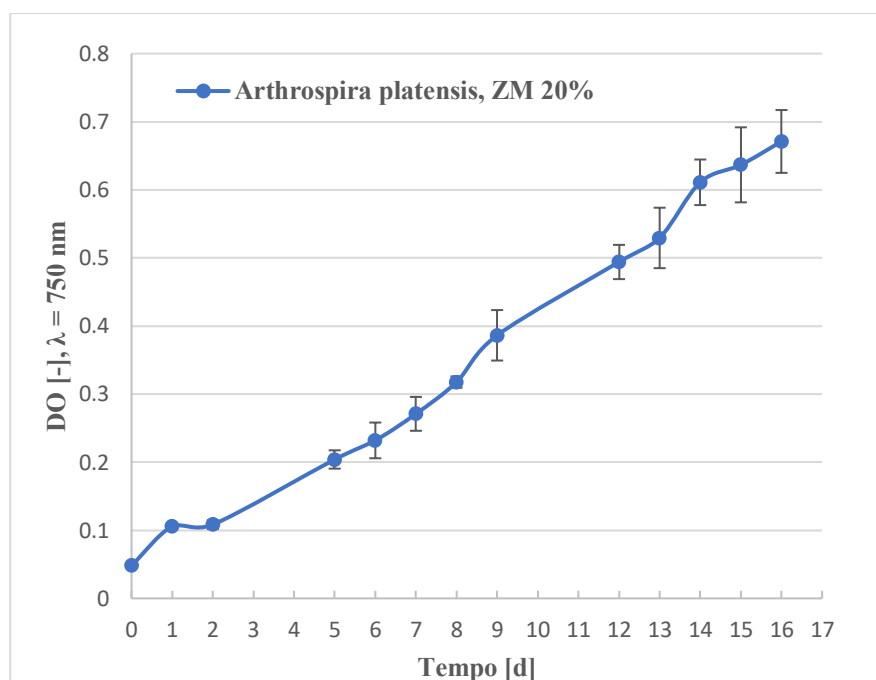


Figura 4.3: Curva di crescita DO-tempo, inoculo PBR

I valori di densità ottica misurati giornalmente sono in continuo aumento, la pendenza della curva non subisce variazioni improvvise. Tuttavia il tasso di crescita delle microalghe è pari a $0,042 \text{ d}^{-1}$, minore rispetto a quello registrato, con $ZM_{20\%}$, per le colture in beute da 125 ml ($0,149 \text{ d}^{-1}$).

Inoltre, dopo un periodo di 17 giorni, la concentrazione di biomassa algale prodotta (Figura 4.4) raggiunge gli $0,85 \text{ g/l}$ (TSS), valore inferiore a quello registrato per le colture in beute più piccole: $2,78 \text{ g/l}$ (TSS).

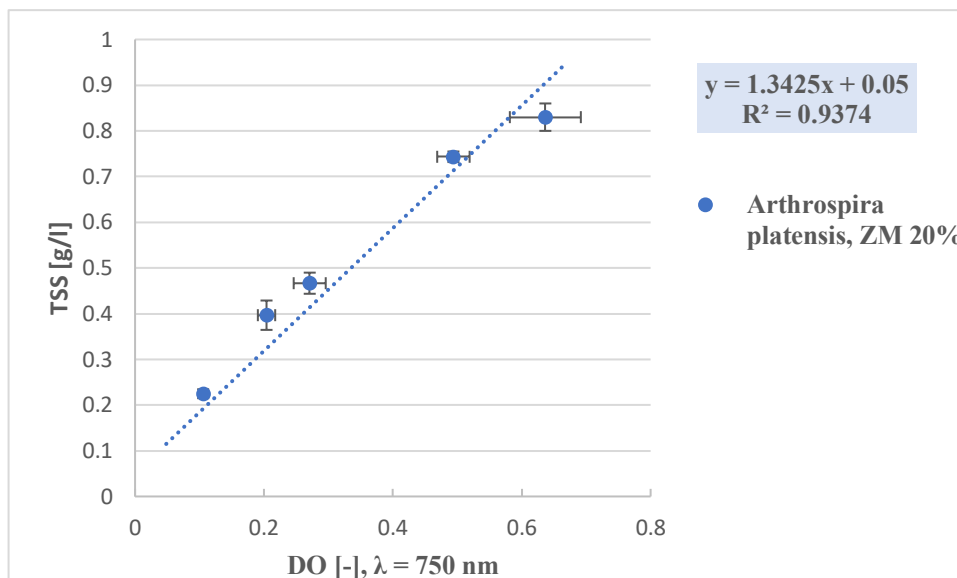


Figura 4.4: Correlazione tra TSS e DO, inoculo PBR

Dai risultati ottenuti possiamo dedurre che la produttività delle microalghe è collegata alle dimensioni del volume di coltura, ma soprattutto, alla quantità di fotoni che assorbono (G Usharani, Saranraj and Kanchana, 2012).

Nelle beute da 5 l sono contenuti rispettivamente 3,33 l di coltura algale (altezza del liquido: 10,8 cm). L'unica fonte luminosa a disposizione delle microalghe è una lampada (LED 35 W) posizionata sopra le beute. La luce penetra nella coltura algale solo fino ad una profondità di 8-9 cm, di conseguenza, solo grazie ad un sistema di miscelazione adeguato è possibile far sì che tutta la biomassa algale partecipi al processo di fotosintesi.

L'introduzione della tecnica dell'*air-sparging* ha portato a dei risultati positivi, l'insufflamento di bolle d'aria all'interno della coltura algale permette una movimentazione delle microalghe, questo evita la sedimentazione della biomassa e rende la coltura omogenea. Di conseguenza, tutte le microalghe presenti nella beuta partecipano al processo di fotosintesi, assorbendo le radiazioni luminose provenienti dalla lampada a LED e sintetizzano sostanze organiche.

Attraverso l'utilizzo del microscopio è stato possibile escludere la presenza di biomassa morta nella coltura (Figura 4.5) e misurare la lunghezza minima dell'*Arthrospira plantensis* (~312 µm) (Figura 4.6). La linea rossa presente nell'immagine a destra indica la lunghezza del filamento di *Arthrospira plantensis*.

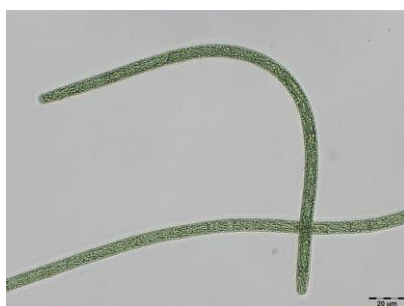


Figura 4.5: *Arthrospira plantensis* in beute (5 l)



Figura 4.6: Lunghezza minima dell'*Arthrospira plantensis*

In entrambi i PBR sono stati introdotti all'incirca 9,5 l di inoculo, al fine di ottenere una DO iniziale della coltura di 0,05.

4.1.3 Fotobioreattore tubolare

Per l'avvio della coltura nel fotobioreattore tubolare, è stato ritenuto opportuno utilizzare il medium $ZM_{50\%}$.

Le microalghe nel fotobioreattore tubolare (Figura 4.7) ricevono molta più luce rispetto alle beute da 5 l, di conseguenza crescono più velocemente ed hanno quindi bisogno di una quantità maggiore di nutrienti. Inoltre, con uno $ZM_{50\%}$ abbiamo più bicarbonato nel terreno di coltura, il che ci consente di avere una soluzione ad elevata alcalinità e, ridurre eventuali contaminazioni dell'*Arthrospira plantensis* con altri tipi di microalghe e batteri.

Dopo circa tre giorni dall'avvio della coltura, è possibile notare una rilevante presenza di biofilm sulle pareti del reattore (Figura 4.8). È inoltre evidente la formazione di aggregati di biomassa algale che fluttuano nella soluzione e poi sedimentano sul fondo dei tubi. Si ha un cambiamento di colore della coltura nell'arco di 10 giorni. Durante la fase di declino, le microalghe assumono una colorazione giallastra (Figura 4.9) a causa dell'aumento della quantità di biomassa morta e quindi, della diminuzione di pigmenti fotosintetici in grado di assorbire le radiazioni luminose.



Figura 4.7: *Arthrospira plantensis* giorno 1



Figura 4.8: *Arthrospira plantensis* giorno 4

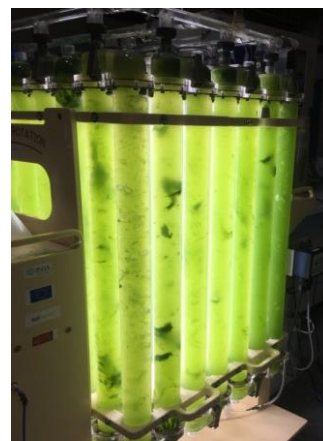


Figura 4.9: *Arthrospira plantensis* giorno 7

La temperatura nel PBR è maggiore di 25 °C ed il pH assume valori compresi tra 9-11. Il tasso di crescita esponenziale dell'*Arthrospira plantensis* è molto elevato, pari a 0,42 d⁻¹, maggiore di quello ottenuto con $ZM_{50\%}$ per colture in beute da 125 ml (0,157 d⁻¹)

Nella curva di crescita (Figura 4.10) non è presente la fase stazionaria, il ciclo vitale della microalga è molto breve, così come la sua fase esponenziale. Questo è fortemente condizionato dall'inefficienza del sistema di agitazione.

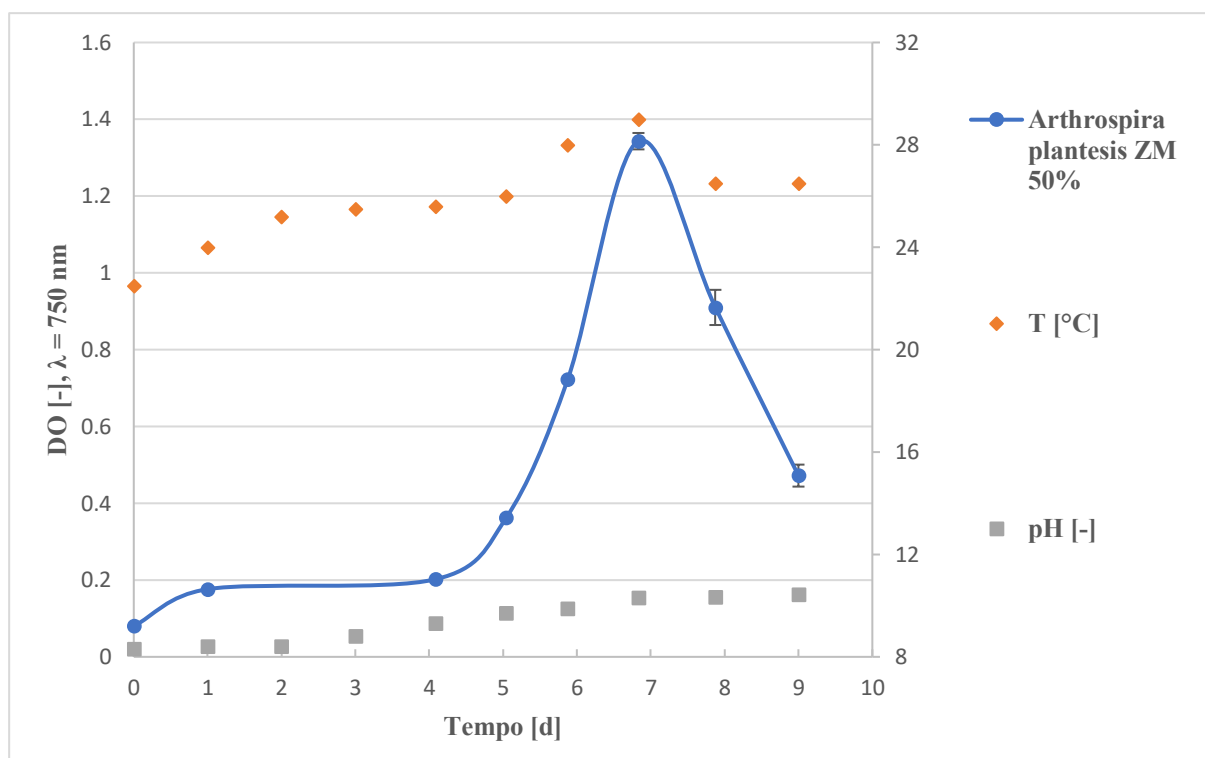


Figura 4.10: Curva di crescita DO-tempo, PBR_{tubolare} 120 l

Le sei portate d'aria entranti nel reattore non consentono una perfetta miscelazione della coltura. Le bolle d'aria impediscono la formazione di biofilm e la sedimentazione della biomassa solo lungo i sei tubi direttamente connessi alla portata entrante. Con flussi d'aria di 5 l/min aumenta la dimensione delle bolle disperse nella soluzione ma ciò non è sufficiente ad eliminare il fenomeno della sedimentazione delle microalghe. Inoltre, la presenza di bolle d'aria di diametro $\geq 1,5$ cm danneggia la forma elicoidale dell'*Arthrospira plantensis* (Susanna *et al.*, 2019), ciò è stato osservato variando i flussi d'aria entranti nel reattore.

Testando il sistema di miscelazione, introducendo un colorante nel reattore, è possibile verificare che dopo alcuni minuti, il liquido tende a distribuirsi uniformemente nel PBR. Di conseguenza, si ottiene una perfetta miscelazione dei fluidi all'interno del reattore ma non delle microalghe. Questo perché la biomassa algale ha un peso non trascurabile e, a differenza del colorante introdotto nel reattore, tende a sedimentare, soprattutto dopo la fase di crescita esponenziale.

Le lampade fluorescenti del PBR emanano radiazioni luminose di $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, valore ottimale per favorire la crescita dell'*Arthrospira plantensis* (Carvalho *et al.*, 2011). Misurando i valori della PAR tra i tubi del PBR (Figura 4.11) si può capire qual è effettivamente la quantità di fotoni che raggiunge le microalghe in ogni punto del reattore. Possiamo notare che la distribuzione della luce non è uniforme. I punti più illuminati del reattore sono le posizioni: 1,5 - 3,5 - 5,5 - 7,5. Esse indicano le misure della PAR a metà dell'altezza dei tubi del fotobioreattore.

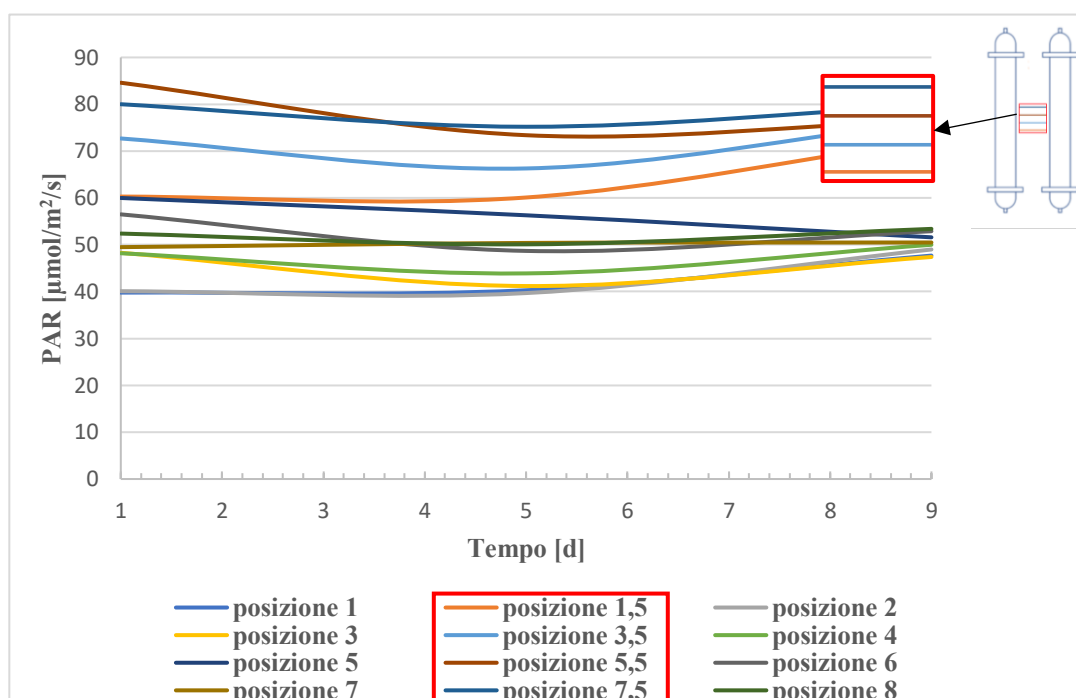


Figura 4.11: Misure della PAR tra i tubi del PBR_{tubolare}

Sono stati inoltre misurati i valori della PAR sui tubi del PBR (Figura 4.12). Questo ci ha permesso di confermare che, la luce che le microalghe effettivamente ricevono, è fortemente condizionata dalla quantità di biofilm presente sui tubi. Più precisamente, all'aumentare della quantità di biofilm diminuisce la quantità di fotoni disponibili alla crescita delle microalghe.

Misurando la PAR in tutte le posizioni del PBR, notiamo che la luce che arriva sul reattore varia tra 35 e 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

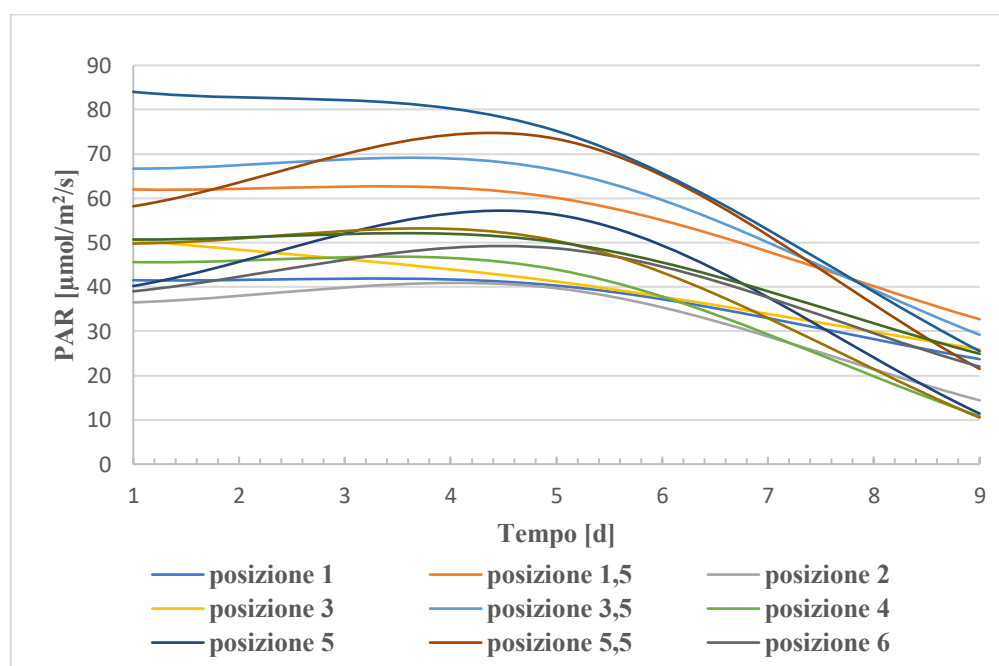


Figura 4.12: Misure della PAR sui tubi del PBR_{tubolare}

La luce mal distribuita favorisce la formazione di aggregati di biomassa nella coltura e, di conseguenza, la sua sedimentazione sul fondo del reattore. Influenza inoltre negativamente il tasso di crescita delle microalghe ed il processo di fotosintesi.

La concentrazione di biomassa algale misurata al picco della fase esponenziale, ovvero all'ottavo giorno di coltura, è pari a 1,17 g/l (Figura 4.13). I valori di TSS sono stati ottenuti prelevando dal reattore dei campioni omogenei di biomassa algale (lo stesso vale per quelli di DO). Gli aggregati formatisi sono stati eliminati dai campioni prelevati, in quanto avrebbero contribuito a rendere ancora più imprecisa la curva di correlazione TSS-DO.

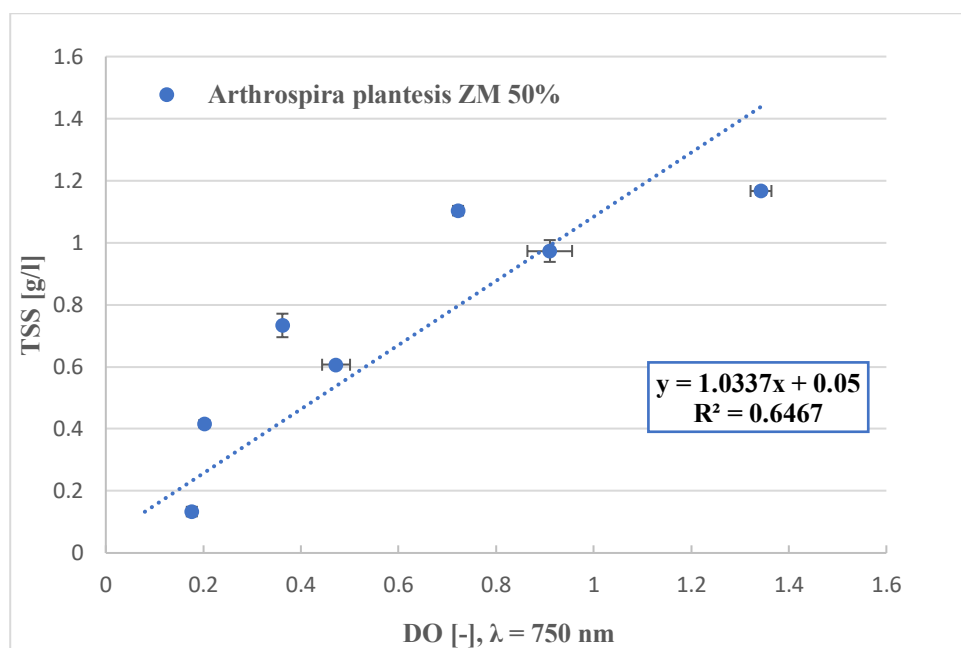


Figura 4.13: Correlazione tra TSS e DO, PBR_{tubolare} 120 l

Si stima (grazie all'analisi microscopica e al tasso di crescita esponenziale dell'*Arthrospira plantensis* nel PBR, definito a pagina 41) che la quantità di biomassa prodotta in un fotobioreattore tubolare, è di gran lunga superiore rispetto a quella ottenuta con beute di laboratorio (G Usharani, Saranraj and Kanchana, 2012).

Tuttavia, la notevole velocità delle microalghe di cambiare le loro condizioni vitali e i problemi di miscelazione riscontrati, ci portano ad escludere un eventuale possibilità dell'utilizzo di fotobioreattori tubolari per colture in scala industriale. Essendo la durata del *batch* di coltura limitata a soli 7-10 giorni, le spese di gestione, manutenzione e sterilizzazione del reattore dopo ogni batch, sarebbero eccessive.

In un PBR chiuso si ha però sempre la possibilità di coltivare microalghe senza avere contaminazioni di alcun genere. La soluzione algale e gli aggregati vengono analizzati giornalmente al microscopio. Dalle foto microscopiche (Figure 4.14, 4.15, 4.16) si distinguono lunghi filamenti elicoidali di *Arthrospira plantensis*, non sono presenti batteri e rotiferi (anche grazie agli elevati valori di pH).

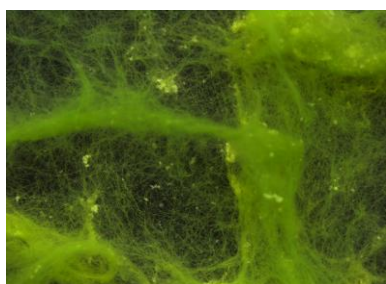


Figura 4.14: *Arthrospira plantesis* in PBR_{tubolare}

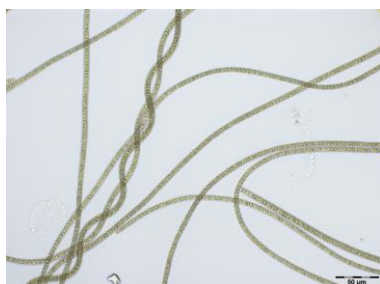


Figura 4.15: Filamenti di *Arthrospira plantesis* in PBR_{tubolare}

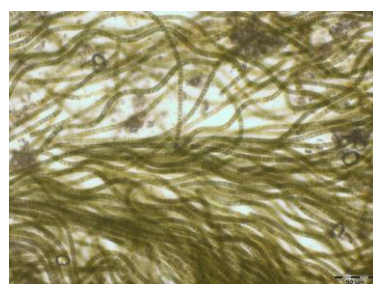


Figura 4.16: Aggregato di *Arthrospira plantesis* in PBR_{tubolare}

4.1.4 Fotobioreattore aperto

I risultati ottenuti con la coltura della biomassa nel PBR tubolare vengono comparati ai dati ottenuti in un sistema più semplice e meno costoso, quello dei fotobioreattori aperti.

Le colture di *Arthrospira plantesis*, avviate nella vasca circolare, ci hanno permesso di studiare in maniera più approfondita il comportamento della biomassa e la sua capacità di adattamento all'ambiente di coltura.

Analizzando la curva di crescita dell'*Arthrospira plantesis* (Figura 4.17) si nota come la biomassa riesca a sopravvivere per un periodo pari a 38 giorni. Le microalghe si adattano al terreno di coltura e al tipo di miscelazione (*air-lift*). La velocità con cui le bolle d'aria vengono inviate nella vasca è compresa tra 1-2 l/min, questo valore dipende dal diametro delle bolle ($\leq 1,5$ cm)

Il tasso di crescita esponenziale è pari a $0,03 \text{ d}^{-1}$, valore di gran lunga inferiore a quello ricavato nel PBR tubolare ($0,42 \text{ d}^{-1}$).

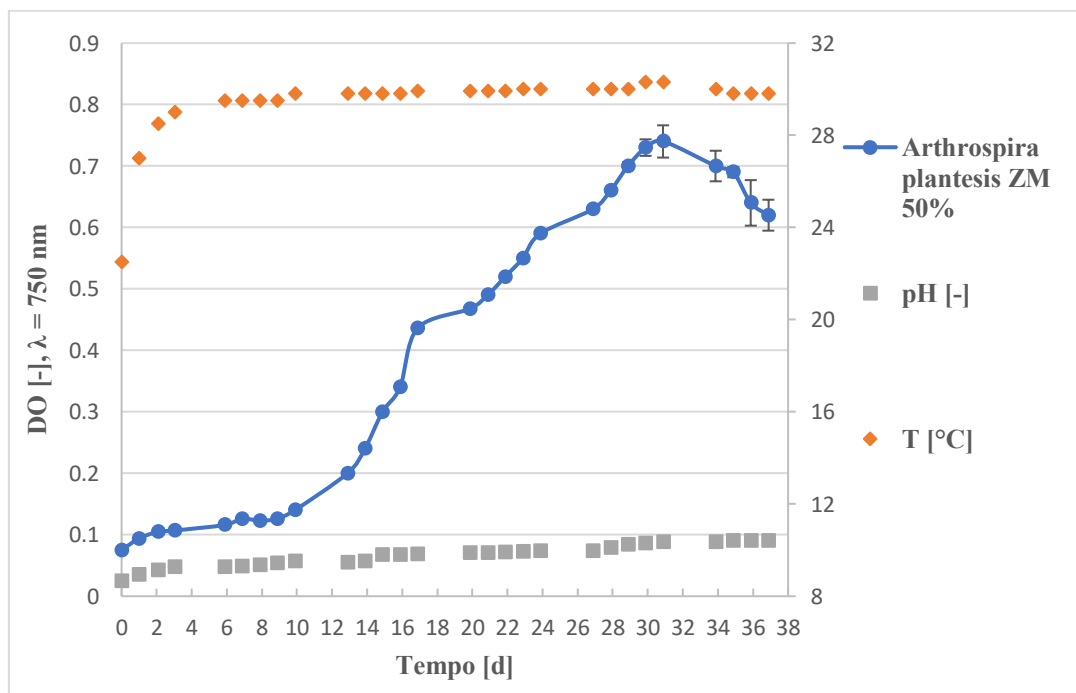


Figura 4.17: Curva di crescita DO-tempo, PBR_{aperto} 120 l

La durata della fase esponenziale è 2 volte superiore a quella della fase di adattamento. Durante il *batch* di coltura, non si ha formazione di aggregati o sedimentazione di microalghe sul fondo del reattore.

Il sistema di miscelazione utilizzato non è causa di stress per la biomassa, in quanto la quantità di biomassa morta nella vasca è pressoché nulla e i filamenti di *Arthrospira plantesis*, osservati al microscopio, mantengono la loro forma elicoidale. Tuttavia il problema riscontrato nelle beute da 5 l, ovvero la mancanza di luce al di sotto degli 8 cm, è anche qui non trascurabile. È questa la causa della lenta velocità di crescita.

Non tutte le microalghe assorbono la stessa quantità di fotoni in un determinato istante. La perfetta miscelazione evita la morte della biomassa e ne favorisce la crescita, ma per aumentare la produttività è necessario far sì che tutte le microalghe entrino in contatto con una quantità di luce maggiore (Sivakaminathan *et al.*, 2020).

Si ritiene opportuno mantenere la vasca ad una temperatura di $\sim 29\text{ }^{\circ}\text{C}$; temperatura alla quale viene ottenuta nel PBR tubolare la massima concentrazione di biomassa algale. I valori di pH registrati giornalmente sono compresi tra 9-11.

La stessa quantità di biomassa prodotta in un PBR tubolare in otto giorni (1,17 g/l), è stata misurata nel fotobioreattore aperto (Figura 4.18) dopo 31 giorni dall'avvio della coltura (1,2 g/l). Questo ci permette di concludere che si ottengono gli stessi livelli di concentrazione di biomassa (TSS) in tutti e due i reattori, anche se, con tassi di crescita nettamente diversi.

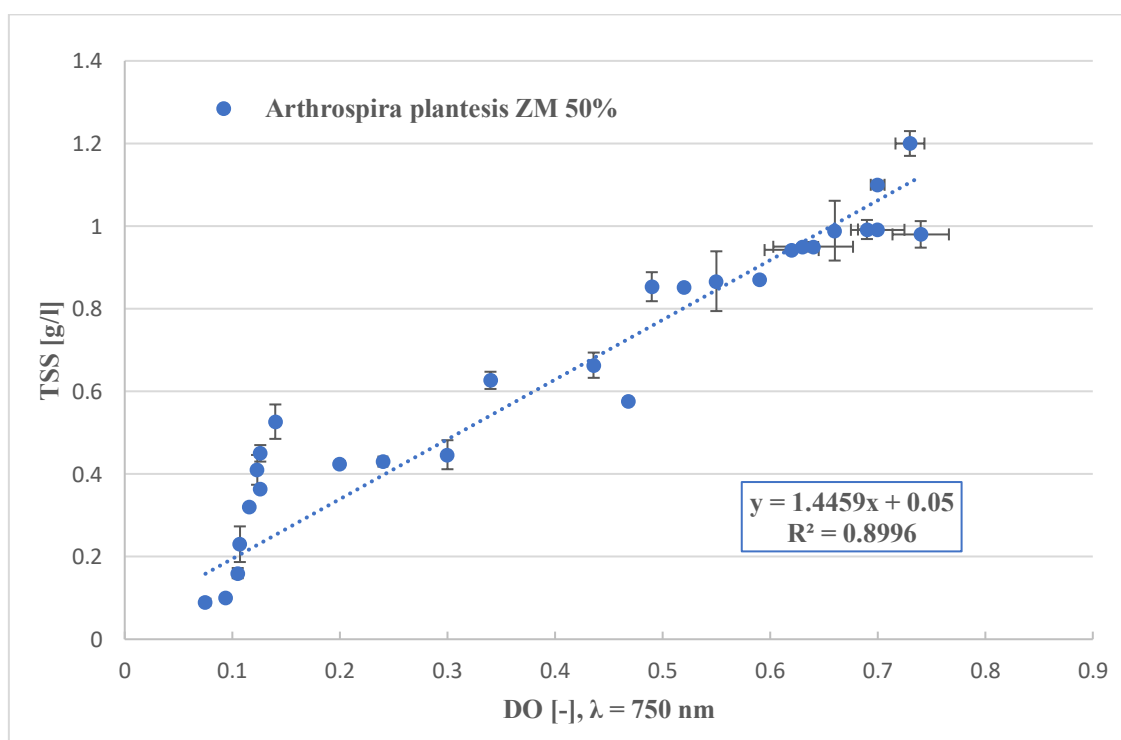


Figura 4.18: Correlazione tra TSS e DO, PBR_{aperto} 120 l

Analizzando i vantaggi e gli svantaggi dei due tipi di reattori studiati (costi, efficienza, facilità d'installazione) si conclude che, per una crescita ottimale delle microalghe, che eviti la formazione di aggregati, è preferibile un PBR aperto.

Bisogna tuttavia fare molta attenzione alla presenza di contaminazioni nella coltura. Osservando *l'Arthrospira plantensis* al microscopio (Figure 4.19, 4.20, 4.21) è possibile escludere la presenza di altre specie microalgali nella coltura. Si nota come la microalga ha una colorazione verde chiaro nella fase di avvio del *batch* di coltura, e tende al verde scuro al trentesimo giorno di vita.



Figura 4.19: *Arthrospira plantensis*, giorno 3



Figura 4.20: *Arthrospira plantensis*, giorno 15



Figura 4.21: *Arthrospira plantensis*, giorno 30

L'intensità del verde è strettamente correlata al contenuto di clorofilla presente nella biomassa, maggiore nella fase esponenziale della coltura, e quindi al trentesimo giorno di vita della microalga. La fase di morte della biomassa inizia a partire dal trentaduesimo giorno, questo significa che la vita di una microalga, nelle giuste condizioni di luce e temperatura è almeno di 31 giorni, in reattori da 120 l.

4.2 Fase 2: colture in fotobioreattori industriali

Se si vuole aumentare la produttività della biomassa algale in fotobioreattori aperti, di dimensioni maggiori a quelli trattati finora, è necessario migliorare sia il sistema di illuminazione utilizzato che il sistema di miscelazione.

Per l'avvio delle colture algali in fotobioreattori industriali risulta essenziale un'ulteriore validazione del terreno di coltura.

4.2.1 Validazione del terreno di coltura

L'esperimento in micropiastre ci permette di confermare l'efficacia di *BBM_{modificato}* e *ZM_{modificato}* per diversi tipi di microalghe, al variare della quantità di bicarbonato introdotta nel medium di coltura.

Il bicarbonato di sodio, potenziale fonte di carbonio inorganico, è l'ingrediente principale dei media utilizzati nel lavoro sperimentale. Contribuisce all'aumento della produzione di luteina, lipidi e acidi grassi, durante la coltivazione di microalghe su larga scala (Sampathkumar and Gothandam, 2019).

Esso è particolarmente vantaggioso nelle colture in fotobioreattori industriali dove vi è una limitazione nella fornitura di CO₂. Ha inoltre una maggiore solubilità rispetto all'anidride carbonica gassosa e riduce il problema associato al tempo di ritenzione del carbonio nel terreno di coltura. Possiamo definire il tempo di ritenzione, come il tempo che il carbonio trascorre nella fase mobile, ovvero, nel terreno di coltura (Bushra, 2018).

Essendo la volatilità della CO_2 maggiore rispetto a quella dell' NaHCO_3 , il suo tempo di ritenzione nel medium è minore e, di conseguenza, le microalghe hanno meno tempo a disposizione per nutrirsi del carbonio inorganico disciolto. Risulta inoltre più facile, ed economicamente vantaggioso, introdurre bicarbonato di sodio nel terreno di coltura; l'insufflamento dell'anidride carbonica implica l'acquisto di bombole e di un riduttore di pressione al fine di ottenere una CO_2 gassosa.

I primi due esperimenti in micropiastre (Figure 4.22, 4.23) mostrano il comportamento delle microalghe al variare della concentrazione di bicarbonato, tra 0 e 40 mmol/l.

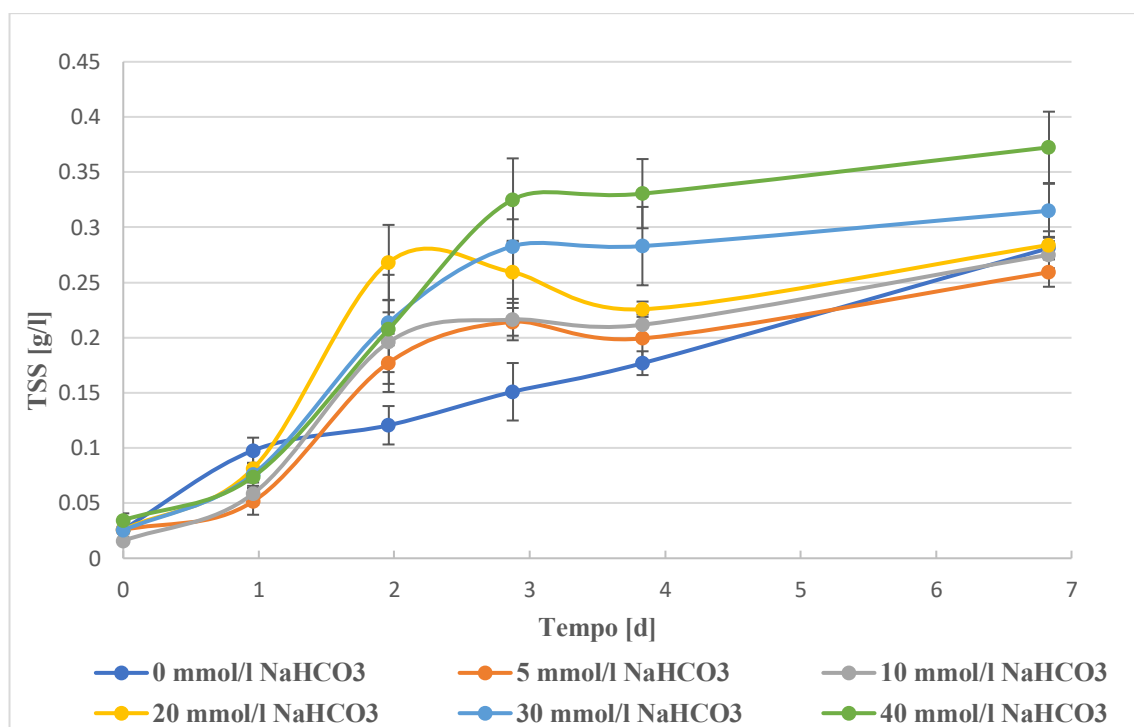


Figura 4.22: Curve di crescita TSS-tempo, micropiastre (ZM)

I valori di DO e TSS sono stati registrati per 8 giorni, le microalghe in $\text{BBM}_{\text{modificato}}$ e $\text{ZM}_{\text{modificato}}$ crescono alle stesse condizioni di luce e temperatura, l'unica differenza nelle due micropiastre è il tipo di medium utilizzato. Le curve di crescita (TSS-tempo) mostrano qual è l'effetto dell' NaHCO_3 sulla coltura algale.

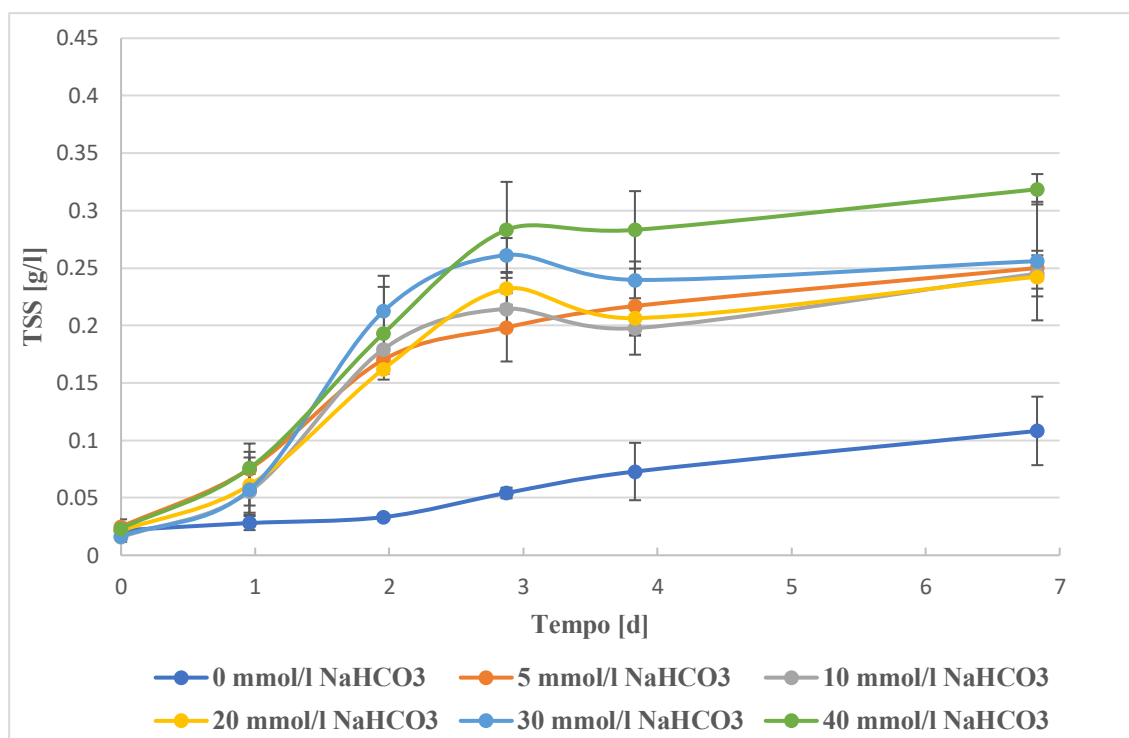


Figura 4.23: Curve di crescita TSS-tempo, micropiastre (*BBM*)

In entrambi i grafici è possibile osservare che la pendenza della fase esponenziale aumenta in funzione della concentrazione di bicarbonato. In particolare con 40 mmol/l di NaHCO_3 , abbiamo una maggiore quantità di biomassa. Si nota inoltre una leggera inflessione delle curve al terzo giorno di coltura. Questo potrebbe essere attribuito ad una diminuzione della velocità di crescita.

Per avere un'ulteriore conferma della quantità di bicarbonato da inserire nel terreno di coltura sono stati eseguiti altri due esperimenti in micropiastre. Sono state avviate due nuove colture, rispettivamente con medium *BBM* e *ZM*; in questo caso le concentrazioni di NaHCO_3 variano tra 30 mmol/l e 80 mmol/l (Figure 4.24, 4.25).

Monitorando il comportamento della biomassa algale per 8 giorni, si osserva che il miglior risultato in termini di TSS si ottiene, anche in questo caso, per colture con una quantità di bicarbonato pari a 40 mmol/l; concentrazioni superiori inibiscono fortemente la crescita della biomassa.

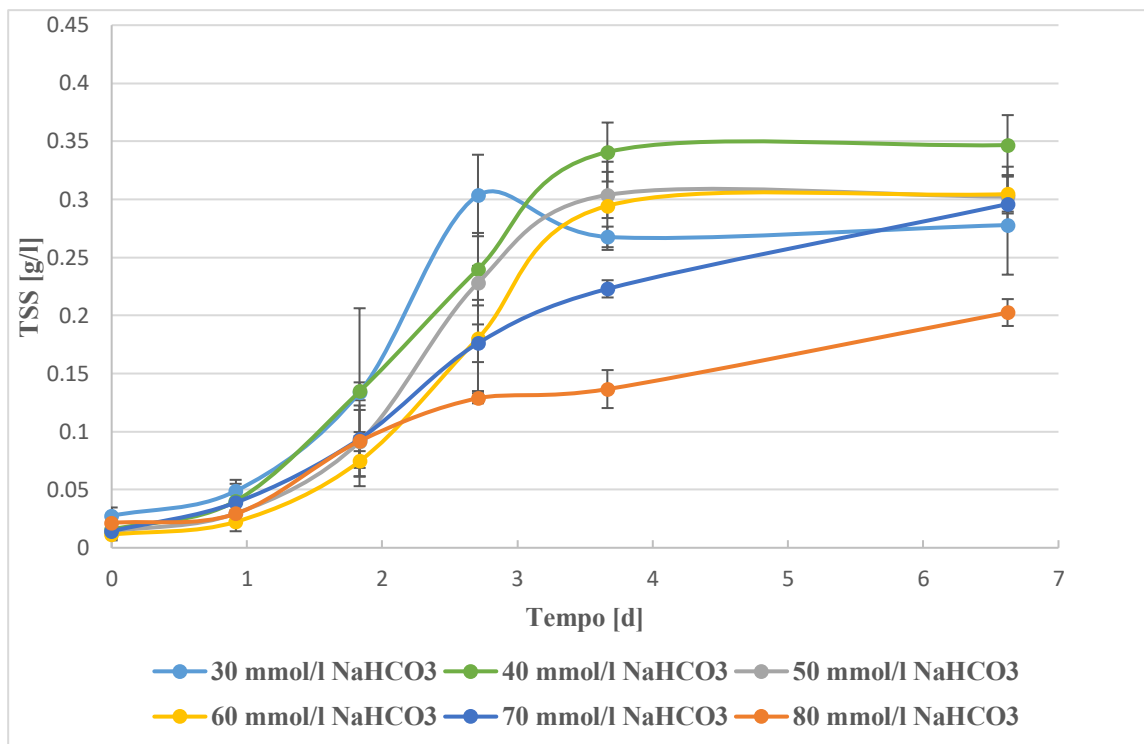


Figura 4.24: Curve di crescita TSS-tempo, micropiastre (ZM)

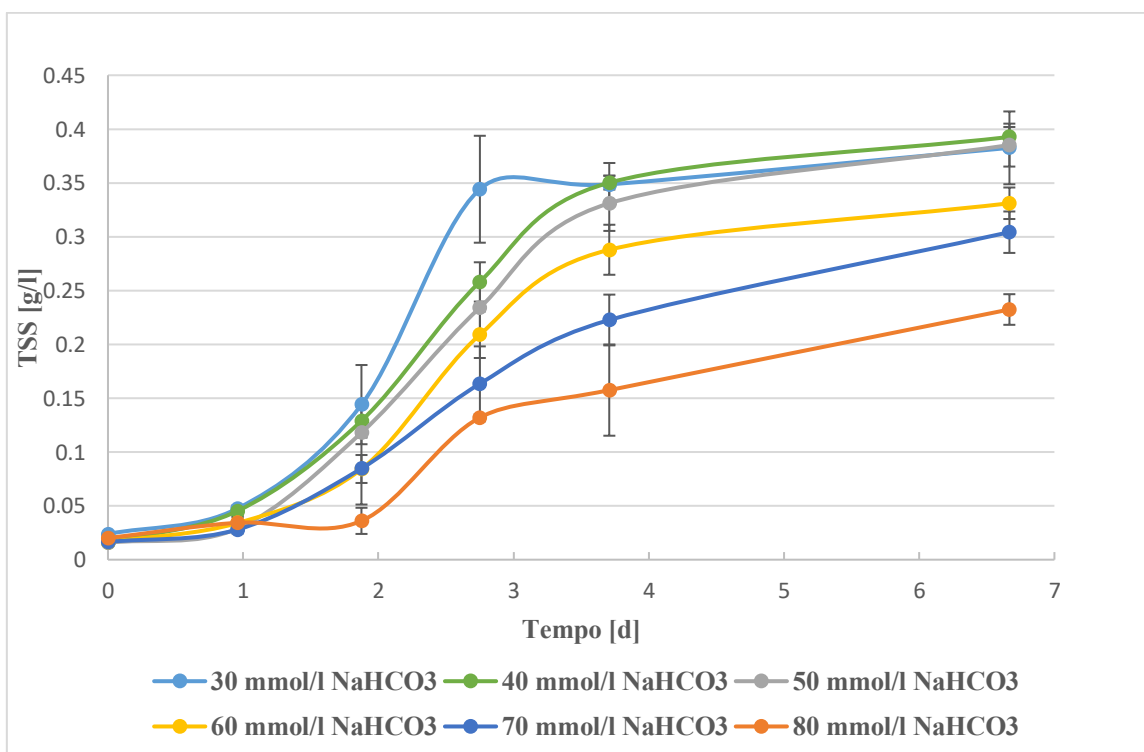


Figura 4.25: Curve di crescita TSS-tempo, micropiastre (BBM)

È interessante osservare uno *shift* da una cinetica esponenziale ad una lineare (fase stazionaria), dunque da un metabolismo di accrescimento ad uno di mantenimento. Questo succede al giorno due per le colture con basse concentrazioni di bicarbonato, ed al giorno 3 per

le altre. Tale fenomeno è senz'altro correlato ad una carenza di nutrienti, fattore limitante per la crescita della biomassa.

Le curve di crescita potrebbero inoltre essere influenzate dall'accumulo di metaboliti tossici che contaminano la coltura e rallentano il tasso di crescita delle microalghe. L'evaporazione giornaliera di H₂O non influenza particolarmente la crescita della biomassa, contribuisce ad un aumento del pH, che risulta tuttavia < 11, valore limite per il tipo di microalghe trattate (Lorenzo-Hernando *et al.*, 2019).

Le curve di crescita ottenute con medium *BBM* sono leggermente più lineari di quelle ottenute con medium *ZM*. La quantità di biomassa ottenuta in colture contenenti 40 mmol/l di bicarbonato è pari a ~ 0,36 g/l, maggiore rispetto agli altri casi analizzati. Questo è confermato sia con medium *BBM* che con medium *ZM*.

Ad esempio, possiamo osservare che, con *ZM*_{30 mmol/l NaHCO₃} si misura una quantità di biomassa pari a 0,3 g/l, con *BBM*_{30 mmol/l NaHCO₃} il valore registrato è pari a 0,32 g/l; le concentrazioni sono, in entrambi i casi, inferiori a 0,36 g/l.

Il tasso di crescita esponenziale calcolato per tutte le curve ottenute (Tabelle 4.1, 4.2) ci conferma che una concentrazione di bicarbonato compreso tra 30 e 40 mmol/l determina un aumento della velocità di crescita delle microalghe.

Tabella 4.3: Tasso di crescita esponenziale *BBM* e *ZM* (micropiastre)

NaHCO ₃	Tasso di crescita esponenziale <i>BBM</i>		Tasso di crescita esponenziale <i>ZM</i>	
mmol/l	μ _{max}	stdev	μ _{max}	stdev
0	0,5341	0,0749	0,6289	0,1933
5	0,9958	0,1403	1,2384	0,3765
10	1,2491	0,1311	1,1863	0,1683
20	1,1796	0,0864	1,2967	0,1610
30	1,3159	0,1734	1,1289	0,0446
40	1,2610	0,2901	1,0408	0,0725

Tabella 4.4: Tasso di crescita esponenziale *BBM* e *ZM* (micropiastre)

NaHCO ₃	Tasso di crescita esponenziale <i>BBM</i>		Tasso di crescita esponenziale <i>ZM</i>	
mmol/l	μ _{max}	stdev	μ _{max}	stdev
30	1,3338	0,2117	1,3215	0,1319
40	1,1875	0,1824	1,2474	0,4317
50	1,1682	0,0474	1,1241	0,0526
60	1,0997	0,0008	1,1795	0,1452
70	0,9677	0,1175	1,0264	0,2260
80	0,7599	0,1135	0,8264	0,0255

Il tasso di crescita della biomassa nella sua fase esponenziale è più alto con una quantità di NaHCO_3 di 30 mmol/l. Tuttavia, dopo 8 giorni, la quantità di biomassa prodotta con 30 mmol/l di bicarbonato è inferiore a quella prodotta con 40 mmol/l.

Monitorando il pH iniziale e finale all'interno delle micropiastre (Appendice 7), possiamo vedere come i valori iniziali oscillano tra 7,5-8,5 e poi aumentano gradualmente. Qualunque sia la quantità di bicarbonato introdotta, il pH si stabilizza tra 10,5-10,8. Questo valore non influisce negativamente sulla coltura e sul suo tasso di crescita.

Attraverso la misura del pH iniziale, è possibile verificare la correttezza del medium. Sono stati condotti studi con medium *BBM*, variando il pH da $6,0 \pm 0,2$ a $9,0 \pm 0,2$. Il tasso massimo di produzione di idrogeno è stato misurato a pH $8,0 \pm 0,2$, mentre il tasso minimo di produzione di idrogeno è stato registrato a pH $6,0 \pm 0,2$ (Vulgaris, 2014). Questo ci permette di concludere che il valore di pH iniziale, ottimale, per colture con medium *BBM* è $8,0 \pm 0,2$.

Risultati simili si ottengono per colture con medium *ZM*, dove i valori di pH iniziali, ottimali, che influenzano positivamente la solubilità e la biodisponibilità dei nutrienti, l'attività enzimatica e il trasporto di elettroni per la fotosintesi e la respirazione, sono compresi tra 6,8 e 9,1 (Michele *et al.*, 2015).

I valori di pH condizionano fortemente lo sviluppo di un determinato ceppo algale rispetto ad un altro, ed influenzano il percorso metabolico di una coltura pura.

In conclusione, analizzando tutti i risultati ottenuti, è stato deciso di effettuare con medium *BBM*, i *batch* di coltura nei reattori industriali. La scelta dipende anche dalla quantità di composti chimici da utilizzare (maggiore per *ZM*) e dai costi legati alla preparazione del terreno di coltura.

4.2.2 Inoculo

Il primo inoculo preparato, durante la fase di crescita esponenziale, ha una DO_{750} di 0,35, una DO_{680} di 0,426 ed un peso secco di 0,43 g/l. Il secondo ha una DO_{750} di 0,336, una DO_{680} di 0,432 ed un peso secco di 0,59 g/l.

Di conseguenza, nell'inoculo utilizzato per l'avvio della seconda campagna di misure in reattori industriali, è presente una quantità maggiore di biomassa algale. Questo è sicuramente condizionato dal tipo di miscelazione utilizzata. La sostituzione, per la preparazione del secondo inoculo, delle pompe ad immersione con una pompa di ricircolo, migliora l'agitazione della coltura e contribuisce ad una crescita maggiore della biomassa algale. Grazie al ricircolo della biomassa è possibile filtrare eventuali corpi estranei presenti nella coltura.

Le immagini ottenute al microscopio (Figure 4.26, 4.27, 4.28) ci mostrano le microalghe presenti nell'inoculo (*Desmodesmus*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Chlamydomonas* e *Pediastrum*) e confermano la presenza di amebe e rotiferi (in piccole quantità).



Figura 4.26: *Desmodesmus*, *Scenedesmus* (inoculo)

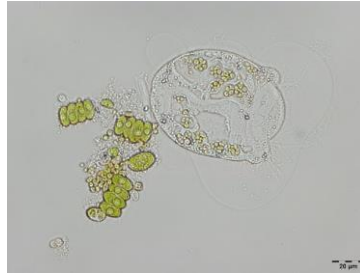


Figura 4.27: Ameba e *Desmodesmus* (inoculo)

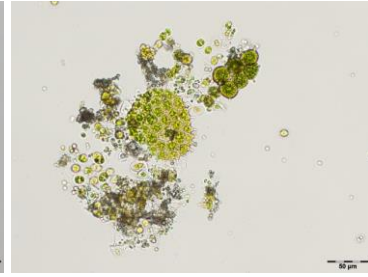


Figura 4.28: *Chlorella*, *Chlamydomonas* e *Pediastrum* (inoculo)

4.2.3 Prototipo di riferimento

Misurando la radiazione fotosinteticamente attiva nel prototipo di riferimento, è stato possibile ottenere dei grafici in funzione della profondità della vasca e della distanza del captore PAR dal Nénuphar. Abbiamo quindi quantificato la luce entrante nella vasca grazie al contributo della tecnologia Nénuphar.

Le radiazioni luminose penetrano all'interno di una generica coltura algale. In particolare se la radiazione fotosinteticamente attiva assume, all'interfaccia aria/coltura, valori compresi tra 1400 e $1600 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, la PAR misurata oltre gli $8\text{-}10$ cm di profondità sarà inferiore a $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, sicuramente nulla oltre i 15 cm.

Le misure di PAR eseguite nel prototipo di riferimento, oltre i 15 cm di profondità, ci mostrano in che modo è possibile aumentare la luce all'interno di una coltura.

I grafici (Figure 4.29, 4.30) denotano la quantità di fotoni in $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ che viene rifratta attraverso la manica del Nénuphar. Le misure vengono eseguite con un captore PAR posto ad 1 cm di distanza dal Nénuphar, i valori registrati nel primo grafico dipendono dalla luce naturale, quelli del secondo da una fonte luminosa artificiale (LED).

Attraverso i test eseguiti, con maniche di diverso spessore e materiale, si nota che, a circa 35 centimetri di profondità, le microalghe ricevono una quantità di luce non trascurabile che va via via diminuendo con l'aumentare della profondità.

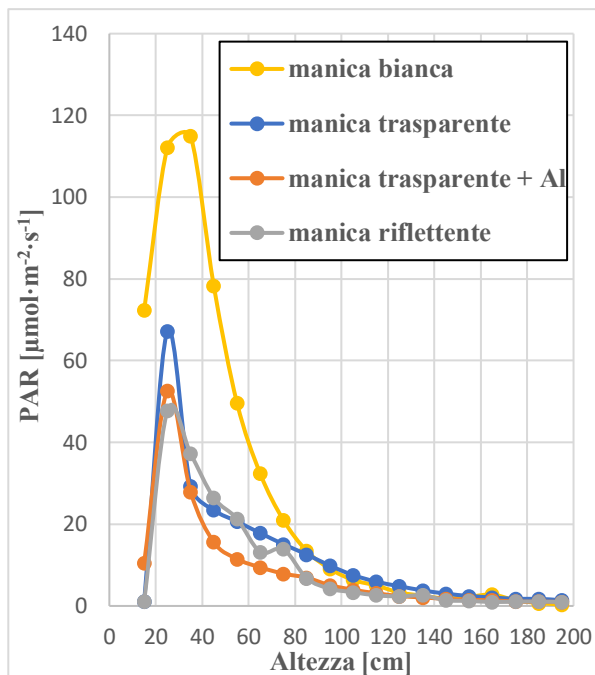


Figura 4.29: Curve PAR_{int} -altezza, $X = 1$ cm, fonte luminosa: sole

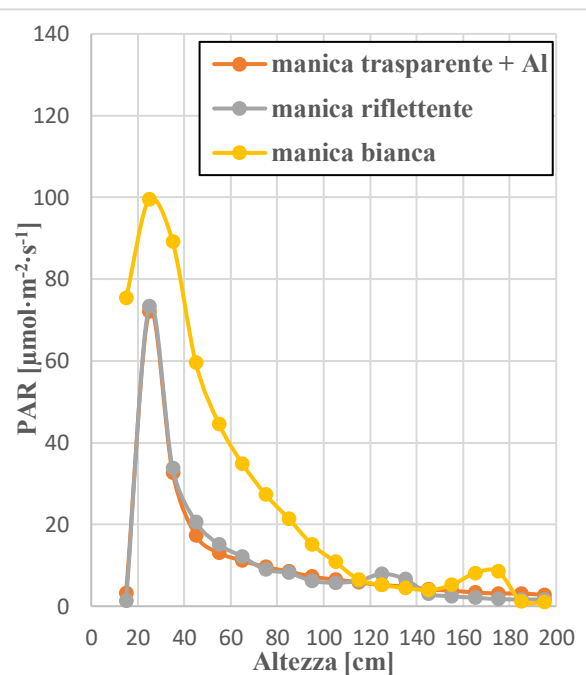


Figura 4.30: Curve PAR_{int} -altezza, $X = 1$ cm, fonte luminosa: LED

Se la distanza tra il captore ed il Nénuphar aumenta, la quantità di luce percepita dal sensore diminuisce. Il fenomeno si verifica in modo più accentuato con la biomassa algale in quanto le microalghe più vicine al Nénuphar assorbono la maggior parte delle radiazioni luminose rifratte.

I dati registrati a 15 cm di profondità non sono sempre corretti, si presuppone che la quantità di luce percepita dalle microalghe in quel punto sia maggiore rispetto al valore da noi registrato. La manica è collegata alla parte superiore del Nénuphar tramite un nastro adesivo impermeabile, di conseguenza quest'ultimo impedisce la rifrazione dei raggi luminosi alla profondità di 15 cm.

La quantità di luce che viene riflessa e la quantità che viene rifratta dipende dal materiale, dall'angolazione del sole o dal tipo di luce artificiale con cui viene effettuata la prova.

Grazie ai dati raccolti dalla stazione meteorologica è stato possibile capire quale fosse il momento migliore per eseguire le misure con la luce solare. Esse sono state effettuate nel primo pomeriggio, momento in cui il sole è inclinato rispetto alla superficie terrestre di $\sim 60^\circ$. Le misure con la lampada LED non dipendono invece dalle condizioni meteorologiche.

Nei grafici (Figure 4.31, 4.32) le misure vengono eseguite con un captore PAR posto a 3 cm di distanza dal Nénuphar. Come in precedenza, i valori registrati nel primo grafico dipendono dalla luce naturale, quelli registrati nel secondo grafico, da una fonte luminosa artificiale (LED).

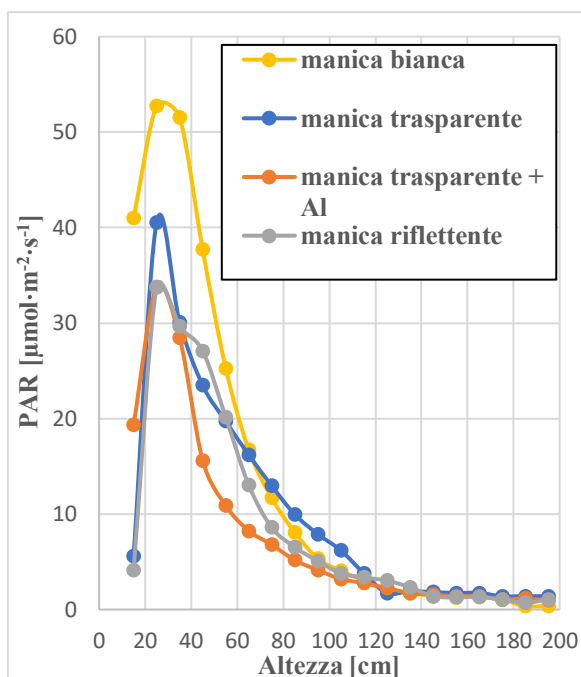


Figura 4.31: Curve PAR_{int} -altezza, $X = 3$ cm, fonte luminosa: sole

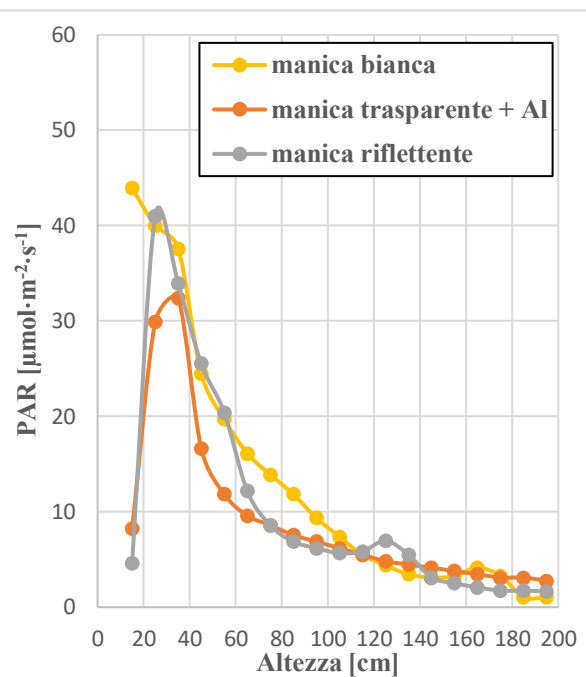


Figura 4.32: Curve PAR_{int} -altezza, $X = 3$ cm, fonte luminosa: LED

Anche i grafici (Figure 4.33, 4.34) denotano la quantità di fotoni in $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ che viene rifratta attraverso la manica del Nénuphar. Le misure, in questo caso, vengono eseguite con un captore PAR posto a 6 cm di distanza dal Nénuphar. I valori registrati nel primo grafico dipendono dalla luce naturale, quelli registrati nel secondo grafico, da una fonte luminosa artificiale (LED).

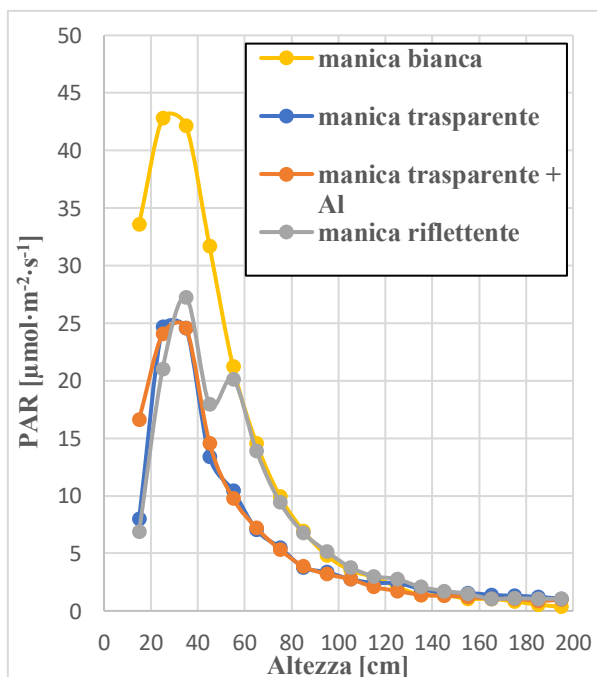


Figura 4.33: Curve PAR_{int} -altezza, $X = 6$ cm, fonte luminosa: sole

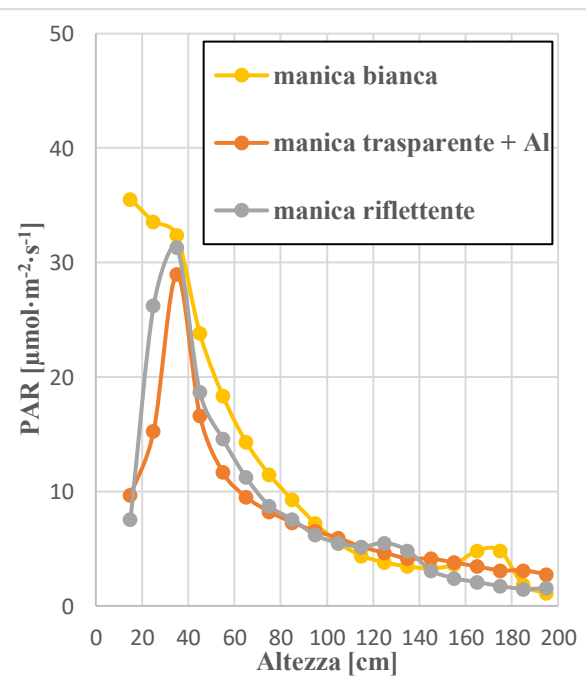


Figura 4.34: Curve PAR_{int} -altezza, $X = 6$ cm, fonte luminosa: LED

Si osserva che la manica bianca in LDPE con particelle di TiO₂ (4%) migliora notevolmente la dispersione della luce. L'ossido di titanio ha un elevato indice di rifrazione: 2,72 (rutilo) e 2,5 (anatasio), di conseguenza aumenta l'opacità del materiale e ne riduce la trasparenza. La luce che arriva nel Nénuphar è quindi distribuita in modo migliore lungo la manica e rifratta gradualmente nel liquido. Si ha così il giusto equilibrio tra luce rifratta e riflessa.

Le maniche bianche hanno uno spessore di 200 µm, le trasparenti di 150 µm, tuttavia, queste ultime assorbono una quantità di luce maggiore rispetto alle altre e non permettono una completa diffusione delle radiazioni luminose all'interno della vasca.

La manica bianca accentua i meccanismi di riflessione e rifrazione; il maggiore spessore e la presenza di particelle di TiO₂ rendono il materiale più resistente rispetto alle altre maniche utilizzate. Il parafilm riflettente al 50% (*Leaderfilm EXT 600*) risulta oltre che meno efficiente, troppo costoso per essere utilizzato in fotobioreattori industriali.

Risultati analoghi sono stati ottenuti introducendo nel liquido del colorante a diverse concentrazioni (grafici non mostrati). Quando la quantità di colorante introdotta nella soluzione aumenta, la luce percepita dal sensore diminuisce. Tali misurazioni sono paragonabili a quelle effettuate in una coltura algale, non bisogna però dimenticare che la clorofilla assorbe una quantità di luce maggiore rispetto alla biomassa algale contenuta nei fotobioreattori industriali.

La quantità di luce assorbita dalla clorofilla è proporzionale alla concentrazione di colorante introdotta. Più aumenta la concentrazione, meno i fotoni diffondono nella cultura.

L'introduzione di latte all'interno della manica trasparente, non facilita la trasmissione della luce. In particolare, con una quantità di latte all'interno della manica superiore a 100 ml, la luce misurata dal captore, ad una qualsiasi profondità, è pressoché trascurabile in quanto assorbita dal latte stesso.

Dopo i test effettuati con la luce artificiale e naturale è importante sottolineare che non ci sono molte differenze nelle due situazioni. Gli errori sperimentali sono, sicuramente, più accentuati nei test effettuati considerando il sole come unica fonte luminosa. La presenza di nuvole o di cambiamenti improvvisi delle condizioni meteorologiche non è prevedibile e condiziona notevolmente i valori registrati dal captore PAR.

Per ogni esperimento eseguito è stato registrato un valore della PAR all'esterno del prototipo di riferimento (PAR_{est}) (Tabella 4.3), fondamentale per confrontare tra loro i diversi risultati.

Tabella 4.3: Valori della PAR registrati all'esterno del prototipo di riferimento

PAR _{est} [µmol·m ⁻² ·s ⁻¹] - Fonte luminosa: sole				
Distanza del captore dalla manica (X)	Manica bianca	Manica trasparente	Manica trasparente + Al	Manica riflettente
1 cm	2022	1824	1963	1680
3 cm	2032	1640	1942	1705
6 cm	1961	1425	1633	1713

Per gli esperimenti eseguiti, utilizzando la lampada LED come fonte luminosa, il valore della PAR_{est} misurata è sempre lo stesso: $1597 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

4.2.4 Pilota e vasca secondaria

Avendo validato il terreno di coltura da utilizzare, il tipo di inoculo, ed il tipo di materiale della tecnologia Nénuphar è possibile iniziare le colture nei fotobioreattori industriali.

La quantità di biomassa attesa, in fotobioreattori di così grandi dimensioni, è senz'altro minore rispetto a quella ottenuta in fotobioreattori da laboratorio. Essa è fortemente condizionata non solo dal volume del reattore e dalle differenti tecniche di miscelazione utilizzate, ma anche dal ciclo giorno-notte. Più precisamente, l'illuminazione continua dei reattori, rispetto ai cicli giorno-notte, porta ad un maggior aumento del tasso di crescita delle microalghe (Da S Uebel *et al.*, 2019). È possibile quindi concludere che la produttività cambia linearmente in funzione del tempo di illuminazione.

L'effetto dei cicli giorno-notte sulla produzione industriale delle microalghe viene studiato attraverso le simulazioni eseguite nei fotobioreattori industriali.

I *batch* di coltura avviati per la prima campagna di misure, sono stati utili per testare il sistema di agitazione e determinare il numero ottimale di Nénuphar. Si premette che, per una maggiore chiarezza, all'interno del manoscritto, si è deciso di riportare solo i grafici relativi alla seconda campagna di misure, effettuata dal 9/07/19 al 28/07/19, in quanto maggiormente significativi dal punto di vista biologico.

I due *batch* di coltura avviati permettono di confrontare la crescita microalgale nei fotobioreattori aperti.

Le condizioni meteorologiche del mese di luglio ($T_{massima} = 31 \text{ }^{\circ}\text{C}$) favoriscono la crescita delle microalghe. Non si hanno cambiamenti improvvisi di temperatura, tuttavia, trovandoci in una zona ventilata (velocità media del vento = 21 km/h) la temperatura percepita è minore.

La radiazione fotosinteticamente attiva, misurata con il captore PAR esterno ai reattori, è massima alle ore 14:00; tutti i valori della PAR registrati dipendono linearmente dal ciclo giorno-notte. Lo stesso vale per gli altri fattori che influenzano la crescita delle microalghe, quali l' O_2 , la % a saturazione ed il pH.

Le microalghe producono ossigeno durante il giorno e lo consumano durante la notte, di conseguenza, la quantità di O_2 presente nella coltura algale, misurata in mattinata, è minore di quella registrata nel pomeriggio (Figura 4.35). Inoltre, si osserva che i valori misurati nei due bacini sono diversi, in particolare nell'ultima settimana di coltura. La quantità di ossigeno prodotto giornalmente è direttamente proporzionale alla concentrazione di microalghe presente nei reattori (Kouzuma and Watanabe, 2015).

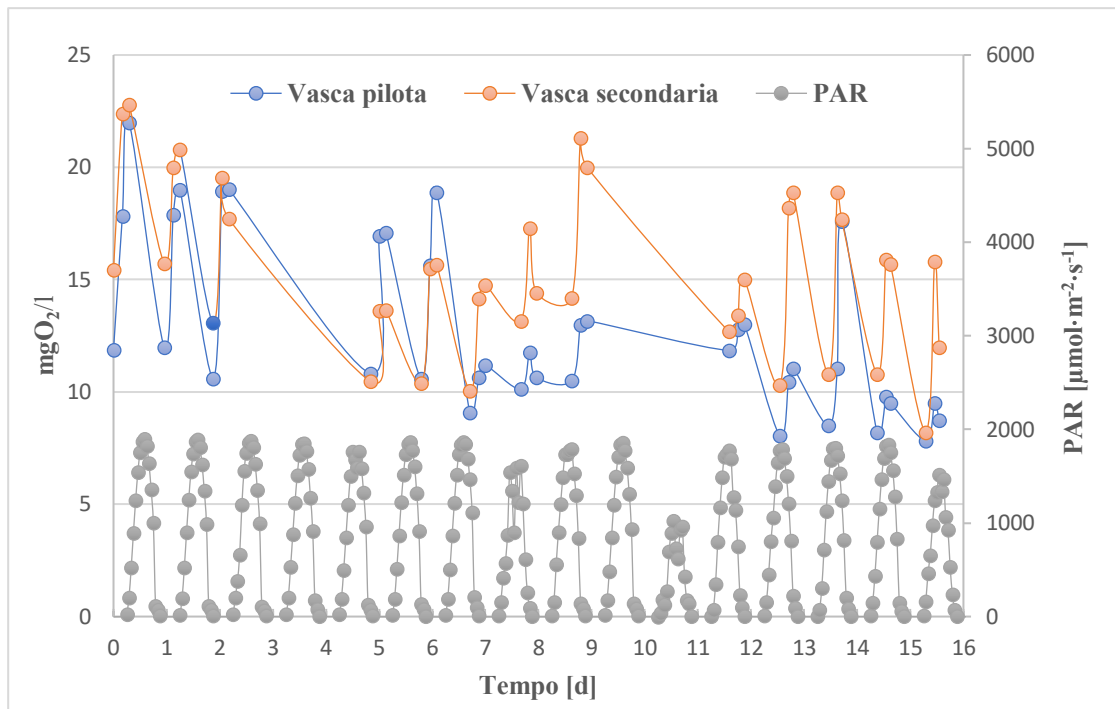


Figura 4.35: PAR_{est} e mgO_2/l nei fotobioreattori industriali

I mgO_2/l misurati nella vasca pilota, dopo i primi 8 giorni di coltura, sono minori rispetto a quelli misurati nella vasca secondaria. Questo indica senz'altro che il picco della fase esponenziale è stato raggiunto prima nella vasca pilota e poi nella secondaria. Tuttavia, facendo un'analisi complessiva dei due *batch* di coltura si constata che nella vasca secondaria si hanno condizioni più favorevoli per la crescita della biomassa algale.

Attraverso i valori di densità ottica registrati giornalmente si quantifica l'energia luminosa assorbita dai pigmenti (DO_{680}) e quella assorbita dalla biomassa (DO_{750}) (Figura 4.36).

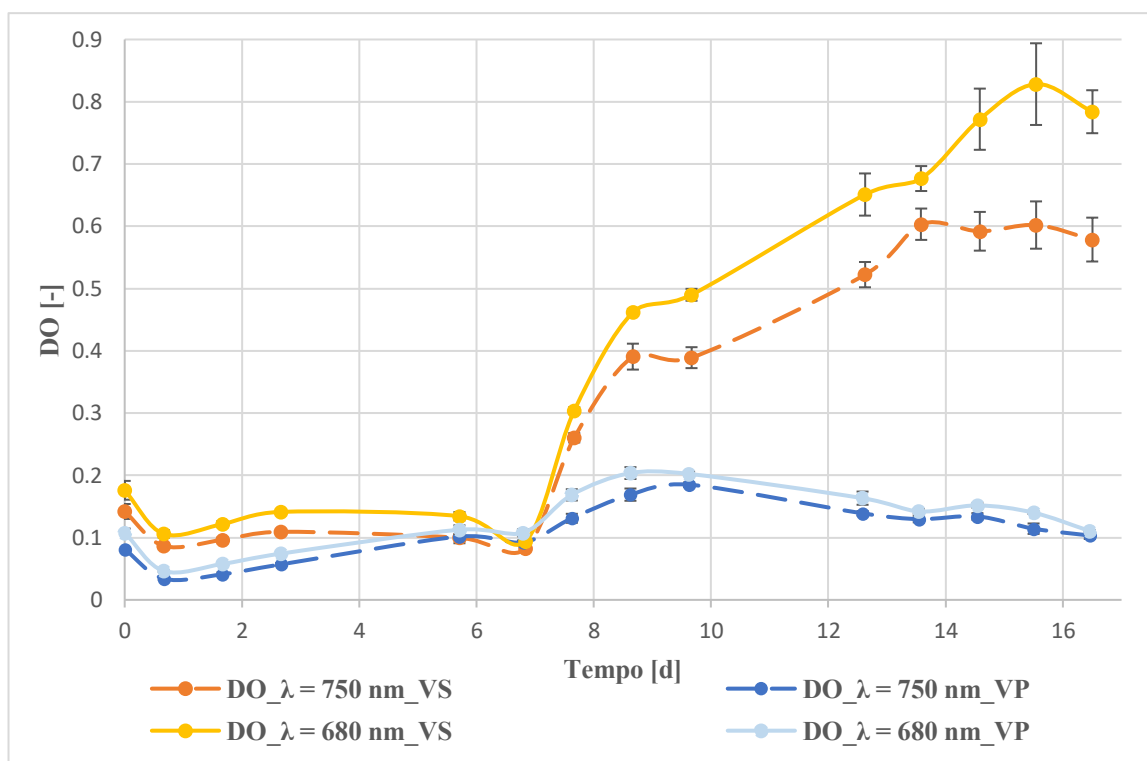


Figura 4.36: Curve di crescita DO-tempo, fotobioreattori industriali (BBM)

Le misurazioni di densità ottica sono state eseguite in triplicato, i prelievi sono stati fatti in 3 punti diversi delle vasche al fine di controllare l'omogeneità delle colture. Dalle curve di crescita DO-tempo è chiaro come le microalghe crescano più facilmente in vasche meno profonde. Tuttavia, il contributo dei *Nénuphar* nella vasca pilota permette una crescita della biomassa non trascurabile ($DO_{massima} = 0,2$ e $TSS_{massima} = 0,57$ g/l)

Per entrambe le colture, si ha inizialmente una fase di latenza ed adattamento delle microalghe al medium, alle condizioni ambientali ed al sistema di miscelazione dei reattori; si parla quindi di foto-acclimatazione della biomassa (Mottet, Habouzit and Steyer, 2014). In seguito inizia una fase di crescita esponenziale che nella vasca secondaria dura all'incirca 8 giorni.

La fase stazionaria (*plateau*) risulta più evidente nella vasca pilota rispetto alla vasca secondaria. Nella vasca secondaria, osservando in particolare la curva di DO_{750} , possiamo parlare di fase stazionaria a partire dal 14° giorno di coltura algale. Nella vasca pilota, la fase stazionaria inizia a partire dal 10° giorno di coltura.

Nella vasca pilota si osserva inoltre una lenta fase di declino (a partire dal 13° giorno di coltura), le microalghe assorbono le radiazioni luminose inviate nel reattore grazie ai *Nénuphar*, questo probabilmente rallenta la morte della biomassa. La luce, come testato nel prototipo di riferimento, è assorbita dalle microalghe che si trovano ad una profondità $\leq$ di un metro. Tuttavia per garantire un elevato tasso di crescita delle microalghe, è necessario avere un sistema di agitazione molto efficiente che permetta a tutta la biomassa di assorbire i fotoni necessari alla fotosintesi. Il sistema *air-lift* installato all'interno della vasca pilota garantisce l'assenza di biomassa algale sul fondo (verificata tramite campionamento) e l'agitazione della coltura, ma non una completa miscelazione (Figure 4.37, 4.38).

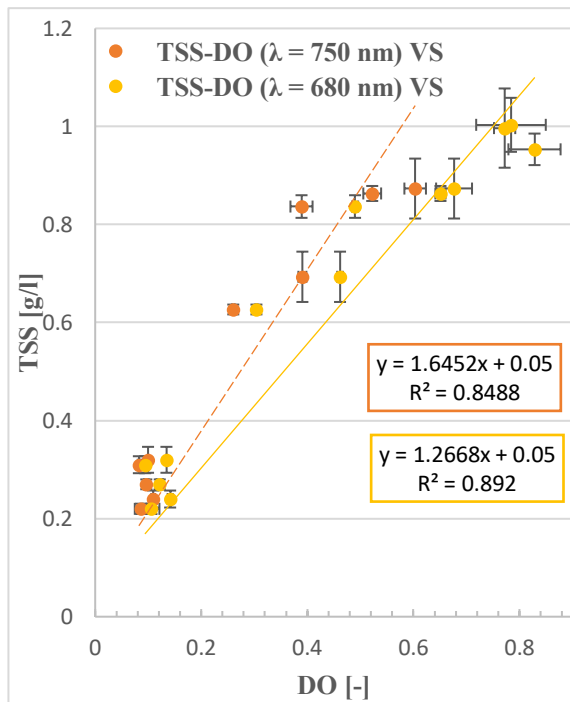


Figura 4.37: Correlazione tra TSS e DO, VP (BBM)

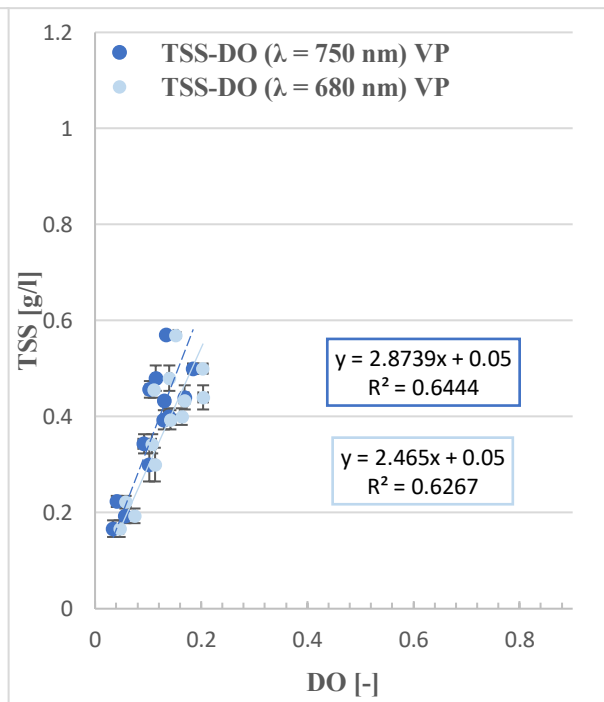


Figura 4.38: Correlazione tra TSS e DO, VS (BBM)

Il coefficiente di determinazione nella vasca pilota (R^2) è $\sim 0,64$, si può quindi dedurre che, nonostante si riesca a garantire l'assenza di biomassa algale sul fondo, il sistema di agitazione non è al 100% efficiente; si hanno così fenomeni di fotoinibizione.

Per alcuni valori di concentrazione si hanno delle barre di errore più elevate, questo è dovuto ai fenomeni di aggregazione e disaggregazione delle microalghe e ad improvvisi cambiamenti della struttura algale. Durante i *batch* di coltura, si notano cambiamenti di colore della biomassa, tendente al giallo negli ultimi giorni di vita. Inoltre, è evidente la formazione di schiuma sulla superficie, questo indica la presenza di batteri filamentosi che danneggiano le microalghe portandole alla predita della loro funzione depurativa. Il fenomeno è chiamato *bulking* filamentoso (Ramanan *et al.*, 2016), ricorrente in presenza di fanghi attivi.

La biomassa presente nei due reattori è continuamente monitorata con la miscoscopia (Figure 4.39, 4.40, 4.41, 4.42).

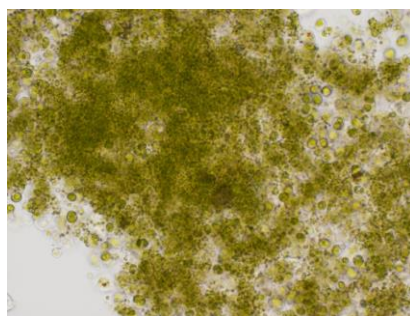


Figura 4.39: Microalghe in VS

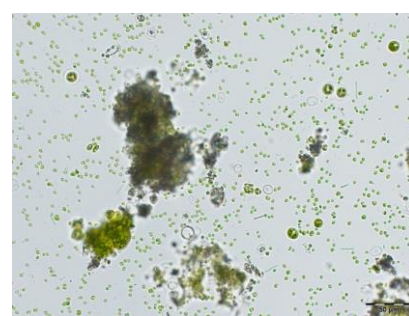


Figura 4.40: Microalghe in VP

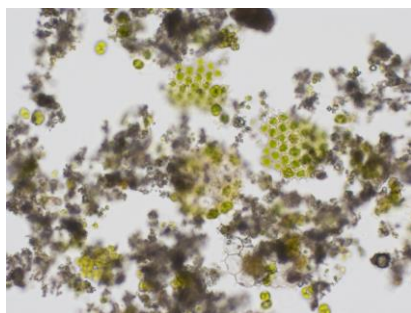


Figura 4.41: Biomassa morta in VP

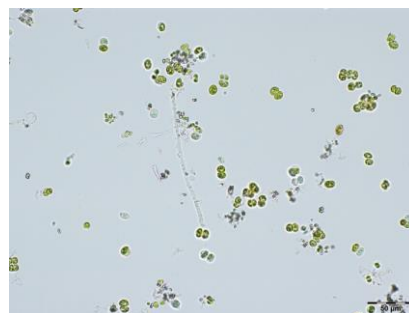


Figura 4.42: Esempi di cianobatteri in VS

La presenza di batteri e predatori quali rotiferi (*Brachionus plicatilis*, *Brachionus calyciflorus*) è attentamente controllata dato che, una quantità eccessiva può danneggiare gravemente la coltura algale. Ne sono un esempio i *Brachionus plicatilis*, essi sono in grado di mangiare 12.000 cellule microalgali l'ora portando all'arresto della coltura in pochi giorni (Lubzens, 1987).

Il tipo di microalghe, osservato giornalmente, rimane invariato rispetto all'inoculo introdotto. Si notano soltanto alcuni esemplari di cianobatteri dopo i primi 13 giorni di crescita della biomassa, un aumento di *Pediastrum* nella vasca pilota e di *Chlorella* nella vasca secondaria. Questo mostra che alcuni tipi di microalghe, quali *Pediastrum* e *Chlamydomonas* riescono a moltiplicarsi anche in condizioni non del tutto ottimali. La quantità di *Scenedesmus* e *Desmodesmus* diminuisce particolarmente nella vasca pilota.

I valori di fosforo, azoto e COD (totali e solubili), misurati sperimentalmente nella coltura algale, sono in accordo con i dati teorici riportati di seguito. La quantità di fosforo consumata dalle microalghe varia tra l'1% ed il 3% del peso secco, mentre quella dell'azoto tra il 5% ed il 10% (Markou, Vandamme and Muylaert, 2014). La quantità di carbonio è invece circa il 65% del peso secco della biomassa algale ed il COD è tra il 42% ed il 65% (Braunwald *et al.*, 2013).

Attraverso la misura del COD (Figura 4.43) è possibile avere un'idea della quantità di ossigeno consumata durante i processi di ossidazione di sostanze organiche e inorganiche.

I risultati sono stati ottenuti con analisi in duplicato; tuttavia il procedimento eseguito, in particolare per le misure di azoto e fosforo, è piuttosto lungo e porta a volte ad errori sperimentali.

La quantità di fosforo totale come $PO_4\text{-P}$ (Figura 4.44), presente nella coltura algale, segue l'andamento delle curve DO-tempo. Al settimo giorno di coltura si registrano dei valori di fosforo totale molto bassi, lo stesso giorno si ha una lieve ed improvvisa diminuzione della densità ottica e dei valori di TSS misurati. L'anomalia può essere attribuita ad un errore sperimentale eseguito durante il prelievo dei campioni o/e ad una limitazione da fosforo nella coltura.

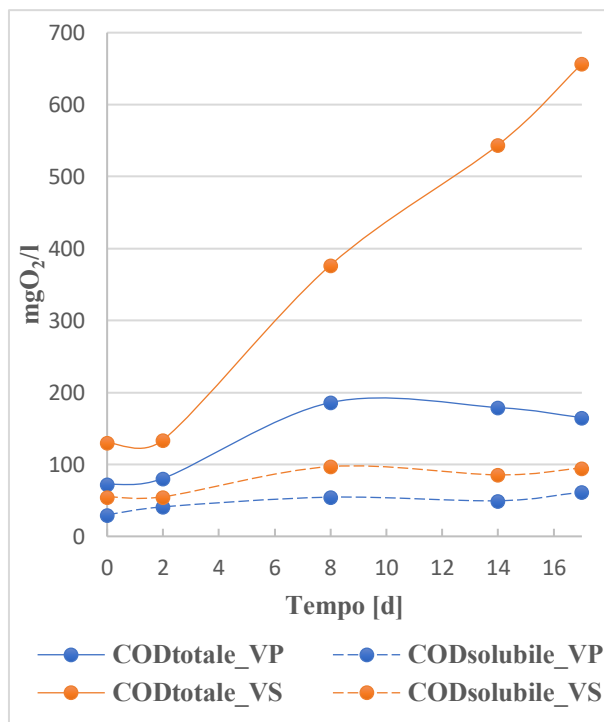


Figura 4.43: COD in mgO₂/l (fotobioreattori industriali)

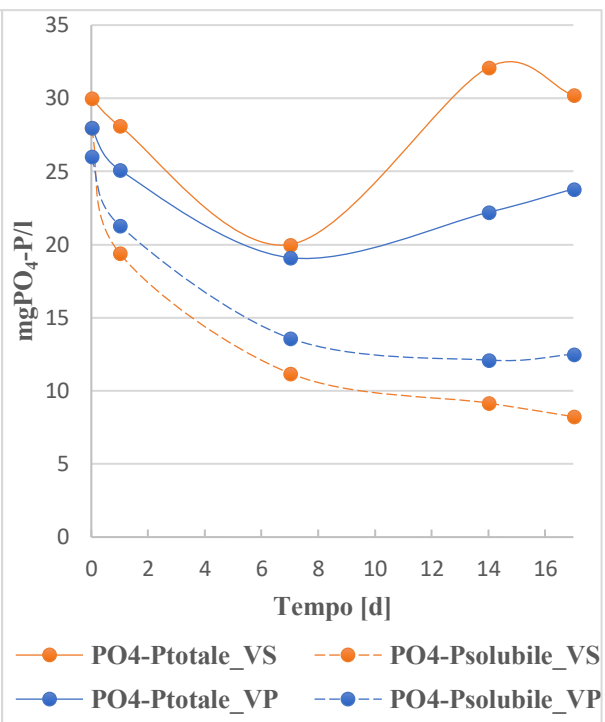


Figura 4.44: PO₄-P in mg/l (fotobioreattori industriali)

Esaminando le curve si nota come la quantità di fosforo totale aumenta all'aumentare della concentrazione di biomassa, e di conseguenza, il fosforo solubile diminuisce in quanto assorbito dalle microalghe.

Il tasso di crescita della biomassa algale all'interno della vasca secondaria è maggiore rispetto a quello registrato nella vasca pilota, ciò viene confermato dalle curve di COD. Si osserva come la quantità di COD solubile nelle due vasche resta pressoché costante durante i due *batch* di coltura eseguiti. Al contrario, i mg/l di O₂ totale aumentano in modo proporzionale alla concentrazione di microalghe. La pendenza della curva di COD_{totale} è maggiore per la coltura avviata nella vasca secondaria e conferma una migliore efficienza del sistema.

Un'altra osservazione importante riguarda la quantità di azoto presente nelle colture microalgali. Come sappiamo, l'unica fonte di azoto nel terreno di coltura è il nitrato. Tuttavia, si è deciso di controllare (ogni 3 giorni) anche la presenza di nitriti e ammoniaca, e quindi di batteri denitrificanti ed eventuali reazioni di denitrificazione. Le concentrazioni di NH₄ e NO₂ non sono riportate nei grafici in quanto trascurabili in entrambi i *batch* di coltura. Queste analisi sono state effettuate mediante cromatografia ionica ed in seguito ripetute con kit per verificarne l'accuratezza.

Si ricorda che le concentrazioni di nitriti, nitrati e ammoniaca nominate nel manoscritto sono riferite a campioni di soluzione nei quali la biomassa è stata eliminata tramite centrifugazione e filtrazione.

Confrontando i dati di fosforo e COD ottenuti con i valori teorici ipotizzati non si notano particolari anomalie. Non è possibile trarre le stesse conclusioni comparando i valori teorici di azoto totale e solubile, con le curve ricavate sperimentalmente (Figura 4.45).

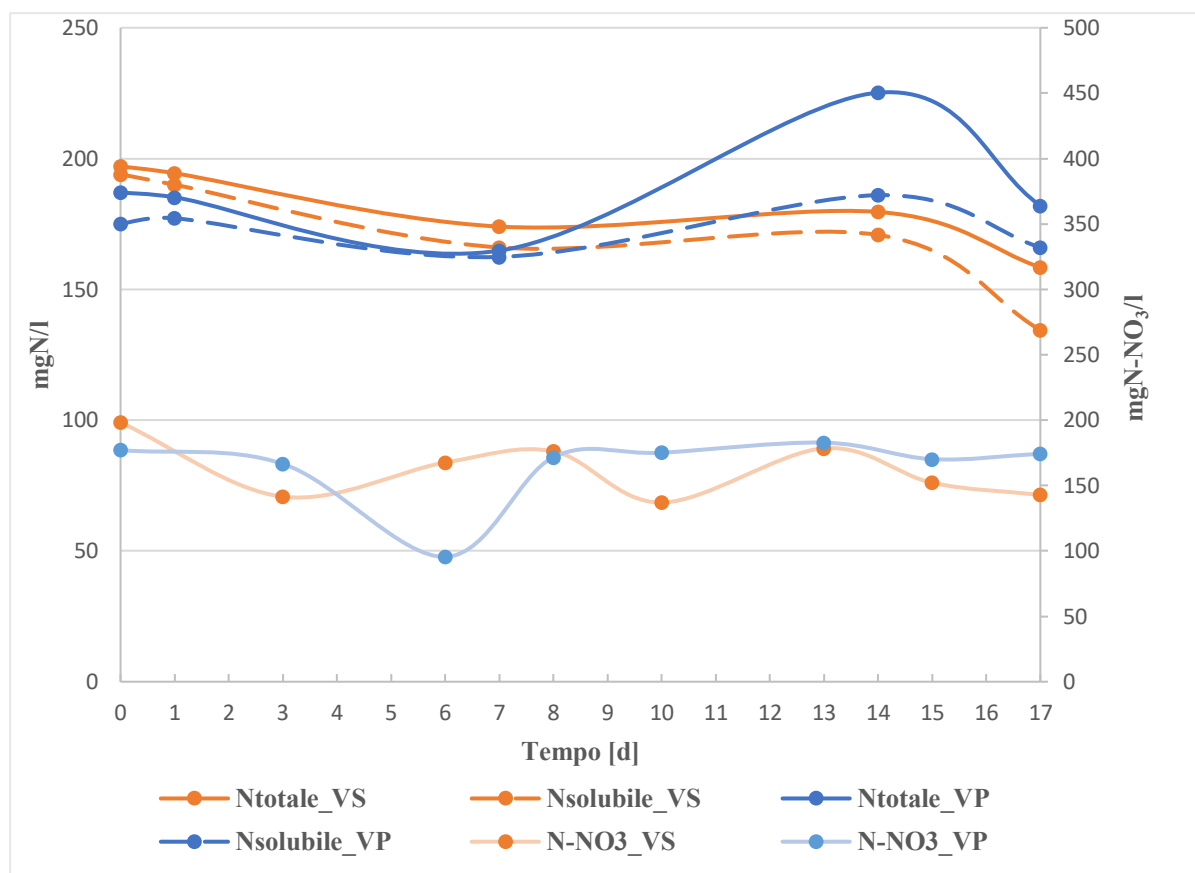


Figura 4.45: N_{totale} , $N_{solubile}$, $N-NO_3$ in mg/l (fotobioreattori industriali)

Analizzando con attenzione il grafico, è possibile avere un'idea dell'azoto consumato dalla biomassa algale. L'azoto solubile, come confermato dalla cromatografia ionica, è presente in soluzione sotto forma di nitrato; questo si osserva dalle curve di $N-NO_3$ e di $N_{solubile}$ che seguono lo stesso andamento. Esso viene consumato molto lentamente dalle microalghe e diminuisce maggiormente nella vasca secondaria.

Si registrano però alcune irregolarità: l'azoto consumato dalla biomassa algale non è compreso tra il 5 % ed il 10% del peso secco, ciò riguarda particolarmente i valori registrati nella vasca secondaria. Inoltre le curve ricavate hanno una pendenza molto bassa, la variazione della quantità di azoto totale, così come di azoto solubile, non è molto significativa.

Questo ci consente di concludere che, trovandoci in condizioni autotrofiche, le microalghe dovrebbero nutrirsi di azoto e carbonio inorganico, tuttavia, esistono altre forme di azoto che permettono la crescita della biomassa. Esse assorbono azoto e carbonio organico derivante dalla biomassa morta, ed eventualmente da amminoacidi presenti nella coltura.

Si osserva che l'inoculo utilizzato per l'avvio dei due *batch* contiene ANTYS 15, un fertilizzante a base di ammoniaca ed urea. Di conseguenza, si ipotizza che le microalghe assorbano, nei primi giorni di coltura, le forme azotate presenti nell'inoculo.

Il controllo del pH è di fondamentale importanza, durante la notte le alghe rilasciano CO_2 che contribuisce al suo abbassamento. Nel nostro caso, i valori di pH misurati, non sono solamente correlati alla produzione e al consumo di ossigeno e anidride carbonica, ma anche alla quantità di bicarbonato presente nel medium. Quest'ultimo funge da soluzione tampone e rende meno evidenti le oscillazioni della curva pH-tempo, collegate ai cicli giorno-notte (Figura

4.46). Il bicarbonato è un componente essenziale del terreno di coltura utilizzato, non rappresenta un problema per la crescita delle microalghe, ma al contrario ne promuove lo sviluppo (Vieira Costa, Colla and Filho, 2015).

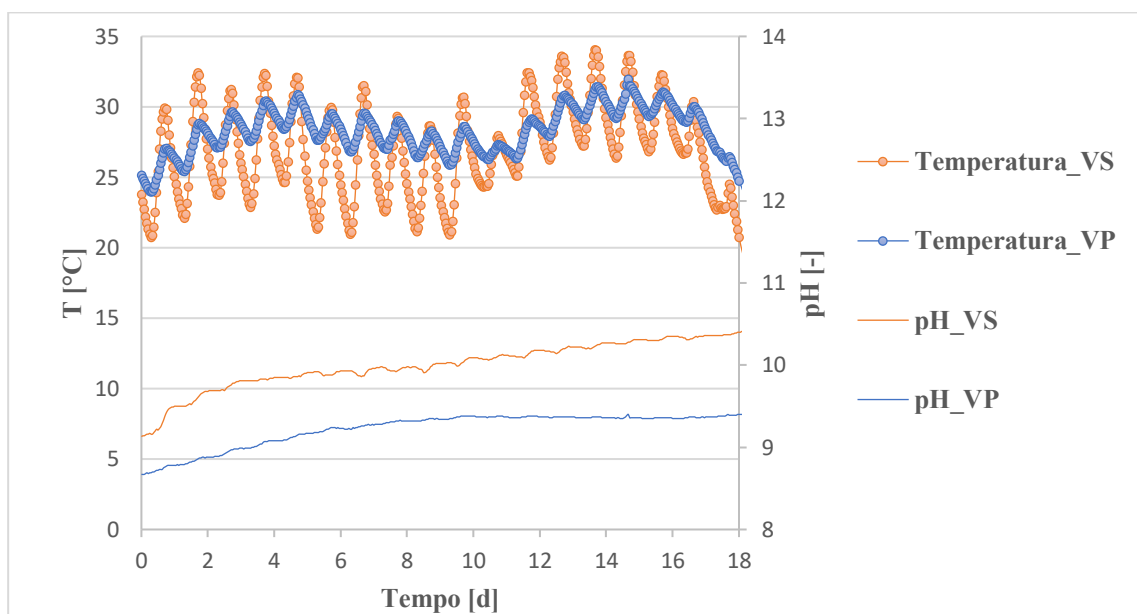


Figura 4.46: Temperatura e pH nei fotobioreattori industriali

I valori di pH registrati sono compresi tra 8.6 e 10.4, un pH elevato inibisce la presenza di batteri ma un ulteriore aumento ($\text{pH} > 10.5$) può determinare la morte delle microalghe. Le oscillazioni dei valori di pH solo più evidenti nella vasca secondaria perché la quantità di biomassa prodotta giornalmente è maggiore.

I cambiamenti di temperatura all'interno dei fotobioreattori dipendono dalle condizioni meteorologiche e dai valori della PAR registrati. Nella vasca secondaria lo scambio di calore per unità di superficie è maggiore, i frequenti cambiamenti di temperatura influenzano negativamente la crescita della biomassa. Al contrario, nella vasca pilota vi è una maggiore inerzia termica che non è però sufficiente per un aumento della produttività.

Per avere una visione globale dell'analisi comparativa effettuata con i due fotobioreattori, sono stati riportati in un unico grafico i valori medi di pH, temperatura e produttività giornalieri (Figura 4.47). La produttività è espressa rispetto ai m^2 di suolo occupato (superficie + pompa di ricircolo = $5,03 \text{ m}^2$).

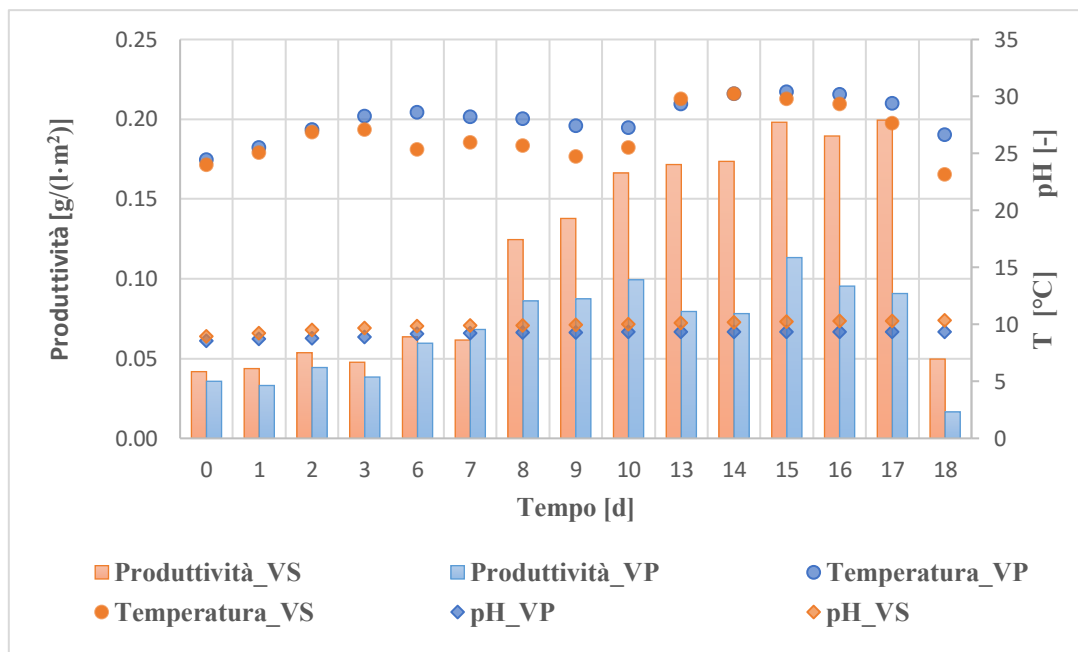


Figura 4.47: Produttività giornaliera (fotobioreattori industriali)

I m² di suolo occupato dai fotobioreattori sono uguali, di conseguenza guardando il grafico è possibile concludere che la biomassa algale cresce più facilmente nella vasca secondaria. Tuttavia, solo grazie al contributo dei Nénuphar ed al sistema di miscelazione installato è possibile avere una crescita della biomassa anche all'interno della vasca pilota. Questo suggerisce che un ulteriore miglioramento della tecnologia Nénuphar, ed un potenziamento del sistema di agitazione, potrebbero portare ad un aumento della produttività anche all'interno di reattori più profondi.

Ulteriori osservazioni sono lecite se si volesse recuperare la biomassa nei due reattori durante la sua fase di crescita esponenziale (Figura 4.48).

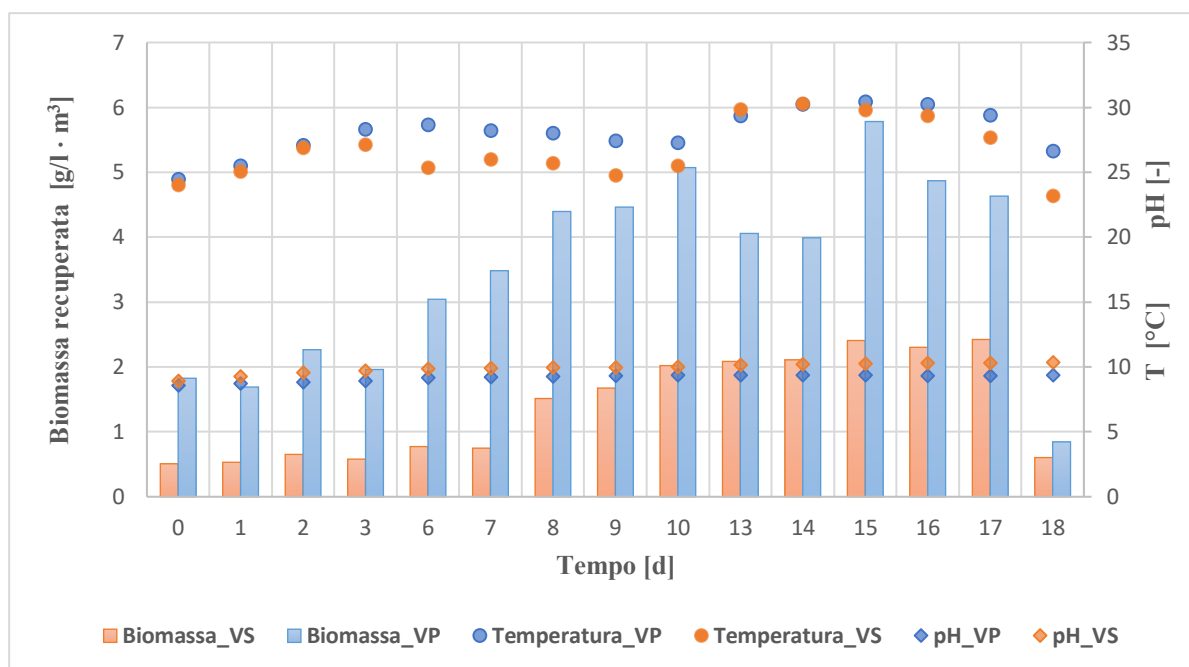


Figura 4.48: Biomassa recuperata (fotobioreattori industriali)

La biomassa recuperata è espressa in $\text{g/l} \cdot \text{m}^3$. I metri cubi indicano rispettivamente il volume della vasca pilota ed il volume della vasca secondaria, diversi tra loro.

La quantità di microalghe filtrata ed essiccata, proveniente dal reattore pilota, è $\sim 2,8$ volte maggiore rispetto a quella proveniente dal reattore secondario. Questo perché, il volume della vasca pilota è 4,2 volte maggiore rispetto al volume della vasca secondaria. Bisognerebbe a questo punto fare un'analisi dei costi di agitazione, di manutenzione e di installazione del reattore pilota (contenente i Nénuphar) e del reattore secondario (tipo *raceway*).

Grazie ad una dettagliata analisi economica è possibile capire qual è la concentrazione di biomassa ottimale che bisognerebbe ottenere nella vasca pilota affinché essa abbia un'efficienza maggiore rispetto alla vasca secondaria. Per raggiungere la concentrazione ottimale durante il *batch* di coltura, si pensa ad un'ulteriore modifica dei Nénuphar e del sistema di agitazione del reattore pilota.

5 Conclusioni e prospettive future

Grazie allo *scale-up* effettuato e agli studi sui diversi tipi di fotobioreattori è stato possibile analizzare il comportamento delle microalghe in funzione della temperatura, del sistema di agitazione installato e della fonte luminosa.

I diversi terreni di coltura, validati grazie agli esperimenti eseguiti in laboratorio, sono adattabili a numerosi generi microalgali (*Desmodesmus*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Pediastrum*, e *Arthrospira*).

Più difficile risulta invece la validazione del sistema di agitazione che viene sottoposto a continui cambiamenti durante lo *scale-up*. La tecnica *air-lift* sperimentata e l'utilizzo di pompe di ricircolo, ci hanno permesso di ottenere un tasso di crescita delle microalghe più elevato in fotobioreattori di tipo *raceway* che in fotobioreattori più profondi.

In conclusione, con un sistema di agitazione adeguato e con l'aiuto dei Nénuphar la crescita microalgale è possibile anche in reattori alti 2 m. Tuttavia, per poter avere una produttività elevata in fotobioreattori di così grandi dimensioni è necessario continuare a migliorare il sistema di agitazione installato, i Nénuphar e le loro caratteristiche.

Per quanto riguarda il sistema di agitazione, risulta importante il diametro delle bolle d'aria che gorgogliano nella coltura. Bolle troppo grandi portano ad una morte più veloce delle alghe e ne modificano la struttura (Duchène and Cotteux, 2002). Si pensa inoltre di aumentare il numero di pompe di ricircolo in maniera proporzionale alle dimensioni del reattore. L'utilizzo di un'unica pompa, nella vasca pilota, è stato infatti limitante per un aumento della velocità di crescita della biomassa.

La tecnologia Nénuphar è senz'altro utile per la diffusione della luce nei fotobioreattori ma, oggi, la produzione di biomassa a basso costo continua ad essere più diffusa nei classici *raceway*. Lo studio dettagliato delle caratteristiche tecniche dei Nénuphar ci ha aiutato a selezionare quali sono gli aspetti da migliorare ulteriormente.

Si prevede, ad esempio, un allargamento della testa del Nénuphar per avere una maggiore concentrazione della luce. Un'area di base maggiore (+ 33%) consentirebbe di migliorare la propagazione dei raggi luminosi nella manica.

Per un'ulteriore ottimizzazione della tecnologia, sono previsti studi con esperti di ottica (laboratorio IRSTEA) al fine di discutere dei risultati ottenuti con il prototipo di riferimento e continuare il lavoro svolto. Grazie al captore PAR nel prototipo, abbiamo rilevato una quantità non trascurabile di fotoni fino alla profondità di un metro, quindi, ridurre l'altezza delle vasche da 2 m a 1 m potrebbe essere più conveniente.

Eseguendo *batch* di coltura in fotobioreattori industriali di diverse dimensioni si potrà capire qual è la lunghezza ottimale del Nénuphar.

Si pensa inoltre, ad un miglioramento ulteriore della resistenza della manica e all'introduzione di un sistema per la pulizia dei Nénuphar, che si sporcano a causa del calcare e del bicarbonato presente nel medium.

Dopo la diffusione della tecnologia su scala industriale sarà possibile concentrarsi sull'aggiunta di CO₂, sui sistemi di riscaldamento e su fonti luminose artificiali.

Si prevede in futuro, l'installazione dei reattori sottoterra per un maggiore isolamento termico. L'obiettivo resta quello di implementare colture con ceppi algali selezionati quali *Arthrospira platensis*, al fine di utilizzare le microalghe come integratori alimentari e/o per la produzione di biocarburante.

6 Lista dei simboli

INRAE: Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

LBE: Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement

IC: ion chromatography

AFP: antifreeze proteins

GLA: acido gamma linolenico

EPA: lacido eicosapentaenoico

DHA: acido docosaesaenoico

EDTA: acido etilendiammonotetracetico

ATP: adenosina trifosfato

NADPH: coenzima nitrato reduttasi

LDPE: low-density polyethylene

PMMA: polimetilmetacrilato

PVC: polivinilcloruro

VS: vasca secondaria, volume coltura = 2,4 m³

VP: vasca pilota, volume coltura = 10,1 m³

PAR: radiazione fotosinteticamente attiva

PAR_{int}: PAR interno al prototipo di riferimetno

PAR_{est}: PAR esterno al prototipo di riferimento

PAR_{fotobioreattori}: PAR esterno ai fotobioreattori industriali

X: distanza tra il captore PAR ed il Nénuphar

BBM: Bold's Basal Medium

ZM: Zarrouk Medium

BBM_{modificato}: Bold's Basal Medium con 40 mmol/l di NaHCO₃

ZM_{modificato}: Zarrouk Medium con 40 mmol/l di NaHCO₃

T: temperatura in °C

λ: lunghezza d'onda

DO₆₈₀: densità ottica misurata a 680 nm

DO₇₅₀: densità ottica misurata a 750 nm

DO_{tecan}: densità ottica misurata con lo spettrofotometro *Infinite Nanoquant M200* (Tecan ®)

DO_{thermo}: densità ottica misurata con lo spettrofotometro *FT-IR Nicolet™ iS™5* di Thermo Scientific™

F_d: fattore di diluizione

COD: domanda chimica di ossigeno

COD_{totale}: domanda chimica di ossigeno nella coltura algale

COD_{solubile}: domanda chimica di ossigeno nella coltura algale, dopo centrifugazione e filtrazione (0,45 µm)

N_{totale}: mg/l di azoto nella coltura algale

N_{solubile}: mg/l di azoto nella coltura algale, dopo centrifugazione e filtrazione (0,45 µm)

N-NO₃: mg/l di azoto in NO₃ nella coltura algale, dopo centrifugazione e filtrazione (0,2 µm)

PO₄-P_{totale}: mg/l di fosforo in PO₄ nella coltura algale

PO₄-P_{solubile}: mg/l di fosforo in PO₄ nella coltura algale, dopo centrifugazione e filtrazione (0,45 µm)

TSS: solidi totali sospesi

μ_{max}: tasso di crescita della biomassa algale espresso in d⁻¹

t_i: inizio della fase esponenziale

t_f: fine della fase esponenziale

C_i: concentrazione di biomassa nella coltura algale al tempo *t_i*

C_f: concentrazione di biomassa nella coltura algale al tempo *t_f*

M_f: peso in mg del piattino + filtro + residuo del campione dopo essiccamento

M₀: peso in mg del piattino + filtro prima di essere usato

$V_{campione}$: volume in ml del campione sottoposto a filtrazione

R^2 : coefficiente di determinazione (Microsoft Excel)

V_{tot}^* : volume del medium + H₂O + inoculo da ripartire nelle due vasche

$V_{f,VS}$: volume di coltura finale nella vasca secondaria

$V_{f,VP}$: volume di coltura finale nella vasca pilota

$V_{f,tot}$: volume finale, totale

V_1 : volume restante nella vasca pilota

V_2 : volume da spostare nella vasca secondaria

7 Riferimenti bibliografici

Amaral, M. de S. *et al.* (2020) ‘Adjustment of the Operational Parameters of an Unconventional Integrated and Illuminated Internally Photobioreactor (ILI-PBR) for the Batch Autotrophic Cultivation of the *Chlorella minutissima*, Using the Taguchi Method’, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Springer. doi: 10.1007/s12010-020-03259-0.

Béchet, Q. *et al.* (2018) ‘Comparative assessment of evaporation models in algal ponds’, *Algal Research*, 35(September), pp. 283–291. doi: 10.1016/j.algal.2018.08.022.

Behl, K. *et al.* (2020) ‘Multifaceted applications of isolated microalgae *Chlamydomonas* sp. TRC-1 in wastewater remediation, lipid production and bioelectricity generation’, *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 304. doi: 10.1016/j.biortech.2020.122993.

Bellucci, M. *et al.* (2020) ‘Disinfection and nutrient removal in laboratory-scale photobioreactors for wastewater tertiary treatment’, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. John Wiley and Sons Ltd, 95(4), pp. 959–966. doi: 10.1002/jctb.6010.

Bernardi, A. *et al.* (2017) ‘Semi-empirical modeling of microalgae photosynthesis in different acclimation states – Application to *N. gaditana*’, *Journal of Biotechnology*. Elsevier, 259(January), pp. 63–72. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.08.002.

Böcker, L. *et al.* (2020) ‘Time-temperature-resolved functional and structural changes of phycocyanin extracted from *Arthrospira platensis*/Spirulina’, *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 316. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126374.

Braunwald, T. *et al.* (2013) ‘Effect of different C/N ratios on carotenoid and lipid production by *Rhodotorula glutinis*’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(14), pp. 6581–6588. doi: 10.1007/s00253-013-5005-8.

Bushra, R. (2018) ‘Chapter 15 - Functionalized Nanomaterials for Chromatography’, in Hussain, C. M. B. T.-N. in C. (ed.). Elsevier, pp. 403–414. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812792-6.00015-7>.

Carvalho, A. P. *et al.* (2011) ‘Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 1275–1288. doi: 10.1007/s00253-010-3047-8.

Cho, B. A. and Pott, R. W. M. C. (2019) ‘The development of a thermosiphon photobioreactor and analysis using Computational Fluid Dynamics (CFD)’, *Chemical Engineering Journal*. Elsevier B.V., pp. 141–154. doi: 10.1016/j.cej.2019.01.104.

Costa, S. S. *et al.* (2018) ‘Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae’, *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, pp. 552–562. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.064.

Delrue, F. *et al.* (2017) ‘Optimization of *Arthrospira platensis* (Spirulina) Growth: From Laboratory Scale to Pilot Scale’, *Fermentation*. MDPI AG, 3(4), p. 59. doi: 10.3390/fermentation3040059.

Duchène, P. and Cotteux, E. (2002) *Insufflation d’air fines bulles : application aux stations d’épuration en boues activées des petites collectivités*. Cemagref.

González-Camejo, J. *et al.* (2020) ‘Improving membrane photobioreactor performance

by reducing light path: operating conditions and key performance indicators', *Water Research*. Elsevier Ltd, 172. doi: 10.1016/j.watres.2020.115518.

Graham, L. A. *et al.* (2020) 'Antifreeze protein complements cryoprotective dehydration in the freeze-avoiding springtail *Megaphorura arctica*', *Scientific Reports*. Nature Research, 10(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-020-60060-z.

Halim, M. A. and Ruma (2018) 'Treatment of *Chlamydomonas* by generation of high voltage discharge plasma at water surface', *4th International Conference on Advances in Electrical Engineering, ICAEE 2017*, 2018-Janua, pp. 551–555. doi: 10.1109/ICAEE.2017.8255417.

Hegewald, E. (1997) 'Taxonomy and Phylogeny of *Scenedesmus*', *Algae*, 12(4), pp. 235–246.

Hu, J. *et al.* (2020) 'Nitrogen and phosphorus removals by the agar-immobilized *Chlorella saccharophila* with long-term preservation at room temperature', *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 251. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126406.

Jacob-Lopes, E. *et al.* (2019) 'Bioactive food compounds from microalgae: an innovative framework on industrial biorefineries', *Current Opinion in Food Science*, 25, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.cofs.2018.12.003.

Kouzuma, A. and Watanabe, K. (2015) 'Exploring the potential of algae/bacteria interactions', *Current Opinion in Biotechnology*, 33, pp. 125–129. doi: 10.1016/j.copbio.2015.02.007.

Lakaniemi, A.-M. *et al.* (2015) 'Carbon dioxide utilization in gas-sparged microalgal photobioreactors', *Conference paper presented at: Asian biohydrogen, bioproducts symposium. Chongqing, China*, (November).

Li, Y. *et al.* (2008) 'Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(4), pp. 629–636. doi: 10.1007/s00253-008-1681-1.

Liu, X. *et al.* (2020) 'Conditions for continuous cultivation of *Chlorella sorokiniana* and nutrient removal from anaerobic digestion effluent of aquatic macrophytes', *International Biodeterioration and Biodegradation*. Elsevier Ltd, 149, p. 104923. doi: 10.1016/j.ibiod.2020.104923.

Lorenzo-Hernando, A. *et al.* (2019) 'Recovery of proteins from biomass grown in pig manure microalgae-based treatment plants by alkaline hydrolysis and acidic precipitation', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 273, pp. 599–607. doi: 10.1016/j.biortech.2018.11.068.

Luan, G., Zhang, S. and Lu, X. (2020) 'Engineering cyanobacteria chassis cells toward more efficient photosynthesis', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 62, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.copbio.2019.07.004.

Lubzens, E. (1987) 'Raising rotifers for use in aquaculture', *Hydrobiologia*. Kluwer Academic Publishers, 147(1), pp. 245–255. doi: 10.1007/BF00025750.

Lv, J. *et al.* (2019) 'Integration of wastewater treatment and flocculation for harvesting biomass for lipid production by a newly isolated self-flocculating microalga *Scenedesmus rubescens* SX', *Journal of Cleaner Production*. Elsevier Ltd, 240(92), p. 118211. doi: 10.1016/j.jclepro.2019.118211.

Markou, G., Vandamme, D. and Muylaert, K. (2014) 'Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients', *Water Research*. Elsevier Ltd, 65, pp. 186–202. doi:

10.1016/j.watres.2014.07.025.

Martínez-Sanz, M. *et al.* (2020) 'Nano-/microstructure of extruded Spirulina/starch foams in relation to their textural properties', *Food Hydrocolloids*. Elsevier B.V., 103. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105697.

Mata, T. M., Martins, A. A. and Caetano, N. S. (2010) 'Microalgae for biodiesel production and other applications: A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), pp. 217–232. doi: 10.1016/j.rser.2009.07.020.

Michele, G. de M. *et al.* (2015) 'Carbon dioxide mitigation by microalga in a vertical tubular reactor with recycling of the culture medium', *African Journal of Microbiology Research*, 9(33), pp. 1935–1940. doi: 10.5897/ajmr2015.7632.

Molino, A. *et al.* (2020) 'Recent developments in supercritical fluid extraction of bioactive compounds from microalgae: Role of key parameters, technological achievements and challenges', *Journal of CO2 Utilization*. Elsevier, 36(September 2019), pp. 196–209. doi: 10.1016/j.jcou.2019.11.014.

de Mooij, T. *et al.* (2016) 'Impact of light color on photobioreactor productivity', *Algal Research*. The Authors, 15, pp. 32–42. doi: 10.1016/j.algal.2016.01.015.

Moon, M. *et al.* (2013) 'Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*', *Algal Research*. Elsevier B.V., 2(4), pp. 352–357. doi: 10.1016/j.algal.2013.09.003.

Mottet, A., Habouzit, F. and Steyer, J. P. (2014) 'Anaerobic digestion of marine microalgae in different salinity levels', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 158, pp. 300–306. doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.055.

Mukherjee, B., Madhu, S. and Wangikar, P. P. (2020) 'The role of systems biology in developing non-model cyanobacteria as hosts for chemical production', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 64, pp. 62–69. doi: 10.1016/j.copbio.2019.10.003.

Ochsenreither, K. *et al.* (2016) 'Production strategies and applications of microbial single cell oils', *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT). doi: 10.3389/fmicb.2016.01539.

Okonkwo, C. A. *et al.* (2020) 'The synthesis of micromesoporous carbon derived from nitrogen-rich spirulina extract impregnated castor shell based on biomass self-doping for highly efficient supercapacitor electrodes', *Journal of Alloys and Compounds*. Elsevier Ltd, 825. doi: 10.1016/j.jallcom.2020.154009.

Orofino, N. (2017) *Macroalghe e microalghe: applicazioni in campo alimentare, industriale e farmaceutico*. Youcanprint. Available at: <https://books.google.it/books?id=EmqqDgAAQBAJ>.

Pandey, J. P., Pathak, N. and Tiwari, A. (no date) *Standardization of pH and Light Intensity for the Biomass Production of Spirulina platensis*, *J. Algal Biomass Utln*.

Pasztaleniec, A. and Poniewozik, M. (2004) 'Pediastrum species (Hydrodictyaceae, Sphaeropleales) in phytoplankton of Sumin Lake (Łęczna-Włodawa Lakeland)', *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 73(1), pp. 39–46. doi: 10.5586/asbp.2004.006.

Pelizer, L. H. *et al.* (2003) 'Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation', *Journal of Food Engineering*, 56(4), pp. 371–375. doi: 10.1016/S0260-8774(02)00209-1.

Pugazhendhi, A. *et al.* (2020) 'Biodiesel from *Scenedesmus* species: Engine performance, emission characteristics, corrosion inhibition and bioanalysis', *Fuel*. Elsevier Ltd, 276. doi:

10.1016/j.fuel.2020.118074.

Pulgarin, A. *et al.* (2020) 'A novel proposition for a citrate-modified photo-Fenton process against bacterial contamination of microalgae cultures', *Applied Catalysis B: Environmental*. Elsevier B.V., 265. doi: 10.1016/j.apcatb.2020.118615.

Ramanan, R. *et al.* (2016) 'Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications', *Biotechnology Advances*, 34(1), pp. 14–29. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.003.

Ribeiro, V. R. *et al.* (2019) 'Bringing together *Saccharomyces cerevisiae* and bioactive compounds from plants: A new function for a well-known biosorbent', *Journal of Functional Foods*. Elsevier, 60(March), p. 103433. doi: 10.1016/j.jff.2019.103433.

Da S Uebel, L. *et al.* (2019) 'Industrial plant for production of spirulina sp. LEB 18', *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Assoc. Brasileira de Eng. Química / Braz. Soc. Chem. Eng., 36(1), pp. 51–63. doi: 10.1590/0104-6632.20180361s20170284.

Sadava, D. *et al.* (2008) *SCIENZE*. Available at: www.zanichelli.it (Accessed: 22 December 2019).

Sampathkumar, S. J. and Gothandam, K. M. (2019) 'Sodium bicarbonate augmentation enhances lutein biosynthesis in green microalgae *Chlorella pyrenoidosa*', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 22(October), p. 101406. doi: 10.1016/j.bcab.2019.101406.

Sathasivam, R. *et al.* (2017) 'Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine', *Saudi Journal of Biological Sciences*. King Saud University, 26(4), pp. 709–722. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.11.003.

Schott, P. and Beaudoin, L. (2005) 'Different approximations to the computation of reflected and refracted angles thanks to Snell-Descartes laws and Fresnel coefficients', *International Geoscience and Remote Sensing Symposium (IGARSS)*. IEEE, 5, pp. 3188–3191. doi: 10.1109/IGARSS.2005.1526518.

Sivakaminathan, S. *et al.* (2020) 'Light guide systems enhance microalgae production efficiency in outdoor high rate ponds', *Algal Research*. Elsevier B.V., 47. doi: 10.1016/j.algal.2020.101846.

Susanna, D. *et al.* (2019) 'Increasing productivity of *Spirulina platensis* in photobioreactors using artificial neural network modeling', *Biotechnology and Bioengineering*. John Wiley and Sons Inc., 116(11), pp. 2960–2970. doi: 10.1002/bit.27128.

Swapnil, G. S. *et al.* (2014) 'Increasing the extraction efficiency of algal lipid for biodiesel production: Novel application of algal viruses', *African Journal of Biotechnology*, 13(15), pp. 1666–1670. doi: 10.5897/ajb2013.13183.

Toro-Huertas, E. I. *et al.* (2019) 'Photorespiration in an outdoor alkaline open-photobioreactor used for biogas upgrading', *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 667, pp. 613–621. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.02.374.

Uggetti, E. *et al.* (2018) 'CO₂ addition to increase biomass production and control microalgae species in high rate algal ponds treating wastewater', *Journal of CO₂ Utilization*. Elsevier, 28(July), pp. 292–298. doi: 10.1016/j.jcou.2018.10.009.

Usharani, G., Saranraj, P. and Kanchana, D. (2012) 'Spirulina Cultivation: A Review', *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archive*, 3(6), pp. 1327–1341.

Usharani, G., Saranraj, P. and Kanchana, D. (2012) *Spirulina Cultivation: A Review*,

International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives. Available at: www.ijpba.info.

Vieira Costa, J. A., Colla, L. M. and Filho, P. D. (2015) 'Spirulina platensis Growth in Open Raceway Ponds Using Fresh Water Supplemented with Carbon, Nitrogen and Metal Ions', *Zeitschrift für Naturforschung C*. Walter de Gruyter GmbH, 58(1–2), pp. 76–80. doi: 10.1515/znc-2003-1-214.

Visviki, I. and Santikul, D. (2000) 'The pH tolerance of Chlamydomonas applanata (volvocales, chlorophyta)', *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38(2), pp. 147–151. doi: 10.1007/s002449910018.

Vulgaris, C. (2014) 'Experimental Investigation Parameters of Hydrogen Production by Algae Chlorella Vulgaris', (September 2014), pp. 2–5. doi: 10.15242/icie.c914010.

Yao, S. *et al.* (2018) 'Microalgae-bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production: a review', *Journal of Applied Microbiology*. Wiley/Blackwell (10.1111). doi: 10.1111/jam.14095.

Yousuf, A. (2019) *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. Elsevier Science & Technology. Available at: <https://books.google.it/books?id=BYBOwwEACAAJ>.

Zarrouk, C. (1966) *Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques Sur la Croissance et la Photosynthèse de Spirulina maxima*. Ph.D. Thesis, Université De Paris, Paris. - References - Scientific Research Publishing (no date). Available at: [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1332043](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1332043) (Accessed: 3 December 2019).

Zhang, Y., Caldwell, G. S. and Sallis, P. J. (2019) 'Semi-continuous anaerobic co-digestion of marine microalgae with potato processing waste for methane production', *Journal of Environmental Chemical Engineering*. Elsevier, 7(1), p. 102917. doi: 10.1016/j.jece.2019.102917.

Zullaikah, S. *et al.* (2019) 'Ecofuel conversion technology of inedible lipid feedstocks to renewable fuel', in *Advances in Eco-Fuels for a Sustainable Environment*. Elsevier, pp. 237–276. doi: 10.1016/b978-0-08-102728-8.00009-7.

8 Appendici

Appendice 1: Soluzione di Hutner

La soluzione di Hutner (Tabella 8.1) viene aggiunta al terreno di coltura solo dopo aver miscelato accuratamente gli altri composti chimici presenti nel medium. Essa viene preparata attraverso 4 passaggi principali.

Tabella 8.1: Soluzione di Hutner

	PM [g/mol]	Conc 1000x [mM]	[g/l]	H ₂ O [mL]
Soluzione 1				850
Na ₂ -EDTA	372.24	134	50	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.5	76.5	22	
H ₃ BO ₃	61.83	184	11.4	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	197.91	25.6	5.06	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	237.93	6.8	1.61	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.9	6.2	1.50	
KOH	56.1	303	17.0	
Soluzione 2				100
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.7	6.3	1.57	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278.01	20	5.6	
H₂O da aggiungere				50

- Pesare tutti gli ingredienti della soluzione 1 in un becher da 1 litro e aggiungere 850 ml di H₂O distillata (evitare acqua fredda). Mescolare fino a quando tutto è dissolto (~ 15 min). La soluzione diventa rosso-marrone. Il pH deve essere compreso tra 7,5 e 8 in quanto ZnSO₄ non si dissolve completamente a un pH < 7.
- Dissolvere completamente gli ingredienti della soluzione 2 in 100 ml di H₂O e aggiungerli alla soluzione 1. CuSO₄ e FeSO₄ devono essere dissolti separatamente poiché non sono molto solubili a pH > 7.

L'EDTA con la sua azione chelante favorisce l'assenza di metalli sotto forma di precipitato. La soluzione risultante (trasparente) è inizialmente blu-verde, e poi assume un colore marrone scuro a causa dell'ossidazione di Fe²⁺ → Fe³⁺.

- Aggiungere H₂O per arrivare al volume finale (1 l).
- Conservare a temperatura ambiente in una bottiglia scura, pH finale ~ 6,5-7,5.

Appendice 2: Medium Zarrouk

Dopo aver verificato la presenza di tutti i prodotti nel laboratorio, essi devono essere pesati (Tabella 8.2) e messi in un becher.

Tabella 8.2: Medium Zarrouk

medium Zarrouk (ZM)	[g/l]	PM [g/mol]	[mmol/l]
NaHCO ₃	16,8	84,01	199,98
NaCl	1,00	58,44	17,11
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,22	246,47	0,88
FeSO ₄ ·7H ₂ O (già nella soluzione di Hutner)	0,005	278,01	0,019
FeNa-EDTA	0,007	367,05	0,019
K ₂ SO ₄	1,00	174,26	5,74
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,04	147,01	0,27
NaNO ₃	2,50	84,99	29,41
K ₂ HPO ₄	0,50	174,18	2,87
Solution de Hutner	1 ml		

Una volta che tutte le sostanze chimiche sono state aggiunte al becher, è necessario introdurre l'acqua distillata e la soluzione di Hutner per arrivare al volume finale di 1 l. L'acqua viene utilizzata per dissolvere le sostanze chimiche.

I prodotti vengono accuratamente miscelati con un agitatore magnetico. Il pH misurato dopo la miscelazione deve essere ~ 8,3. Questo valore dipende dalla presenza di NaHCO₃. Se il pH è diverso, si ripete la preparazione del medium. Il terreno di coltura ottenuto può essere subito utilizzato o conservato.

Per effettuare delle diluizioni, si aggiunge al medium acqua distillata. A seconda del fattore di diluizione desiderato ($F_d = 1, 2, 2.94, 5$) sono stati ottenuti rispettivamente: $ZM_{100\%}$, $ZM_{50\%}$, $ZM_{34\%}$, $ZM_{20\%}$.

Appendice 3: Linee di correlazione

La linea di calibrazione (Figura 8.1) è stata trovata utilizzando una sonda PAR di riferimento che, posta nella stessa posizione della sonda principale, mi fornisce i valori della PAR in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

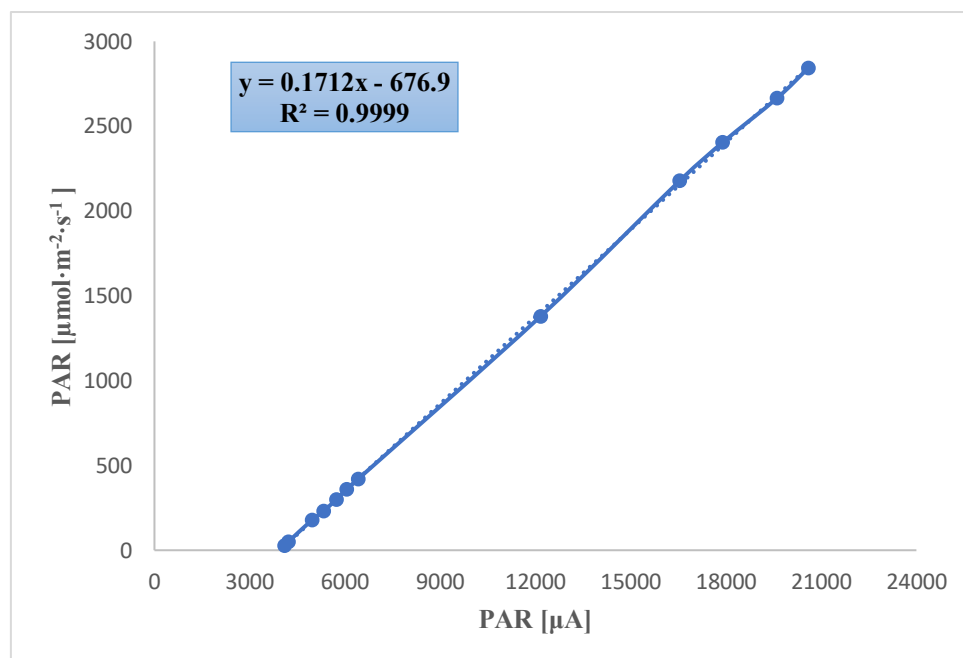


Figura 8.1: Linea di calibrazione per convertire i valori della PAR da μA in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

La curva di correlazione PAR-concentrazione di colorante (Figura 8.2) è stata trovata misurando, con la sonda di riferimento, i valori della PAR quando un fascio di luce proveniente da una lampada LED attraversa un liquido contenente colorante, a diverse concentrazioni.

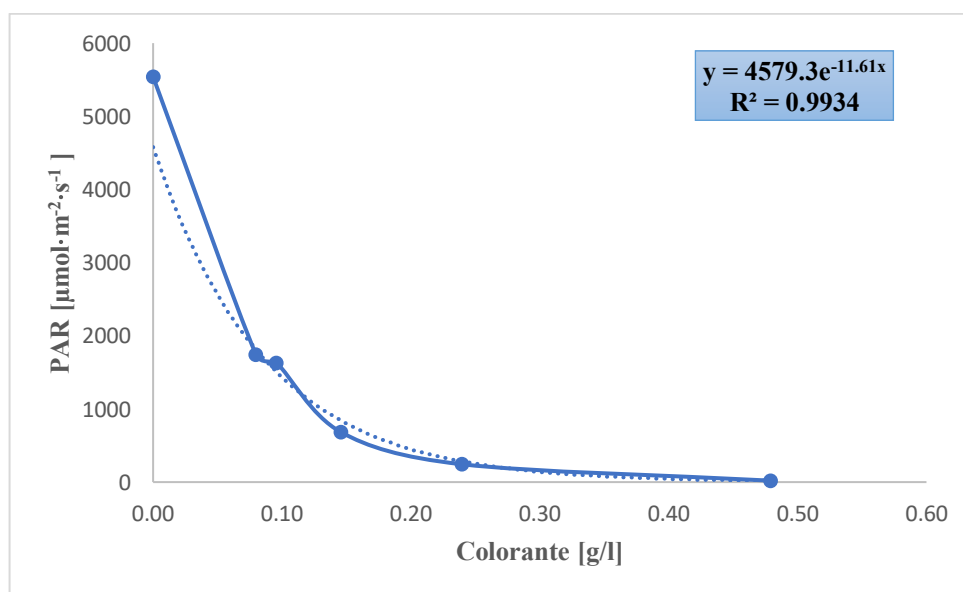


Figura 8.2: Correlazione tra PAR e colorante

Appendice 4: Sistema carrousel

Il sistema permette il movimento dei Nénuphar attraverso delle dita flessibili collegate a bracci rotanti (Figure 8.3, 8.4, 8.5). È collegato ad un motore e può essere azionato attraverso un *timer*. È possibile variare la velocità della giostra e la profondità delle dita nella vasca pilota.

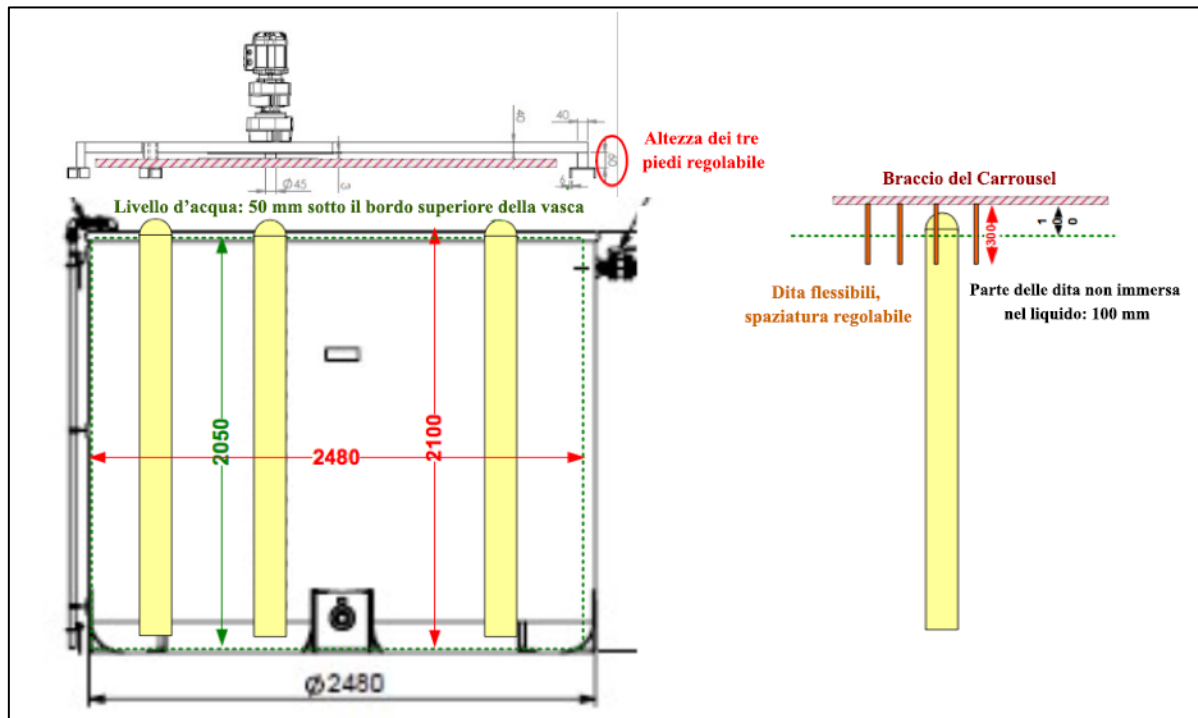


Figura 8.3: Schema del dispositivo “carrousel” montato sulla vasca pilota, misure in millimetri

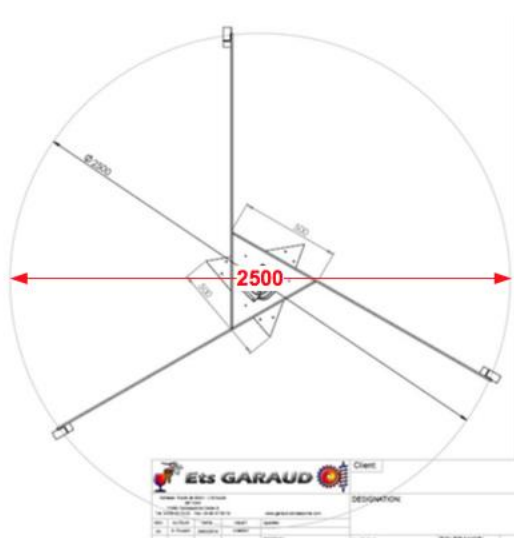


Figura 8.4: Pianta del dispositivo “carrousel”



Figura 8.5: Foto del dispositivo “carrousel” montato sulla vasca pilota

Appendice 5: Sistema di agitazione della vasca pilota

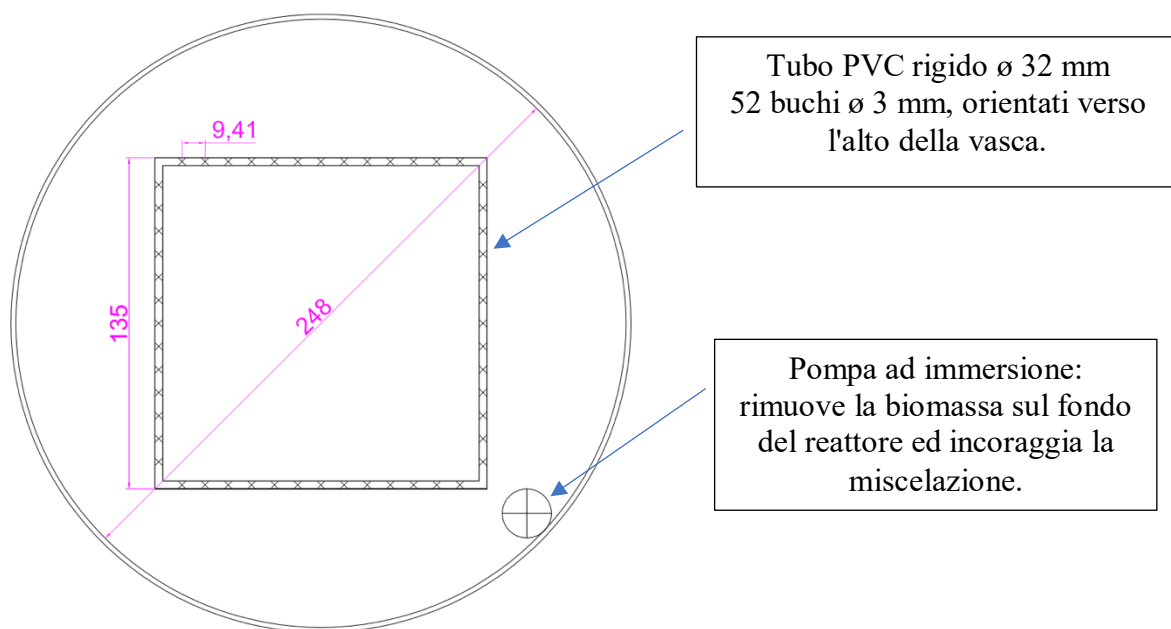


Figura 8.6: Sistema di agitazione utilizzato nel 1° *batch* di coltura, misure in centimetri.

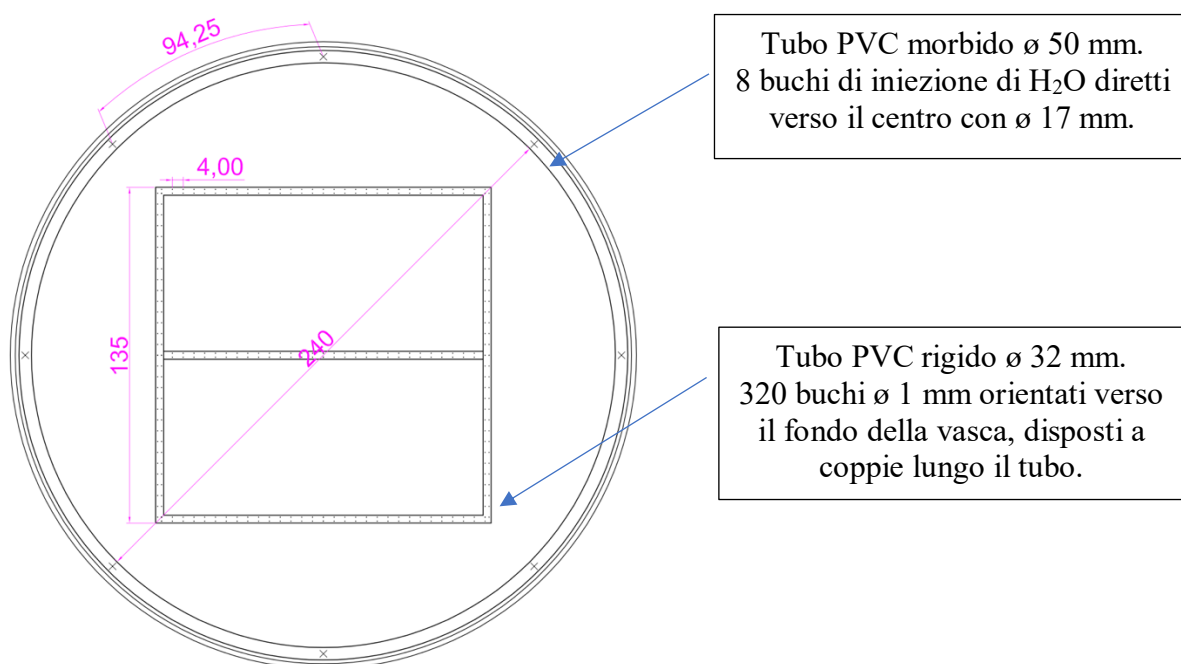


Figura 8.7: Sistema di agitazione utilizzato nel 2° *batch* di coltura, misure in centimetri.

Appendice 6: Correlazione tra DO_{thermo} e DO_{tecan}

La densità ottica delle colture in micropiastre (DO_{tecan}) è stata misurata con uno spettrofotometro *Infinite Nanoquant M200* (Tecan®), questo valore non è equivalente a quello misurato con lo spettrofotometro *FT-IR Nicolet™ iS™5* di Thermo Scientific™ (DO_{thermo}).

In questi due dispositivi la luce arriva da direzioni diverse e la forma della cuvetta non è la stessa. È stato quindi interessante capire qual è la relazione tra i due valori misurati. Pertanto, abbiamo confrontato le densità ottiche misurate dai due spettrofotometri alla stessa lunghezza d'onda, utilizzando le colture del *raceway*, del PBR tubolare e delle beute da 5 l (Figura 8.8).

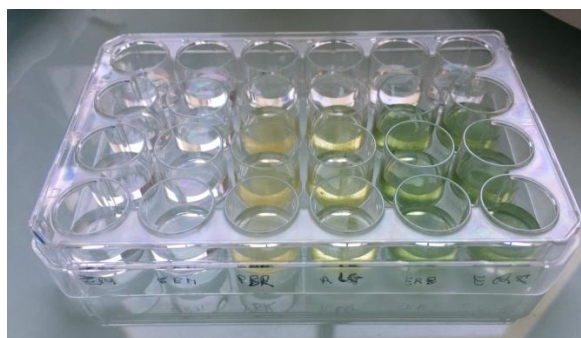


Figura 8.8: Micropiastre con diverse colture di microalghe per la misura della DO_{tecan}

Il rapporto $\frac{DO_{tecan}}{DO_{thermo}}$ è di circa 0,34 in tutti i casi analizzati. Ciò conferma che la relazione tra le due densità ottiche è indipendente dal terreno di coltura e dall'inoculo introdotto, ma dipende solo dal macchinario utilizzato.

Per trovare una correlazione unica tra la densità ottica (DO_{tecan}), misurata con lo spettrofotometro *Infinite Nanoquant M200* (Tecan®), ed i solidi totali sospesi (TSS), è necessario preparare delle colture in beute, nelle stesse condizioni di crescita delle nostre colture in micropiastre.

Vengono così misurate contemporaneamente la DO_{thermo} delle colture in beute ed i solidi totali sospesi (TSS). Sapendo che, il rapporto tra DO_{tecan} e DO_{thermo} è pari a 0,34, è possibile ricavare la DO_{tecan} e costruire un grafico TSS- DO_{tecan} . Attraverso quest'ultimo si ottiene un fattore moltiplicativo pari a 1,9249 che collega la DO_{tecan} ($\lambda = 750$) ai g/l di solidi totali sospesi. Esso viene utilizzato per ricavare le curve di crescita TSS-tempo di tutte le prove sperimentali eseguite in micropiastre.

Appendice 7: pH

pH iniziale e finale all'interno delle micropiastre (Figura 8.9).

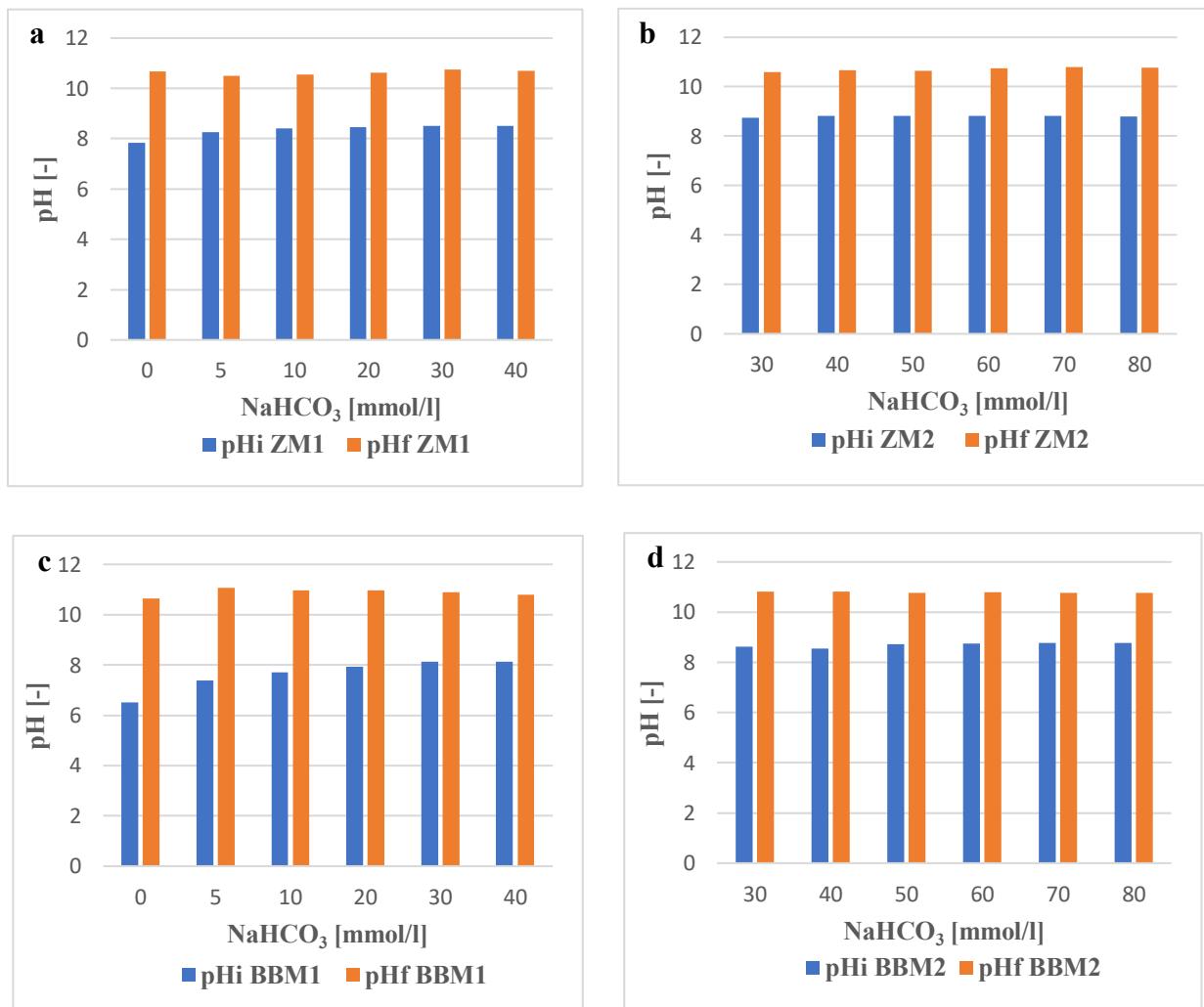


Figura 8.9: Controllo del pH nelle micropiastre: ZM 1° prova (a); ZM 2° prova (b); BBM 1° prova (c); BBM 2° prova (d)

Appendice 8: $ZM_{\text{modificato}}$ e $BBM_{\text{modificato}}$

Tabella 8.3: BBM validato con i test in micropiastre

BBM	[mmol/l]	[g/l]
NaHCO ₃	40	3,36
NaCl	0,428	0,025
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,304	0,075
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,17	0,025
NaNO ₃	10	0,85
K ₂ HPO ₄	0,25	0,044
KH ₂ PO ₄	0,75	0,102
Solution de Hutner	1	

Tabella 8.4: ZM validato con i test in micropiastre

ZM	[mmol/l]	[g/l]
NaHCO ₃	40	3,36
NaCl	0,428	0,025
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2978	0,0734
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,17	0,025
NaNO ₃	10,0006	0,85
K ₂ HPO ₄	0,976	0,17
FeNa-EDTA	0,0065	0,0024
K ₂ SO ₄	1,9511	0,34
Solution de Hutner	1	