

# 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

## **Criteria e modelli per lo studio di fotobioreattori avanzati**



### **Relatori**

prof. Samir Bensaid  
prof.ssa Valentina Busini  
prof. Raffaele Pirone  
prof. Guido Saracco

### **Candidato**

Manuel Innocenti

Marzo 2018



A chi ha creduto in me,  
in tutti questi anni.



# Indice

<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
1.1 BIOPROCESSI.....	1
1.1.1 <i>Definizione</i> .....	1
1.1.2 <i>Bioreattori</i> .....	2
1.1.3 <i>Applicazioni</i> .....	3
1.2 FOTOBIOPROCESSI .....	4
1.2.1 <i>Trattamento della CO<sub>2</sub></i> .....	4
1.2.2 <i>Fotobioreattori</i> .....	5
1.3 CIANOBATTERI .....	9
1.3.1 <i>Definizione</i> .....	9
1.3.2 <i>Requisiti ambientali e nutrizionali</i> .....	10
1.3.3 <i>Fotosintesi</i> .....	11
1.3.4 <i>Synechocystis</i> .....	13
1.3.5 <i>Sviluppi futuri</i> .....	15
1.4 LAVORO E STRUTTURA GENERALE .....	16
<b>2. ATTIVITÀ SPERIMENTALE .....</b>	<b>17</b>
2.1 APPARATO SPERIMENTALE.....	17
2.1.1 <i>Struttura principale</i> .....	17
2.1.2 <i>Vessel di coltivazione</i> .....	19
2.1.3 <i>Umidificatore</i> .....	20
2.1.4 <i>Sistema di miscelazione dei gas</i> .....	21
2.1.5 <i>Stirrer magnetico</i> .....	22
2.1.6 <i>Pompa peristaltica</i> .....	22
2.1.7 <i>pH-metro/Sonda di temperatura</i> .....	23
2.1.8 <i>Sonda per O<sub>2</sub></i> .....	23
2.1.9 <i>Apparecchiature ausiliarie</i> .....	24
2.2 PROCEDURA SPERIMENTALE.....	24
2.2.1 <i>Ceppo batterico e fasi precolturali</i> .....	24
2.2.2 <i>Coltura nel fotobioreattore</i> .....	26
2.2.3 <i>Misurazioni del peso secco, delle dimensioni cellulari e del numero di cellule</i> .....	27
2.2.4 <i>Estrazione dei pigmenti</i> .....	27
<b>3. MODELLAZIONE E SIMULAZIONE .....</b>	<b>29</b>
3.1 STRUTTURA MATEMATICA .....	29
3.1.1 <i>Trasporto di materia</i> .....	29
3.1.2 <i>Fluidodinamica</i> .....	30
3.1.3 <i>Trasporto di energia</i> .....	34
3.1.4 <i>Reazioni chimiche</i> .....	38
3.2 PIATTAFORMA COMSOL® .....	39
3.3 STRUTTURA DEL MODELLO.....	41
3.3.1 <i>Definizioni globali - Parametri</i> .....	41
3.3.2 <i>Componente – Definizioni</i> .....	42
3.3.3 <i>Componente – Geometria</i> .....	43
3.3.4 <i>Componente – Materiali</i> .....	46
3.3.5 <i>Componente – Modello di miscela</i> .....	47
3.3.6 <i>Componente – Trasporto di specie diluite</i> .....	49
3.3.7 <i>Componente – Trasmissione del calore con irraggiamento nei mezzi partecipanti</i> .....	52
3.3.8 <i>Componente – Ingegneria delle reazioni chimiche</i> .....	54
3.3.9 <i>Componente – Chimica</i> .....	55
3.3.10 <i>Componente – Mesh</i> .....	57
3.3.11 <i>Studio</i> .....	59

<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>61</b>
4.1 DESCRIZIONE E ANALISI DEI RISULTATI SPERIMENTALI.....	61
4.1.1 <i>Tasso di crescita e produzione di ossigeno</i> .....	61
4.1.2 <i>Dimensioni cellulari e peso secco</i> .....	64
4.1.3 <i>Concentrazione di clorofilla a e carotenoidi</i> .....	67
4.2 DESCRIZIONE E ANALISI DEI RISULTATI DEL MODELLO .....	69
4.2.1 <i>Convalida del modello</i> .....	69
4.2.2 <i>Analisi degli andamenti delle variabili di interesse</i> .....	70
4.2.3 <i>Analisi di sensibilità – Intensità irraggiata</i> .....	79
<b>5. CONCLUSIONI</b> .....	<b>83</b>
<b>6. LISTA DEI SIMBOLI</b> .....	<b>85</b>
<b>7. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b> .....	<b>89</b>
<b>8. RINGRAZIAMENTI</b> .....	<b>95</b>

# 1. Introduzione

## 1.1 Bioprocessi

### 1.1.1 Definizione

L'impiego di processi biologici, o bioprocessi, per ottenere dei prodotti di più alto valore aggiunto è presente nella storia dell'uomo fin dalle epoche più antiche. Tuttavia tutte le conoscenze derivate e connesse a questo ambito di ricerca, dalle biotecnologie, alla biochimica, alla bioreattoristica, si sono sviluppate solamente nell'ultimo secolo. In precedenza, infatti, i bioprocessi venivano impiegati senza che vi fosse una conoscenza anche solo superficiale dei meccanismi di funzionamento e le informazioni e le azioni da intraprendere erano unicamente legate all'esperienza. Molteplici sono gli esempi di questi processi già utilizzati nell'antichità, ma due in particolare possono essere citati: la panificazione e la vinificazione. Nel primo caso, si era scoperto che, aggiungendo del lievito tra gli ingredienti del pane e infornando l'impasto, si otteneva una crescita dello stesso a formare una pagnotta. La spiegazione di questo fenomeno giunge molto dopo e asserisce che esso sia dovuto all'intrappolamento da parte dell'impasto dell'anidride carbonica liberata dal lievito quando è in forno. Con la vinificazione, invece, si verificava la trasformazione del succo d'uva in vino e questo veniva successivamente selezionato su base sensoriale, per soddisfare le esigenze dei fruitori. In seguito si è individuato il processo di fermentazione e come questo fosse attuato da microrganismi contenuti nel mosto d'uva (Cooney, 1983; Schaechter, 2009).

Questi sono solo alcuni degli esempi più antichi e ancora oggi utilizzati, ma molti altri ne sono stati aggiunti, fino a interessare i più svariati campi di applicazione. Diviene, quindi, necessario fornire una definizione del termine "bioprocesso" per permettere di individuare quello a cui esso si riferisce: il bioprocesso rappresenta un sistema "in cui intere cellule viventi o loro componenti (per esempio enzimi, cloroplasti, ecc.) sono usati per attuare desiderate trasformazioni fisiche o chimiche" (United States Congress Office of Technology Assessment, 1984).

L'utilizzo di strutture biologiche per ottenere determinati prodotti si sovrappone tipicamente ai processi chimici più tradizionali e quindi deve presentare elementi particolarmente performanti per potere competere con essi e potenzialmente sostituirli. I vantaggi nel servirsi di un bioprocesso rispetto a uno tradizionale sono molteplici e in particolare coinvolgono (Dutta, 2008):

- Condizioni di reazione più blande, con valori di temperatura, pH e pressione facilmente riscontrabili in natura; questo determina una maggiore sicurezza dei processi.
- Specificità nelle reazioni, determinata in particolare dagli enzimi che spesso catalizzano una sola reazione.
- Efficacia maggiore, perché gli enzimi presentano un'attività notevolmente più elevata rispetto ai catalizzatori inorganici.
- Uso di fonti rinnovabili, perché il substrato è molto spesso rappresentato da biomassa.
- Possibilità di modificare in modo mirato le biostrutture utilizzate, tramite tecnologie quali quella del DNA ricombinante.

Tuttavia, sono presenti anche degli svantaggi che non vanno trascurati, quali:

- Miscele complesse di prodotti, dovute in particolare ai processi cellulari in cui le reazioni che avvengono sono spesso molteplici; questo determina una coesistenza in uscita di massa cellulare, reagenti residui e metaboliti.
- Ambienti di reazione molto diluiti con acqua, che determinano difficoltà nel recupero del prodotto desiderato a valle del processo.
- Problemi di contaminazione, ad opera di batteri o muffe presenti nell'ambiente circostante.

- Variabilità, a cui cellule ed enzimi possono andare incontro, perdendo potenzialmente anche le caratteristiche necessarie alla realizzazione del processo.

### 1.1.2 Bioreattori

I processi biologici descritti in precedenza necessitano di un ambiente, costituito dal bioreattore, che la IUPAC definisce come “l’apparato usato per realizzare ogni tipo di bioprocesso” (McNaught and Wilkinson, 1997).

I tipi di bioreattore e le modalità di classificazione sono molteplici, in quanto le caratteristiche richieste con i singoli processi presentano elementi sempre differenti. Tuttavia due modalità di classificazione sono tra quelle più note e comunemente diffuse: le condizioni ambientali, aerobiche (con ossigeno), anaerobiche (in assenza di ossigeno) o microaerobiche; la modalità di esercizio, in *batch*, in *fed-batch* o in continuo (Schaechter, 2009; Verga and Pilone, 2001). La modalità *batch* prevede che tutti i nutrienti richiesti per la crescita delle cellule e la formazione dei prodotti siano caricati nel *medium* all’inizio del processo. La modalità in continuo, invece, si ottiene quando il reattore viene addizionato continuamente dei nutrienti necessari e contemporaneamente ne viene estratto il contenuto. La modalità *fed-batch*, infine, rappresenta una conformazione intermedia tra le due precedenti e prevede un’aggiunta progressiva, a un reattore altrimenti *batch*, di uno o più nutrienti dopo l’inizio del processo.

È opportuno citare ulteriormente alcuni reattori, che appartengono a talune categorie già presentate in precedenza. In particolare, il primo gruppo riguarda i reattori ad agitazione meccanica, le colonne con movimentazione ad aria, le colonne a bolle e i reattori a membrana, che hanno inizialmente risposto al problema dell’approvvigionamento dell’ossigeno, ma sono poi stati impiegati anche in altre applicazioni diverse dal mero reattore aerobico. Il secondo, invece, riguarda i reattori in continuo che possono presentarsi in modalità *chemostat*, *turbidostat*, *nutristat* e *pH-auxostat*. La modalità *chemostat* prevede l’assenza di un sistema di controllo in retroazione, richiedendo una continua alimentazione dei nutrienti e la simultanea rimozione del brodo, con pari portata. La *turbidostat*, invece, monitora la torbidità del sistema e, con un sistema *feedback*, assicura una concentrazione stabile delle cellule, modificando l’alimentazione dei nutrienti. La *nutristat*, differentemente, è tesa a mantenere costante la concentrazione dei nutrienti, sempre avvalendosi di un sistema *feedback*. La *pH-auxostat*, infine, ricerca un valore di pH costante, anch’essa con un sistema in retroazione (Vogel and Todaro, 2014).

Infine, per concludere la classificazione dei bioreattori, è importante citarne ancora una tipologia, che è costituita dal fotobioreattore. Questo reattore, che verrà analizzato nel dettaglio successivamente, impiega come fonte di energia la luce e si avvale di microrganismi fototrofi, che riescono a utilizzare appunto l’energia tratta dalla luce per i propri processi.

I reattori fin qui presentati, e i bioreattori in generale, coinvolgono spesso materia vivente, come già affermato, e questa caratteristica determina la necessità di prestare particolare attenzione alle condizioni in cui le cellule si trovano a crescere, vivere e riprodursi (Dutta, 2008). In primo luogo bisogna assicurare il corretto apporto di nutrienti ed energia, in particolare rappresentati da:

- Energia radiante (sfruttata dagli organismi fototrofi, già citati) o energia chimica (sfruttata dagli organismi chemiotrofi, che la derivano dalla demolizione di particolari molecole).
- Sorgenti di carbonio (gli organismi autotrofi sono in grado di generarle a partire da carbonio inorganico, ad esempio CO<sub>2</sub>, mentre gli eterotrofi devono trarle dall’esterno, ad esempio sotto forma di glucosio); il carbonio rappresenta una buona frazione del contenuto secco di un batterio.
- Sorgenti di azoto (elemento ricavabile direttamente dall’azoto molecolare per gli organismi azotofissatori, ma più spesso ottenibile unicamente da forme più complesse quali i nitrati).
- Sorgenti di zolfo e fosforo (anche in questo caso sono generalmente costituite da solfati e fosfati e non dagli elementi puri).
- Sorgenti di elementi metallici, quali sodio, potassio, calcio, magnesio, ferro e zinco.
- Sorgenti di vitamine.

In secondo luogo, è molto importante regolare alcune condizioni che sono prettamente fisiche:

- Temperatura, che influenza pesantemente la crescita delle cellule, impedendo loro di svilupparsi e rischiando di portarle alla morte: sono presenti organismi che vivono nelle condizioni più svariate, venendo classificati sotto il nome di psicrofili, che resistono alle basse temperature, mesofili, che vivono in condizioni intermedie, e termofili, che sopportano le alte temperature; è molto importante avere un ceppo adatto a seconda del tipo di processo che si vuole realizzare.
- Ambiente gassoso, di cui tendenzialmente l'ossigeno è l'elemento critico, in quanto alcuni organismi non possono sopravvivere senza e altri, qualora si trovino in sua presenza: sulla base, appunto, della risposta all'ossigeno, si hanno organismi aerobici (che vivono solo con ossigeno), anaerobici (che vivono solo in assenza di ossigeno), anaerobici facoltativi (sopravvivono con o senza ossigeno), microaerofili (sopportano piccoli quantitativi di ossigeno).
- pH, che condiziona la crescita cellulare. I valori più tipici si collocano nell'intervallo 6,5-7,5, nonostante anche in questo caso esistano organismi che possono sopravvivere in condizioni più estreme.

### 1.1.3 Applicazioni

I bioprocessi vengono impiegati in ambiti molto differenti e per le più svariate applicazioni, le quali ormai superano ampiamente i confini degli impieghi più tradizionali, come la preparazione del cibo, la produzione di bevande alcoliche e di derivati del latte.

Una delle prime applicazioni tra quelle non tradizionali avviene nell'ambito farmaceutico. Questo settore richiede particolari attenzioni alla qualità del prodotto e le normative sono molto stringenti, in quanto è l'uomo stesso a fruire direttamente dei farmaci sintetizzati. Questi ultimi presentano spesso una struttura molto complessa, difficile da ottenere per via chimica tradizionale, mentre l'approccio biochimico risulta decisamente più performante, in quanto enzimi o cellule sono già in parte predisposti e forniti delle strutture necessarie per dotare le sostanze farmaceutiche della loro forma finale desiderata. Tra i prodotti più importanti di questo tipo di applicazione, vi sono gli antibiotici, gli antigeni, l'ormone della crescita umano e i vaccini.

Una seconda applicazione è costituita dai settori dell'allevamento e dell'agricoltura. Nel primo caso si ha una parte dedicata a prodotti simili a quelli farmaceutici umani, ovvero vaccini e promotori della crescita, in particolare per gli animali domestici, e una parte finalizzata alla produzione di cibo animale dalle caratteristiche particolari. Nel secondo caso, invece, si spazia dalla produzione di fertilizzanti e altri additivi necessari alla coltivazione, alla realizzazione di vegetali con caratteristiche particolari, quali una resistenza migliore a pesticidi e erbicidi, o un'aumentata capacità di fotosintesi.

Una terza applicazione è rappresentata dai prodotti chimici e dagli additivi alimentari, che spesso sono intermedi o prodotti nel ciclo di vita di una cellula e quindi possono essere estratti. In aggiunta a questo, la loro produzione può essere aumentata, assumendo particolari accorgimenti e generalmente introducendo modificazioni all'interno della cellula stessa. Inoltre, alcune strutture particolarmente complesse, quali gli enzimi, possono essere realizzate solo tramite bioprocesso. Tra i possibili prodotti, comunque, vi sono anche biopolimeri, vitamine, acido acetico, etanolo e acido lattico.

Una quarta applicazione riguarda l'ambito ambientale e, in particolare, processi che sono tesi alla riduzione e rimozione delle sostanze inquinanti. Tra di essi spiccano il trattamento dei reflui civili e industriali, in cui i reattori biologici sono pesantemente impiegati, e la degradazione di rifiuti tossici. Tuttavia, anche l'*enhanced oil recovery* può richiedere l'uso di bioprocessi.

Un'ultima applicazione molto recente, infine, è impersonata dalla bioelettronica, con la produzione di *biochip* e biosensori. Questi ultimi possono, ad esempio, sfruttare enzimi per rivelare la presenza di particolari sostanze (Dutta, 2008; United States Congress Office of Technology Assessment, 1984).

## 1.2 Fotobioprocessi

### 1.2.1 Trattamento della CO<sub>2</sub>

L'effetto serra è un pressante problema che caratterizza l'epoca moderna, rappresentato dall'innalzamento delle temperature a causa del riscaldamento globale. Questo fenomeno si è manifestato in seguito all'aumento delle emissioni di particolari gas, detti gas serra, che provocano l'impossibilità per le radiazioni infrarosse di abbandonare il pianeta. L'effetto serra in sé è un fenomeno positivo, perché senza di esso le temperature del pianeta Terra sarebbero troppo basse per poter permettere l'esistenza della vita. Tuttavia, ultimamente questo effetto è risultato pesantemente accresciuto, non costituendo più solo un beneficio, ma causando anche importanti problemi. Tra i gas serra sono annoverati il metano (CH<sub>4</sub>) e il protossido di azoto (N<sub>2</sub>O), ma il più considerevole è senza ombra di dubbio l'anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), nonostante presenti una più bassa potenzialità nel trattenere il calore, rispetto agli altri gas serra. Il problema della CO<sub>2</sub> è costituito dalle sue concentrazioni maggiori nell'atmosfera, ultimamente innalzate a causa dell'uso massiccio dei combustibili fossili. Essa deriva da elementi naturali, quali oceani, piante, animali e vulcani, ma il suo massiccio incremento è stato determinato dalle attività antropogeniche, quali la produzione di energia elettrica, i trasporti e le industrie, in particolare. L'abbattimento dei livelli di CO<sub>2</sub> diviene oggi, quindi, una sfida e una necessità importante per preservare il pianeta e mantenerlo abitabile. Una via deve certamente tendere ad abbassare la produzione di questo gas serra, ma sicuramente questa soluzione non sarebbe sufficiente, per cui diviene necessario individuare modalità che permettano di rimuovere la CO<sub>2</sub> prodotta. I metodi in questione si ripartiscono in cinque categorie: metodi fisici, metodi chimici, metodi chimico-fisici, metodi biologici e metodi combinati.

I metodi fisici sfruttano un solvente non reattivo per catturare la CO<sub>2</sub> e, di conseguenza, seguono fondamentalmente la legge di Henry. Diviene, quindi, vincolante la pressione parziale del gas e maggiori quantitativi di quest'ultimo richiedono più elevati quantitativi di solvente.

I metodi chimici, invece, coinvolgono l'utilizzo di particolari solventi (es. ammine), che reagiscono con l'anidride carbonica e ne favoriscono il passaggio in soluzione sotto forma di vari composti. Questo approccio è operativo, finché la sostanza attiva resta disponibile in soluzione e non è stata completamente convertita nel catturare il gas. Raggiunta questa condizione, resta un piccolo margine di cattura legato all'assorbimento fisico.

I metodi chimico-fisici, successivamente, presentano un'integrazione dei due precedenti, avvalendosi in parte dell'azione di un solvente reattivo e in parte della mera pressione parziale del gas. È importante evidenziare che i processi precedentemente citati coinvolgono l'assorbimento, tuttavia ne esistono di ulteriori basati sull'adsorbimento chimico o fisico.

I metodi biologici, come aggiunta ulteriore, coinvolgono microrganismi che possono realizzare il processo di fotosintesi, fissando l'anidride carbonica e convertendola in composti organici più complessi, sfruttando l'energia luminosa.

I metodi combinati, infine, sono processi più complessi che si avvalgono delle precedenti soluzioni, integrandole e combinandole, in maniera da aumentare l'efficienza globale di rimozione (Goli et al., 2016; Tola and Cau, 2010).

Ora, concentrandosi in particolare sui metodi biologici, a cui il processo considerato in questa tesi appartiene, è importante presentarne le possibili configurazioni e citare i microrganismi che vengono utilizzati all'interno di essi. La categoria che include le differenti tipologie di microrganismi impiegati è quella delle microalghe. Questo termine viene comunemente utilizzato per includere anche alcuni batteri (correttamente definiti cianobatteri, o impropriamente alghe blu-verdi), tuttavia questo uso è improprio, perché attualmente la dicitura "alga" viene limitata al dominio eucariote, mentre i batteri appartengono al dominio procariote. Le microalghe sono organismi in grado di realizzare la fotosintesi, convertendo "la luce del sole in energia chimica in modo da scindere l'acqua per rilasciare ossigeno e da fissare la CO<sub>2</sub> sotto forma di zuccheri" (Goli et al., 2016). Tra i gruppi appartenenti a questa categoria si osservano, quindi, i cianobatteri, le diatomee, le alghe verdi, i dinoflagellati e le alghe dorate. Le microalghe, tralasciando le loro applicazioni attuate dall'uomo, contribuiscono naturalmente in maniera pesante alla complessiva attività fotosintetica terrestre, ricoprendo dal 30 al 50% di questa e quindi del

relativo ossigeno prodotto. Esse presentano notevoli vantaggi, degni di nota anche per applicazioni industriali, i quali includono: elevate velocità di crescita, capacità di prosperare in ambienti particolarmente ricchi di nutrienti, abilità di fissazione della CO<sub>2</sub>, capacità di crescita in ambienti caldi e salati (condizioni difficili), possibilità di coltivazione in aree marginali, formazione di biomassa omogenea. Necessariamente presentano anche alcuni svantaggi, tra i quali è possibile citare i problemi legati alle eventuali contaminazioni della coltura e la necessità di avere raccolti limitati nel tempo e nello spazio (Barbato et al., 2012).

Considerando, invece, le possibili configurazioni dei metodi biologici, essi possono essere divisi in due gruppi generali: sistemi aperti e sistemi chiusi. I primi coinvolgono sistemi naturali quali stagni e laghi, o sistemi artificiali come stagni artificiali e recipienti, mentre i secondi sono rappresentati principalmente dai fotobioreattori.

I sistemi aperti sono quanto di più simile esista agli ambienti naturali di vita delle microalghe e ne permettono una buona proliferazione, tuttavia, dal punto di vista della produttività, presentano alcune problematiche molto difficili da ovviare. In primo luogo, la proliferazione stessa può determinare una crescita indesiderata di biomassa, in quanto il controllo risulta essere molto difficoltoso e lento. Inoltre, l'esposizione diretta all'atmosfera e all'ambiente esterno sottopone la biomassa selezionata a contaminazioni e mutazioni molto probabili, le quali presto determinano una perdita delle caratteristiche finali desiderate, che gli organismi dovrebbero avere, e rischiano di rendere inutilizzabile la biomassa prodotta, a causa della presenza di strutture estranee. In aggiunta a questo, il problema della quantità di CO<sub>2</sub> non è da trascurare, in quanto i sistemi aperti presentano una perdita importante di questo gas in atmosfera, avendo la superficie del liquido direttamente aperta verso l'esterno. Tuttavia anche le difficoltà di concentrare il gas sono importanti, in quanto le masse di liquido sono molto elevate e, senza un sistema artificiale di flussaggio, la concentrazione resta determinata dalla bassa pressione parziale della CO<sub>2</sub> in atmosfera. Un'ultima problematica legata a questi sistemi è la difficoltà nel poter riprodurre esattamente le condizioni di coltura, in quanto, come già affermato, il controllo risulta abbastanza difficoltoso. Tuttavia, questi sistemi restano la via più economica per produrre biomassa in ingenti quantità e, soprattutto, risultando più vicini all'ambiente naturale, offrono una capacità di sequestrare CO<sub>2</sub> molto più elevata (Goli et al., 2016; Pulz, 2001; Tsai et al., 2016).

I sistemi chiusi, invece, identificabili sostanzialmente con i fotobioreattori, sono stati proposti per ovviare agli elementi negativi propri dei sistemi aperti, i primi ad essere stati utilizzati. La differenza principale rispetto alla tipologia precedente è determinata dall'assenza dell'esposizione diretta all'atmosfera da parte del brodo di reazione e, con essa, dalle dimensioni più ridotte. Questo determina tutta una serie di caratteristiche positive che spaziano dalle minori perdite di CO<sub>2</sub>, con la possibilità di averla in maggiori concentrazioni, alle più ridotte probabilità di contaminazione e mutazione. Inoltre, i fotobioreattori permettono di avere condizioni di coltivazione riproducibili e soprattutto un sistema di controllo e di regolazione molto più efficace, per quanto riguarda in particolare la fluidodinamica e la temperatura. Un ulteriore elemento importante inerente il fotobioreattore è quello legato all'energia luminosa, che risulta meglio distribuita e con aree esposte più ampie. Infine, è interessante sottolineare come la possibilità di avere condizioni molto più facilmente controllabili permetta di ottenere dei prodotti microalgali a più alto valore aggiunto e destinati a settori con normative di qualità più rigide (es. campo farmaceutico) (Goli et al., 2016; Pulz, 2001).

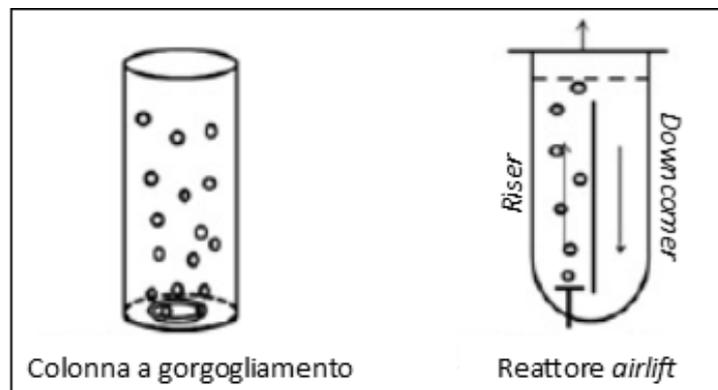
Diviene ora necessario affrontare nel dettaglio i fotobioreattori, fornendone una classificazione.

### 1.2.2 Fotobioreattori

I fotobioreattori, come già affermato in precedenza, sono dei sistemi chiusi caratterizzati dalla presenza di una miscela contenente organismi fototrofi (microalghe), che sfruttano l'energia luminosa solare o artificiale per realizzare il processo di fotosintesi e, quindi, di cattura della CO<sub>2</sub>. Diverse conformazioni, con specifiche caratteristiche, sono attualmente disponibili e in particolare si declinano in: fotobioreattori tubolari verticali (a colonna con gorgogliamento del gas o del tipo *airlift*), fotobioreattori a pannello, fotobioreattori tubolari orizzontali, fotobioreattori elicoidali, fotobioreattori agitati e fotobioreattori ibridi. Un elemento importante da considerare in ognuno di questi casi è costituito dalla

necessità di avere un elevato trasporto di materia per quanto concerne l'anidride carbonica. Essa, infatti, deve trasferirsi in soluzione, diffondere all'interno della cellula e, successivamente, subire i processi di trasformazione. Tutto questo, se il trasporto di materia è lento, può influenzare in maniera particolarmente negativa la resa di conversione del reattore.

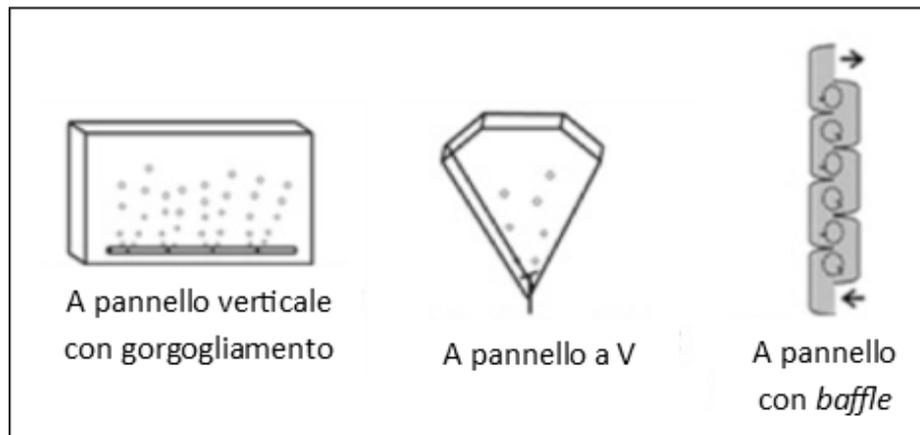
La prima tipologia, quella dei fotobioreattori tubolari verticali, è costituita da serbatoi verticali trasparenti che permettono il passaggio della luce. Uno sparger è presente sul fondo della struttura e ricopre la funzione di disperdere il gas sotto forma di bolle all'interno della miscela; inoltre, con le bolle generate, permette la miscelazione, la dispersione della CO<sub>2</sub> e anche la rimozione dell'ossigeno prodotto. Questi reattori si possono presentare sotto forma di colonna con gorgogliamento del gas o sotto forma di reattore *airlift*, schematizzati in figura (1.1). Il primo gruppo è costituito da serbatoi verticali in cui l'altezza risulta maggiore del doppio del diametro e, tra le caratteristiche positive, si annoverano i bassi costi, un elevato rapporto superficie volume, la mancanza di parti in movimento, un efficiente rimozione di ossigeno e gas residui e un accettabile trasporto di materia e di calore. In questi reattori, la portata del gas influenza in maniera elevata l'efficienza di conversione, in quanto determina il rimescolamento interno e, se questo non è sufficiente, elevate porzioni di miscela non vengono raggiunte dalla luce e conseguentemente non vengono interessate dal processo fotosintetico. Il secondo gruppo, invece, individua delle strutture costituite da due differenti zone connesse tra di loro, di cui una è il *riser* (tubo ascendente) e l'altra è il *downcomer* (tubo discendente). Esse possono presentarsi all'interno della stessa struttura (*internal loop*), separate per via di un boccaglio o di un mezzo cilindro, oppure in due strutture differenti (*external loop*). Nel *riser* viene iniettato il gas sotto forma di bolle e questo permette di sollevare parte della miscela fino alla zona di disimpegno, dove una porzione del gas si separa dalla miscela stessa. La miscela non più sostenuta, poi, discende nel *downcomer*, portando con sé il gas rimasto intrappolato; in questa maniera si determina una movimentazione netta della miscela, fatto che permette di sottoporla a condizioni alternate di luce e ombra (effetto *flash*). Inoltre, la quantità di gas trattenuto deve essere regolata, in quanto condiziona la fluidodinamica in maniera significativa.



**Figura 1.1:** Schematizzazione delle due forme di fotobioreattori tubolari verticali: la colonna a gorgogliamento di gas (sinistra) e il reattore *airlift* con *internal loop* (destra). (Figura tratta da (Dasgupta et al., 2010) con modifiche)

La seconda tipologia, quella dei fotobioreattori a pannello, racchiude delle strutture di materiale trasparente (es. vetro) a forma di parallelepipedo, con una dimensione molto più ampia delle altre due. Questa caratteristica in particolare rende il percorso della luce molto breve, permettendo di migliorare in maniera importante l'efficienza di illuminazione globale del sistema. Inoltre, questi reattori sono caratterizzati da un elevato rapporto superficie volume e da un sistema aperto di disimpegno del gas. L'agitazione della miscela può essere svolta tramite la rotazione meccanica del sistema oppure mediante uno *sparger* che, tramite il gorgogliamento del gas, mantiene in movimento la fase fluida. Molteplici varianti di reattore a pannello sono state proposte, a partire dall'introduzione di *baffle* o dall'adozione di una forma a V (alcuni esempi schematici sono riassunti in figura (1.2)). È, infine, necessario evidenziare che con lo *scale-up* questi sistemi richiedono preferibilmente l'assemblaggio di più elementi

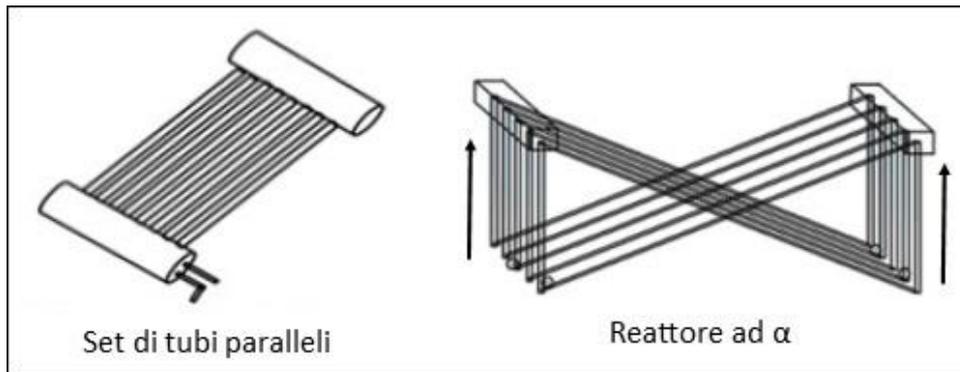
insieme, in quanto il mero aumento delle dimensioni provocherebbe elevate perdite di efficienza; basti pensare al peggioramento delle condizioni di illuminazione, provocate da un incremento dello spessore del reattore.



**Figura 1.2:** Esempi schematici di fotobioreattori a pannello nella forma verticale con gorgogliamento (sinistra), a V (centro) e con *baffle* (destra). (Figura tratta da (Dasgupta et al., 2010) con modifiche)

La terza tipologia, quella dei fotobioreattori tubolari orizzontali, include più gruppi simili tra loro, come quello a set di tubi paralleli, quello a *loop*, quello a forma di  $\alpha$  e quello tubolare prossimo all'orizzontale. Tutti questi offrono una forma che consente un'orientazione più corretta verso la luce del sole e, quindi, per le applicazioni esterne. Tuttavia, problematiche maggiori sono determinate dalla difficoltosa rimozione dell'ossigeno, che può inibire in maniera crescente la fotosintesi, e dalla complessa regolazione della temperatura, che richiede specifiche soluzioni (cospargere i tubi con acqua o immergere il sistema in acqua). Inoltre, sistemi di questo tipo presentano un elevato consumo energetico, in quanto il liquido deve conservare velocità sufficientemente alte da permettere il mantenimento del regime di turbolenza (unica via per garantire la miscelazione interna del sistema). Considerando i differenti gruppi:

- Il set di tubi paralleli (consultare figura (1.3)) è il più semplice, in quanto presenta una serie di tubi uguali uno vicino all'altro e operati nella medesima maniera.
- Quello a *loop* prevede un percorso ciclico tra tubi orizzontali arrangiati in sequenza. Alla fine del ciclo i gas esausti o prodotti vengono recuperati e rimossi.
- Quello tubolare prossimo all'orizzontale presenta una struttura simile al set di tubi paralleli, ma con i tubi leggermente inclinati. Questa conformazione permette una migliore esposizione e, quindi, ricezione della luce solare, ma anche una più efficiente rimozione dell'ossigeno prodotto.
- Quello a forma di  $\alpha$  (consultare figura (1.3)) è composto da tubi disposti in serie parallele e costituenti due triangoli con un vertice in comune. Nei due segmenti verticali, viene insufflato il gas di alimentazione, il quale permette la movimentazione ciclica del liquido con modalità *airlift*.



**Figura 1.3:** Schematizzazione di due tipologie di fotobioreattori tubolari orizzontali: quella a set di tubi paralleli (sinistra), che, laddove siano eserciti in sequenza, può trasformarsi in una tipologia a *loop*, oppure, se inclinati, in un reattore prossimo all'orizzontale; quella con forma a  $\alpha$  (destra), dove le frecce mostrano le sezioni di salita del fluido. (Figura tratta da (Dasgupta et al., 2010) con modifiche)

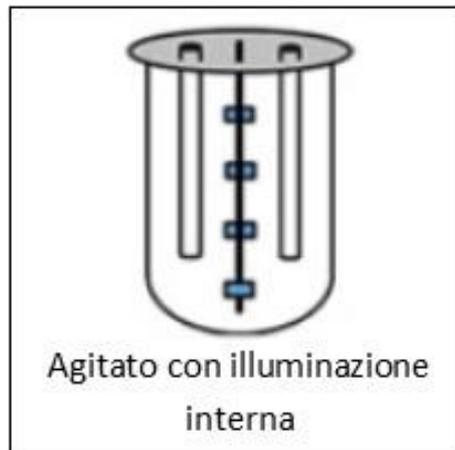
La quarta tipologia, quella dei fotobioreattori elicoidali, è costituita da un tubo trasparente di piccolo diametro attorcigliato a spirale. La configurazione più comune presenta il raggio della spirale con valore costante, tuttavia ne esiste anche una ulteriore con forma conica, in cui il raggio cresce con il crescere dell'altezza (schematizzazioni esemplificative presentate in figura (1.4)). In entrambe le configurazioni, il gas di alimentazione può essere iniettato dall'alto oppure dal basso, anche se quest'ultima modalità restituisce un'efficienza fotosintetica migliore. Inoltre, è necessaria una pompa per mantenere in moto la miscela e la zona di disimpegno, in cui buona parte del gas abbandona il liquido, può presentarsi separata oppure connessa all'elica. I reattori elicoidali offrono un buon trasferimento dell'anidride carbonica dalla fase gassosa a quella liquida, in quanto la zona in cui può avvenire l'assorbimento è particolarmente lunga, se paragonata agli altri fotobioreattori. Tuttavia, si manifestano anche difficoltà non trascurabili, legate al pompaggio, nel caso di *scale-up*, e alle incrostazioni che si depositano sulle pareti interne.



**Figura 1.4:** Esempi di fotobioreattori elicoidali nella configurazione a raggio costante (sinistra) e conica (destra). Entrambe le schematizzazioni presentano il flusso in movimento dal basso verso l'alto, una pompa di movimentazione e una zona di disimpegno esterna. (Figura tratta da (Dasgupta et al., 2010) con modifiche)

La quinta tipologia, quella dei fotobioreattori agitati, prevede un'agitazione interna meccanica tramite una girante, l'uso di *baffle* e il flussaggio del gas di alimentazione dal fondo. Questa tipologia deriva dal tradizionale reattore agitato, a cui è stata aggiunta una sorgente luminosa esterna. Nonostante questo accorgimento, il basso rapporto superficie volume rappresenta un ingente problema, in quanto influenza

negativamente l'assorbimento della luce. Un ulteriore tentativo di miglioramento (schematizzato in figura (1.5)) è stato proposto aggiungendo l'illuminazione artificiale all'interno del reattore, ma, nonostante le modifiche, questa tipologia continua a presentare un uso limitato nell'ambito della cattura della CO<sub>2</sub>.



**Figura 1.5:** Esempio schematico di fotobioreattore agitato con l'aggiunta dell'illuminazione interna artificiale. (Figura tratta da (Dasgupta et al., 2010) con modifiche)

L'ultima tipologia, quella dei fotobioreattori ibridi, rappresenta alcune configurazioni che prevedono la coesistenza di due delle strutture precedentemente citate. In questa maniera, ci si può avvalere delle caratteristiche positive, ovviando a quelle negative. Un esempio è rappresentato dall'integrazione di un *airlift* con un *loop* orizzontale, in cui la prima sezione funge da zona di degassaggio e da regolatore della velocità della miscela, mentre la seconda permette la cattura della luce e il controllo della temperatura.

Quanto presentato nella descrizione delle varie tipologie di fotobioreattore ha già messo in luce alcuni aspetti importanti che devono necessariamente essere considerati per avvalersi di una specifica configurazione reattoristica nell'applicazione della cattura della CO<sub>2</sub> con approccio biologico. In particolare è necessario porre attenzione alla capacità di penetrazione della luce, al rapporto superficie volume, al controllo della temperatura, al tipo di materiale (trasparenza e durabilità) utilizzato, al trasferimento del gas e al sistema di agitazione. Tenendo conto delle varie caratteristiche, sembra che i reattori tubolari verticali, gli elicoidali e quelli a pannello siano i più promettenti per le future applicazioni (Barbato et al., 2012; Dasgupta et al., 2010; Kumar et al., 2011).

## 1.3 Cianobatteri

### 1.3.1 Definizione

I cianobatteri, già citati in precedenza, rappresentano il *phylum* a cui appartiene il microrganismo utilizzato nel lavoro di tesi: il *Synechocystis* sp. PCC 6803. Essi vengono definiti da Garcia-Pichel (Schaechter, 2009) come “un gruppo, monofiletico, antico, morfologicamente vario e ecologicamente molto importante, di batteri fototrofici che realizzano la fotosintesi (equazione (1.1)) simile alle piante, con ossidazione dell'acqua e produzione di ossigeno”.



Essi costituiscono un numero molto elevato di organismi e permeano aree terrestri tra le più diverse; in effetti essi sono ritenuti i principali responsabili della trasformazione dell'atmosfera terrestre da

riducente a ossidante. I cianobatteri presentano cellule a struttura procariotica con il materiale genetico concentrato in una zona del citoplasma detta nucleoplasma o centroplasma, inoltre le cellule sono del tipo Gram-negativo (con doppia membrana cellulare), in quanto non mantengono la colorazione se sottoposte al metodo di Gram. Tuttavia, i cianobatteri costituiscono una particolarità, perché, nonostante appartengano a quella categoria, possono presentare uno spessore di dimensioni considerevoli dello strato di peptidoglicani, responsabili della rigidità della parete cellulare. In aggiunta a questo, sostanzialmente tutti i cianobatteri sono fotoautotrofi, in quanto si producono il carbonio organico necessario, direttamente e solamente dalla CO<sub>2</sub> (questo può comunque essere custodito sotto forma di glicogeno ed essere consumato nei momenti di assenza di luce), e di tipo ossigenico, anche se alcuni di essi possono svolgere la fotosintesi anossigenica, in cui il donatore di elettroni non è costituito dall'ossigeno dell'acqua, ma da acido solfidrico, idrogeno o altri composti organici. Tuttavia, esistono alcuni ceppi in grado di operare in maniera eterotrofa, ovvero di sfruttare zuccheri esterni, in assenza di luce per fissare l'anidride carbonica, e mixotrofa, ovvero di ricavare il carbonio organico necessario, parte dal processo di fotosintesi e parte da zuccheri esterni.

I microrganismi annoverati tra i cianobatteri sono contrassegnati da caratteristiche comunque molto diverse, a partire dalle dimensioni che spaziano dalle poche decine di micron fino alle centinaia. Inoltre, le cellule si possono riscontrare in conformazione unicellulare o sotto forma di colonie, ma soprattutto offrono forme differenti, sferiche, bacilloidi, fusiformi, e alcuni ceppi possono presentare pleiomorfismo (ossia presentano un polimorfismo durante diversi stadi del ciclo vitale). In aggiunta a questo, diversi ceppi possono essersi adattati ad ambienti e condizioni molto variegati ed è la caratteristica di saper crescere, seppur lentamente, in maniera stabile in condizioni ambientali avverse, che rende i cianobatteri così vincenti, piuttosto della loro crescita rapida in condizioni favorevoli. Essi possono presentare ceppi termofili, che vivono fino a temperature di 73°C, alle quali nessun altro organismo riesce a sopravvivere, oppure psicrofili, i quali vivono a temperature che non superano i pochi gradi Celsius (aree polari, rocce e stagni). Nonché microrganismi che si sviluppano in pozze acquose con bassissime concentrazioni di soluti inorganici, oppure altri che sopportano ambienti ricchissimi di sali (alo-tolleranti). Ancora, alcuni prosperano nelle profondità di laghi o mari, dove sono raggiunti da bassissimi quantitativi di luce, e altri resistono ai più alti livelli di radiazione solare, propri di zone tropicali. È, quindi, evidente come i cianobatteri siano molto diffusi sul pianeta Terra, grazie alla loro impressionante capacità di adattarsi alle condizioni più estreme, dove difficilmente troverebbero altri potenziali organismi competitori (Schaechter, 2009).

### 1.3.2 Requisiti ambientali e nutrizionali

Le condizioni richieste da un dato cianobatterio per sopravvivere e, possibilmente, prosperare sono molteplici. In primo luogo vi sono le condizioni ambientali e, in particolare, la temperatura e il pH. È già stato affermato come questi microrganismi possano vivere nelle condizioni più varie, tuttavia ogni ceppo presenta le sue condizioni ottimali e queste devono essere soddisfatte, affinché le cellule possano sopravvivere. Una particolare attenzione, comunque, deve essere rivolta al pH, in quanto sembra essere uno dei fattori maggiormente limitanti la crescita dei cianobatteri, che pure si adattano a molte altre condizioni avverse. In particolare, naturalmente con le dovute differenze, i cianobatteri operano maggiormente nella regione di pH neutro o leggermente basico, e, se questo si abbassa nella regione di acidità, questi microrganismi vedono la propria crescita fortemente rallentata.

Ovviamente i cianobatteri necessitano anche delle materie prime per la fotosintesi, ovvero acqua liquida, luce e anidride carbonica. Quest'ultima permette al batterio, come già affermato, di produrre il materiale organico necessario alla vita, che molto spesso rappresenta una condizione sine qua non, in quanto molti cianobatteri non sono in grado di sfruttare zuccheri esterni. Uno dei motivi principali di questa impossibilità di sfruttare materiale organico esterno sembra risiedere nell'assenza di sistemi di trasporto degli zuccheri.

Il fosforo costituisce un ulteriore elemento nutritivo richiesto, che può rappresentare un limite per la crescita qualora venga ad essere carente; in effetti basti considerare come sia parte costitutiva dell'ATP. Esso viene tipicamente assunto sotto forma di ione fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), o forme simili, e immagazzinato nella cellula come polifosfati.

Anche il ferro rappresenta un nutriente molto importante, seppure ne siano richieste quantità molto basse; esso, infatti, nella forma di ione  $\text{Fe}^{3+}$  è elemento costitutivo di molti enzimi coinvolti nelle reazioni redox cellulari e la sua carenza impedirebbe alla cellula di sintetizzare questi enzimi nella loro forma funzionante. Il ferro costituisce una sostanza problematica da essere assimilata, in quanto la sua solubilità in acqua presenta valori molto bassi, per questo motivo vengono sintetizzati i siderofori, i quali sono dei composti organici con la possibilità di chelare il ferro e portarlo in soluzione.

Un ulteriore nutriente necessario è costituito dallo zolfo. Esso viene assimilato tipicamente sotto forma di ione solfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), ma in sua assenza i cianobatteri possono avvalersi di altre fonti, quali acido solfidrico, tioli organici, solfonati. La destinazione più comune dello zolfo è l'amminoacido cisteina, in cui viene inserito da una particolare sintasi dopo essere stato ridotto dallo ione solfato allo ione solfuro. Tuttavia, i cianobatteri necessitano anche direttamente dello zolfo ossidato, in quanto contengono importanti componenti strutturali che lo richiedono, come i solfolipidi delle membrane fotosintetiche.

L'ultimo nutriente da citare è l'azoto. Esso è fondamentale per i viventi in generale e per i cianobatteri in particolare, di cui rappresenta circa il 10% del peso secco, e viene tipicamente custodito sotto forma di cianoficina, un polimero di riserva esclusivo dei cianobatteri. Le principali sorgenti di azoto per i cianobatteri sono costituite da ioni nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o ioni ammonio ( $\text{NH}_4^+$ ), tuttavia alcune alternative per taluni ceppi possono essere riscontrate nell'urea o in altri composti organici azotati. Inoltre, vi sono cianobatteri che presentano l'abilità di fissazione dell'azoto molecolare tramite la nitrogenasi. Questo è un processo molto dispendioso in termini energetici e, soprattutto, nascono problemi in presenza di ossigeno che disattiva quell'enzima in maniera irreversibile; sono quindi state sviluppate diverse strategie per ovviare al problema da parte dei cianobatteri, quali svolgere la fissazione durante i periodi di oscurità, quando non si genera ossigeno fotosintetico, oppure avere due zone separate per la fotosintesi e la fissazione dell'azoto. Siccome la spesa energetica per la fissazione dell'azoto molecolare è molto pesante, appena sono presenti fonti alternative, questo processo viene interrotto; infatti in presenza di ioni nitrato, questi vengono preferiti e, in presenza di ioni ammonio, anche l'uso di ioni nitrato viene evitato. Questo è determinato dal fatto che, per rendere disponibile l'azoto, gli ioni nitrato devono essere ridotti a ioni nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e successivamente a ioni ammonio e, nel caso quest'ultimo sia già disponibile, diviene inefficiente assimilare i primi. Gli ioni ammonio vengono poi convertiti in glutammato, che rappresenta la sorgente di azoto per il metabolismo centrale. Infine, è importante sottolineare come l'azoto molecolare penetri nella cellula per diffusione, mentre gli ioni nitrato e ammonio prevedano sistemi di trasporto appositi (Schaechter, 2009).

### 1.3.3 Fotosintesi

La fotosintesi realizzata dai cianobatteri ha luogo all'interno dei tilacoidi (strutture a doppia membrana, interne alla cellula) e prevede due fasi, una luminosa e una oscura, la prima in cui avviene l'ossidazione dell'acqua e la produzione di ATP e NADPH e la seconda in cui avviene il fissaggio dell'anidride carbonica.

Nella fase luminosa, entrano in gioco alcune strutture che permettono la captazione della luce, due fotosistemi (enzimi che nei cianobatteri contengono clorofilla *a*) e una serie di proteine che trasportano elettroni e collegano i due fotosistemi. Nella maggior parte dei cianobatteri, i ficobilisomi rappresentano i complessi destinati alla captazione della luce e sono principalmente costituiti da ficobiliproteine che contengono le sostanze cromofore, le cosiddette ficobiline (tetrapirroli a catena aperta). Le più comuni tra queste ficobiline sono l'alloficocianina e la ficocianina di colore blu, nonché la ficoeritrocianina, nuovamente blu, e la ficoeritrina rossa: queste sostanze presentano assorbimento a determinati intervalli di lunghezze d'onda. Ritornando ai ficobilisomi, essi presentano una conformazione con un cuore centrale e con alcuni bracci che si protendono da questo; in entrambe le strutture, le ficobiliproteine a forma di disco sono ordinatamente disposte e i bracci captano la luce per primi, portandola radialmente verso il cuore, mentre questo la trasferisce successivamente a uno dei due fotosistemi. Di questi, il fotosistema II è quello che catalizza il trasferimento degli elettroni dall'acqua con relativa formazione di ossigeno molecolare, inserendoli successivamente in una catena di trasporto elettronico destinata alla generazione di un gradiente elettrochimico di ioni idrogeno. Questo gradiente permette al complesso

ATPasi di generare ATP. Il fotosistema I, invece, presenta come prodotto finale il NADPH, dopo una serie di reazioni che coinvolgono la plastocianina e la ferredoxina.

Nella fase oscura, invece, si assiste alla riduzione dell'anidride carbonica a materia organica tramite il ciclo di Calvin (ciclo riduttivo del pentosio fosfato), a spese di ATP e NADPH, i quali vengono consumati. Questo ciclo anabolico, fondamentale anche per molti degli intermedi prodotti, differisce dalla via catabolica ossidativa del pentosio fosfato per soli due enzimi: la fosforibulosiochinasi (PRK) e la ribulosio-1,5-bifosfato carbossilasi/ossigenasi (RuBisCO). Quest'ultimo enzima, che sembra essere il più diffuso in natura, è il responsabile del primo step del ciclo di Calvin, dove avviene la fissazione della CO<sub>2</sub> con relativa carbossilazione del ribulosio-1,5-bifosfato; i due composti, infatti, costituiscono i reagenti di partenza di RuBisCO. Tuttavia questo enzima presenta una bassa affinità per l'anidride carbonica e può svolgere, invece, l'attività di ossigenasi, come la sua denominazione stessa suggerisce. Questo rappresenta una problematica non da poco, perché significa che in presenza di ossigeno molecolare, RuBisCO non fissa la CO<sub>2</sub>, ma opera come ossigenasi, e per organismi fototrofi come i cianobatteri l'ossigeno non è sicuramente l'ultima delle molecole presenti. Questo enzima, quindi, presenta una bassa specificità per la reazione desiderata, ma anche l'attività catalitica non è delle migliori. Nonostante questo, viene utilizzato e ricopre un ruolo fondamentale, e sembra che si trovi già in una condizione di ottimo, in quanto sono stati realizzati dei tentativi per aumentare la sua specificità o la sua attività, ma si è osservato che migliorando l'una, peggiorava l'altra e viceversa, portando in realtà a una resa peggiore di quella dell'enzima naturale (Nozzi et al., 2013). Trascurando tutte le possibili ingegnerizzazioni dell'enzima, le cellule hanno già individuato delle modalità per ovviare alle problematiche di RuBisCO e possiedono un sistema di concentrazione della CO<sub>2</sub> che assicura dei livelli di questo composto molto più alti all'interno della cellula, rispetto all'esterno, ma soprattutto un'elevata pressione parziale del gas nei pressi dell'enzima, in modo da favorire sempre l'attività di carbossilasi (Rosgaard et al., 2012; Schaechter, 2009).

Considerando, ora, i vari fattori che possono influenzare l'intero processo di fotosintesi e di cattura di CO<sub>2</sub> nel caso dei cianobatteri, se ne individuano molteplici: la temperatura, il pH, la presenza di NO<sub>x</sub> e SO<sub>x</sub>, l'intensità luminosa, il ceppo cianobatterico, la densità cellulare, la concentrazione di CO<sub>2</sub>, l'accumulo di ossigeno molecolare.

La temperatura è un primo elemento da considerare, in quanto, come già affermato precedentemente, un microrganismo riesce a vivere in specifiche condizioni: per esempio, avere alte temperature con un organismo mesofilo ne impedisce lo sviluppo e, quindi, l'attività fotosintetica. Tuttavia, l'influenza della temperatura non si ferma a questo, ma agisce direttamente su RuBisCO, che vede diminuire la propria affinità verso la CO<sub>2</sub> al crescere della temperatura, e inoltre incrementa il valore del rapporto tra le solubilità di ossigeno e anidride carbonica, provocando maggiori concentrazioni di ossigeno e quindi favorendo l'attività di ossigenasi di RuBisCO.

Il pH è un fattore che influenza la crescita dei cianobatteri, come già segnalato, ed è legato alla concentrazione dell'anidride carbonica, ma soprattutto degli SO<sub>x</sub> e NO<sub>x</sub>. Infatti è la regione di acidità che più crea problemi ai cianobatteri e le sostanze citate tendono ad acidificare il brodo di coltivazione. La CO<sub>2</sub> abbassa il pH, ma in maniera non così spiccata e quindi sopportabile dai microrganismi, SO<sub>x</sub> e NO<sub>x</sub>, invece, provocano un decremento più spiccato e problematico. Risulta, quindi, importante controllare e limitare la concentrazione di queste due specie, soprattutto quando il medium è costituito da scarichi di processi.

L'intensità luminosa rappresenta un parametro centrale, dato che ricopre la funzione di fonte di energia alla base del processo fotosintetico. Tipicamente costituisce uno dei principali fattori limitanti per i processi che si avvalgono di cianobatteri, in quanto, se si presenta al di sotto dei valori ottimali, risulta impossibile sfruttare l'intera potenzialità produttiva della biomassa; l'abbassamento dell'intensità luminosa può essere provocato da diverse cause, a partire dalla lunghezza d'onda e dalla concentrazione cellulare, per arrivare alla distanza di penetrazione e alla geometria del reattore. Tuttavia, anche avere intensità luminose elevate provoca danni importanti, poiché viene causata la fotoinibizione con relativo danneggiamento del sistema di riparazione del fotosistema II.

Il ceppo cianobatterico costituisce un ulteriore elemento da valutare, in quanto deve adattarsi bene alle condizioni di coltura, per potersi sviluppare e quindi catturare alti quantitativi di CO<sub>2</sub>. In particolare, le

velocità di crescita, i range ottimali di temperatura e la resistenza agli stress sono le caratteristiche da considerare.

La densità cellulare rappresenta anch'essa una condizione importante per il processo fotosintetico, in particolare perché condiziona lo sfruttamento della luce; infatti, se le cellule sono poco concentrate parte della luce irraggiata può non essere utilizzata e quindi costituisce uno spreco, però se al contrario risultano troppo concentrate, il brodo può apparire troppo torbido e impedire alla luce di filtrare e raggiungere tutti gli organismi.

L'anidride carbonica è uno dei carburanti della fotosintesi, perciò il valore della sua concentrazione è un fattore fondamentale e, insieme all'intensità luminosa, può spesso risultare limitante verso il processo fotosintetico. È quindi chiaro come un progressivo aumento della pressione parziale di CO<sub>2</sub> nel gas di alimentazione determini una maggiore produttività della fotosintesi e una maggiore rimozione dell'anidride carbonica stessa. Tuttavia, molto spesso non è trattando un gas composto da CO<sub>2</sub> pura che si ottiene la migliore produttività fotosintetica; infatti, molti cianobatteri riescono a tollerare concentrazioni di anidride carbonica fino a un valore critico, oltre il quale le cellule incontrano pesanti difficoltà di sopravvivenza.

L'ultimo parametro da considerare è l'accumulo dell'ossigeno molecolare. Questo è un elemento tutt'altro che trascurabile, in quanto, come già descritto, la presenza di ossigeno spinge il RuBisCO a operare come ossigenasi, interrompendo la cattura di CO<sub>2</sub>, ma il gas può anche risultare tossico, poiché un appropriato irraggiamento può provocare la formazione di radicali ossigenici fortemente dannosi per le membrane cellulari (Pulz, 2001). Quindi, siccome la presenza di questo gas è inevitabile, perché è uno dei prodotti finali della fotosintesi, bisogna porre particolare attenzione alla sua concentrazione e alla sua rimozione, anche nelle applicazioni antropiche (Ai et al., 2008; Goli et al., 2016; Kumar et al., 2011).

#### 1.3.4 *Synechocystis*

Il microrganismo impiegato nel presente lavoro di tesi è il *Synechocystis* sp. PCC 6803 e, come già in parte descritto, esso appartiene al *phylum* dei cianobatteri e all'ordine dei *Chroococcales*. Questo microrganismo rappresenta il cianobatterio meglio caratterizzato e, inoltre, è stato il primo organismo fotosintetico a subire il sequenziamento completo del genoma (Rosgaard et al., 2012). Non considerando queste caratteristiche, comunque, *Synechocystis* presenta un uso diffuso anche per la sua elevata resistenza a condizioni ambientali molto diversificate, a partire dalla concentrazione salina, dal pH, dalla temperatura, per giungere alla luce UV e alla concentrazione di CO<sub>2</sub>; questa capacità di resistenza, come già enucleato, è propria di molti cianobatteri e ne rappresenta il punto di forza. Delle proprietà cianobatteriche, *Synechocystis* condivide anche l'esigenza degli specifici elementi nutritivi e ambientali, dall'irraggiamento luminoso, alla CO<sub>2</sub> e all'azoto (Kim et al., 2011). Questo batterio, inoltre, opera tipicamente in condizioni fotoautotrofe, ma in situazioni di necessità può comportarsi come mixotrofo o addirittura eterotrofo. Tutte queste caratteristiche positive lo rendono sicuramente molto appetibile, tuttavia un importante fattore, spesso reputato negativo, è la crescita relativamente lenta, se paragonata ad altri microrganismi spesso utilizzati, quali *Saccharomyces Cerevisiae* o *Escherichia Coli* (Yu et al., 2013).

Concentrandosi, ora, sulle specificità di *Synechocystis* e declinando su di esso le informazioni presentate sui cianobatteri in generale, è interessante osservare in primo luogo gli elementi legati alla CO<sub>2</sub>. In particolare, questo cianobatterio ha sviluppato una modalità tutta individuale per ovviare al problema della presenza di ossigeno molecolare, in quanto ha inglobato RuBisCO in un organello, detto carbossisoma, che è alquanto impermeabile all'ossigeno, ma lascia diffondere lo ione bicarbonato, consentendo così di avere sempre un'alta pressione parziale di CO<sub>2</sub> nei pressi dell'enzima. Inoltre, qualora il cianobatterio si trovi in carenza da CO<sub>2</sub>, è in grado di attuare dei meccanismi particolarmente efficienti che permettono di recuperare e concentrare la poca anidride carbonica disponibile, rendendolo capace di crescere con basse concentrazioni di CO<sub>2</sub>. Se avere questo gas in basse concentrazioni può essere limitante, e il cianobatterio vi ovvia nella maniera citata, anche averlo in alte concentrazioni può creare delle problematiche alla crescita, come già segnalato in precedenza, ma da studi (Zavřel et al.,

2015) questo sembra non deprimere *Synechocystis*, sebbene al di sopra di una certa concentrazione critica di CO<sub>2</sub> un suo ulteriore incremento non generi alcun effetto positivo sull'attività fotosintetica del cianobatterio.

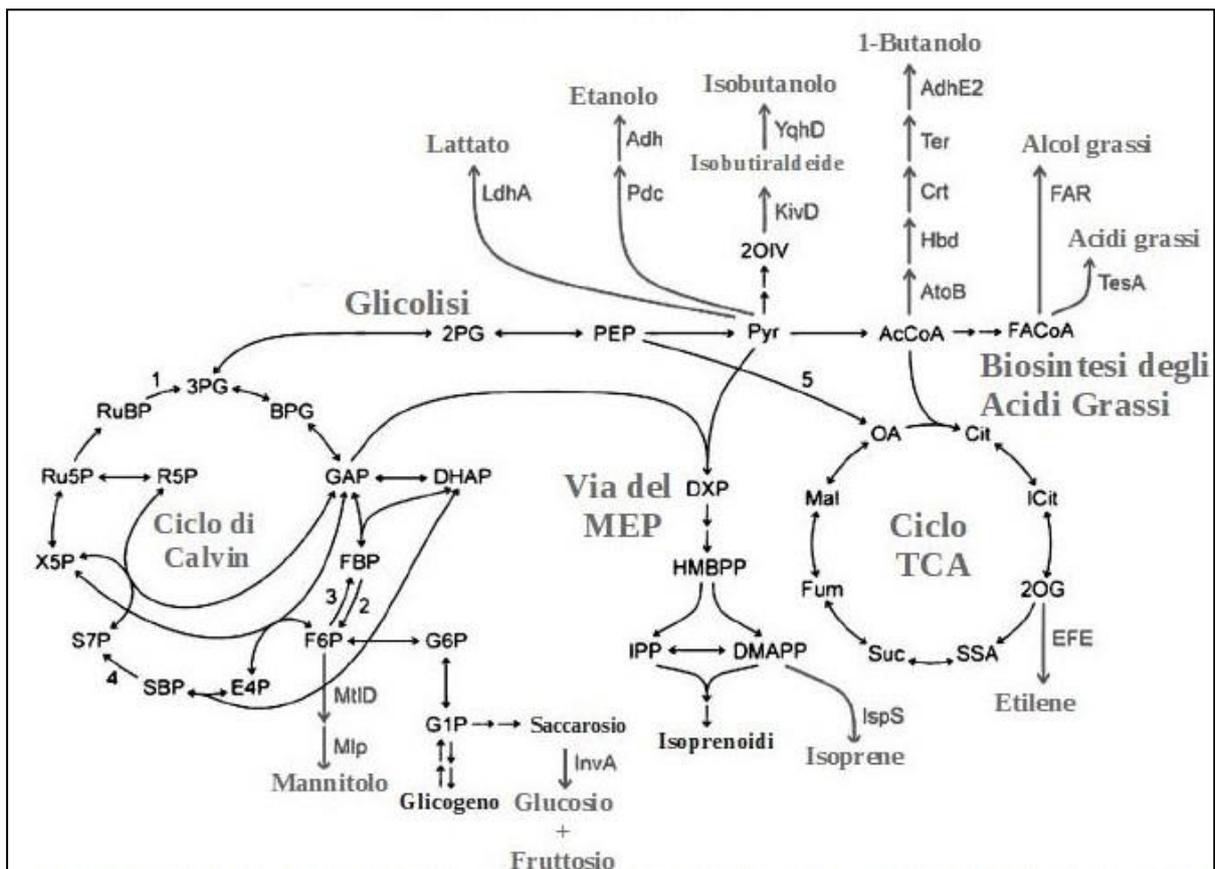
Considerando quest'ultima in particolare, l'influenza della CO<sub>2</sub> è già stata evidenziata e, quando questo gas presenta concentrazioni sufficientemente elevate, esso non costituisce un fattore limitante, che viene invece tipicamente rappresentato dalla parte luminosa della fotosintesi e, quindi, dall'irraggiamento luminoso. In merito a questo, è importante sottolineare come il cianobatterio non presenti un'evidente inibizione da eccesso di irraggiamento (se non per valori elevati di intensità irraggiata) e che i pigmenti più abbondanti per la raccolta della luce presenti in *Synechocystis* sono rappresentati dalla ficocianina e dall'alloficocianina, caratteristica che determina l'assorbimento di luce sulla lunghezza d'onda del rosso. Tuttavia, irraggiare con una luce contenente anche lunghezze d'onda del blu determina un leggerissimo aumento della quantità di energia assorbita.

Per quanto concerne, invece, ulteriori parametri, *Synechocystis* opera in un buon range di temperature, anche se l'ottimo è stato individuato intorno al valore di 35°C. Al di sotto di esso, il tasso di crescita del cianobatterio varia linearmente con la temperatura, mentre al di sopra dei 38°C si generano dei danni alle cellule, quali denaturazione delle ficobiliproteine e modificazioni alle membrane plasmatiche. Considerando l'azoto, il cianobatterio riesce a rifornirsi ricavandolo da ioni ammonio e nitrato, ma non ha la possibilità di fissare l'azoto molecolare; è importante evidenziare che lo ione ammonio in quantità molto elevate risulta leggermente tossico, in quanto accresce il fenomeno della fotoinibizione, con il conseguente danneggiamento del fotosistema II, sebbene non ne condizioni i meccanismi di riparazione (Dai et al., 2014). Un'eventuale carenza dell'azoto, comunque, determina l'inibizione della fissazione del carbonio, di cui può essere causa anche una carenza di fosforo, il quale determina in aggiunta un abbassamento della produzione di energia e di nucleotidi all'interno della cellula (Yu et al., 2013; Zavřel et al., 2015).

Il cianobatterio in esame può subire ingegnerizzazioni tese ad aumentare la produttività di determinati metaboliti e alcuni interventi di modifica sono già stati testati. I prodotti realizzabili da *Synechocystis* sono molteplici, quali, a titolo esemplificativo, acetone, etanolo, etilene, isoprene, acidi grassi e lipidi (Nozzi et al., 2013; Pade et al., 2016). In merito a questi ultimi, Cuellar-Bermudez et al. (Cuellar-Bermudez et al., 2015) hanno effettuato degli studi per classificare i parametri influenzanti la loro sintesi e hanno evidenziato come i principali lipidi intracellulari di *Synechocystis* siano costituiti dai diacilgliceroli, ubicati nelle membrane tilacoidali. Anche per i lipidi, i principali parametri condizionanti sono la concentrazione di CO<sub>2</sub>, la luce irraggiata e il pH e in particolare questi ultimi due operano in coppia. Anche Monshupanee e Incharoensakdi (Monshupanee and Incharoensakdi, 2014) hanno studiato la produzione di lipidi, e con essi glicogeno e PHB (una bioplastica), valutando l'influenza di molti parametri, molti dei quali sono rappresentati da quelli già citati, sottolineandone così ulteriormente l'importanza fondamentale. Essi hanno osservato come la coltivazione di *Synechocystis* in assenza di luce causi una diminuzione delle concentrazioni di lipidi e glicogeno, ma un incremento di quella di PHB, e come la biomassa declini lentamente. Operando, invece, un aumento progressivo dell'intensità luminosa, crescono le concentrazioni di glicogeno e lipidi fino a un tetto massimo di irraggiamento, oltre il quale diminuiscono, PHB mantiene, invece, valori costanti. Inducendo una carenza di azoto, ancora, si vedono crescere le concentrazioni di glicogeno e PHB, mentre restano pressoché costanti i lipidi; inoltre, questa carenza influisce anche sul metabolismo centrale del carbonio, in particolare aumentando la produzione di acetyl-CoA e abbassando i livelli di NADH a favore della sua forma ossidata (Anfelt et al., 2015). Con una carenza di ferro, cresce il glicogeno, ma lipidi e PHB restano costanti. Considerando, invece, una carenza da fosforo, cresce il glicogeno, cresce molto il PHB e i lipidi restano perlopiù costanti; è interessante come la carenza da fosforo influenzi anche le concentrazioni di cianoficina (polimero di riserva dell'azoto), le quali aumentano in mancanza di esso (Trautmann et al., 2016). Per quanto riguarda, invece, eventuali carenze di calcio e zolfo, queste sembrano non determinare cambiamenti nei livelli di glicogeno, lipidi e PHB, tuttavia lo zolfo è strettamente correlato al funzionamento della fotosintesi, della respirazione e dei sistemi redox-sensitivi, condizionando in maniera importante anche i livelli amminoacidici (Kiyota et al., 2012). Infine, è necessario sottolineare come la carenza di zolfo o calcio non influenzi la crescita cellulare in maniera significativa, mentre quelle di azoto, fosforo o ferro la deprimono in maniera importante.

### 1.3.5 Sviluppi futuri

Le future applicazioni dei cianobatteri, e con essi di *Synechocystis*, si collocano nell'ambito dei sistemi di rimozione dell'anidride carbonica e, naturalmente, i processi implementati devono tendere ad essere sostenibili anche dal punto di vista economico per potersi affermare, in quanto si ritrovano a competere con i processi più tradizionali. Infatti l'obiettivo principale è sì indirizzato all'abbassamento della concentrazione del gas serra, tuttavia per restituire un rientro economico deve puntare alla realizzazione di prodotti di valore, che in primo luogo sono rappresentati dai biocombustibili (es. bioetanolo). Questi però, come è evidente, in quanto combustibili si ritrovano direttamente in competizione con i combustibili fossili, attualmente prodotti con processi più economici e quindi venduti a un prezzo più ridotto. In aggiunta ai biocombustibili, inoltre, la produzione può essere indirizzata verso prodotti chimici ad alto valore aggiunto, ma anche molti di questi si trovano a competere con i prodotti dei processi chimici tradizionali e questo è uno dei motivi per cui solo i prodotti ad alto valore aggiunto possono rappresentare una via economicamente sostenibile nel breve periodo. Esempi di questi prodotti realizzabili con *Synechocystis* sono già stati citati, come l'acetone e l'isoprene, ma uno ulteriore è il lattato e, con essi, molti altri che possono costituire metaboliti, con vie di sintesi appositamente ingegnerizzate (figura (1.6)). Per il lattato, a titolo esemplificativo, è stata proposta una ingegnerizzazione di *Synechocystis* con l'introduzione di una particolare lattato deidrogenasi, finalizzata a potenziare la produzione di quell'acido, e si sono parzialmente studiati i parametri influenzanti la produzione, in particolare: condizioni di pH acido o neutro, che interrompono la secrezione del lattato e, conseguentemente, la sua produzione; presenza di acetato, che inibisce la piruvato deidrogenasi, impedendo la trasformazione di piruvato ad acetil-CoA, lasciandolo così a disposizione della lattato deidrogenasi (Hollinshead et al., 2014).



**Figura 1.6:** Cicli metabolici centrali dei cianobatteri, con le vie metaboliche alternative ingegnerizzabili (in grigio). (Figura tratta da (Rosgaard et al., 2012) con modifiche)

Se puntare a prodotti valevoli dal punto di vista economico costituisce un primo fattore verso l'adozione di sistemi basati sui cianobatteri, tuttavia esso non è sufficiente né esaustivo. Quindi diviene necessario in futuro ricercare l'ottenimento di ulteriori caratteristiche, indirizzate all'abbattimento dei costi, quali: realizzare unità di processo facilmente scalabili; operare a temperature medio-basse, in modo da ridurre le spese energetiche, e questo è più semplice con i bioreattori; adottare processi flessibili e integrati, in modo da poterli applicare nei contesti più diversi. In particolare, l'elemento dell'integrazione è molto importante per la sostenibilità del processo globale, perché permette in maniera incisiva di lenire ed aiutare le problematiche economiche. Quindi, sfruttare calore di scarto generato da impianti che producono la CO<sub>2</sub> da trattare, per regolare la temperatura dei fotobioreattori, oppure avvalersi di energia a basso prezzo nelle ore notturne, che rischierebbe di andare sprecata, per irraggiare i reattori, oppure ancora utilizzare rifiuti organici come alimentazione al reattore (con la possibilità di trattare i reflui) rappresentano delle modalità di integrazione e di risparmio molto importanti.

In aggiunta a queste, una modalità di integrazione di fondamentale importanza è quella riguardante la fonte di anidride carbonica, in quanto questo gas rappresenta un reagente imprescindibile. Infatti un miglioramento di sostenibilità del fotobioprocesso si otterrebbe installandolo in coda a un altro processo che genera CO<sub>2</sub> in sufficienti concentrazioni, come sui gas di scarico di industrie cementifere (CO<sub>2</sub> ~ 25%<sub>vol</sub>), oppure su generici gas di scarico con una sufficiente portata, oppure sul gas in uscita dalla fermentazione alcolica, oppure ancora sul biogas. Quest'ultimo in particolare è una destinazione interessante, in quanto la sua produzione per via anaerobica è un processo che si sta sempre più diffondendo per il trattamento dei rifiuti organici, in un contesto in cui la soluzione discarica sta progressivamente venendo abbandonata. Inoltre, il biogas contiene già di per sé una buona concentrazione di anidride carbonica e potrebbe essere direttamente trattato, consentendo potenzialmente la sua depurazione a biometano. Tuttavia, il processo di depurazione è già normalmente attuato ed è economicamente sostenibile, ma, da questo, un flusso di CO<sub>2</sub> pressoché puro viene liberato come rifiuto e potrebbe, quindi, essere indirizzato verso un fotobioreattore ed essere ulteriormente utilizzato (ENGICOIN, 2017).

#### *1.4 Lavoro e struttura generale*

Il lavoro di tesi descritto nelle pagine successive è stato rivolto a studiare il funzionamento di un fotobioreattore a pannello contenente il cianobatterio *Synechocystis* sp. PCC 6803, sia da un punto di vista sperimentale, sia con un approccio modellistico-computazionale. Tra le molteplici condizioni e variabili esaminate, una particolare attenzione è stata dedicata agli effetti determinati dalla luce irraggiata, tenendo in considerazione alcuni valori che questa variabile può presentare. Quest'ultima analisi ha permesso di studiare gli andamenti luminosi interni al fotobioreattore, nonché l'influenza dell'intensità luminosa sulle prestazioni del cianobatterio e sulla sua capacità di sussistenza.

Conseguentemente, un primo capitolo della tesi è dedicato alla parte sperimentale, mediante descrizione delle apparecchiature impiegate e della procedura seguita, per la realizzazione delle prove e per la misurazione delle variabili di interesse, come la concentrazione di ossigeno o le dimensioni cellulari.

Un secondo capitolo, invece, è destinato alla descrizione teorica e di strutturazione dell'intera simulazione computazionale, impostata in modo da modellare tutti i principali fenomeni di trasporto, quali: la fluidodinamica (con velocità, frazioni volumiche e pressioni), il trasporto di materia (con le concentrazioni delle specie), il trasporto di calore con irraggiamento e le reazioni chimiche.

Un terzo capitolo concerne l'esposizione dei risultati, suddivisi tra quelli sperimentali, con la discussione delle variabili cianobatteriche di interesse al variare dell'intensità luminosa, e quelli computazionali, con l'esposizione degli andamenti delle variabili afferenti ai fenomeni di trasporto già citati. Inoltre, l'analisi computazionale offre la descrizione di uno studio di sensibilità condotto sull'intensità luminosa incidente e sui suoi andamenti nel fotobioreattore.

Infine, viene proposto un capitolo conclusivo, seguito dall'elenco dei simboli utilizzati, dai riferimenti bibliografici considerati e dai doverosi ringraziamenti.

## 2. Attività sperimentale

Il lavoro di analisi sperimentale è stato condotto su un fotobioreattore a pannello FMT150/1000 della Photon Systems Instruments, in cui si è provveduto a variare l'intensità luminosa e a misurare molteplici variabili necessarie a valutare l'evoluzione del sistema. Il lavoro è stato realizzato in collaborazione e con il supporto del progetto del dottorando Alessandro Cordara e del gruppo di ricerca Molecular Microbial Physiology Group, Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam.

### 2.1 Apparato sperimentale

Il fotobioreattore a pannello (figura (2.1)) è costituito da una struttura principale con funzionalità di controllo, comprendente in particolare un pannello luminoso a LED e un densitometro, da un *vessel* di coltivazione e da alcuni strumenti ausiliari esterni, necessari per il corretto funzionamento del sistema e per la realizzazione di analisi ulteriori. Nei paragrafi successivi verranno presentati nel dettaglio i singoli componenti.

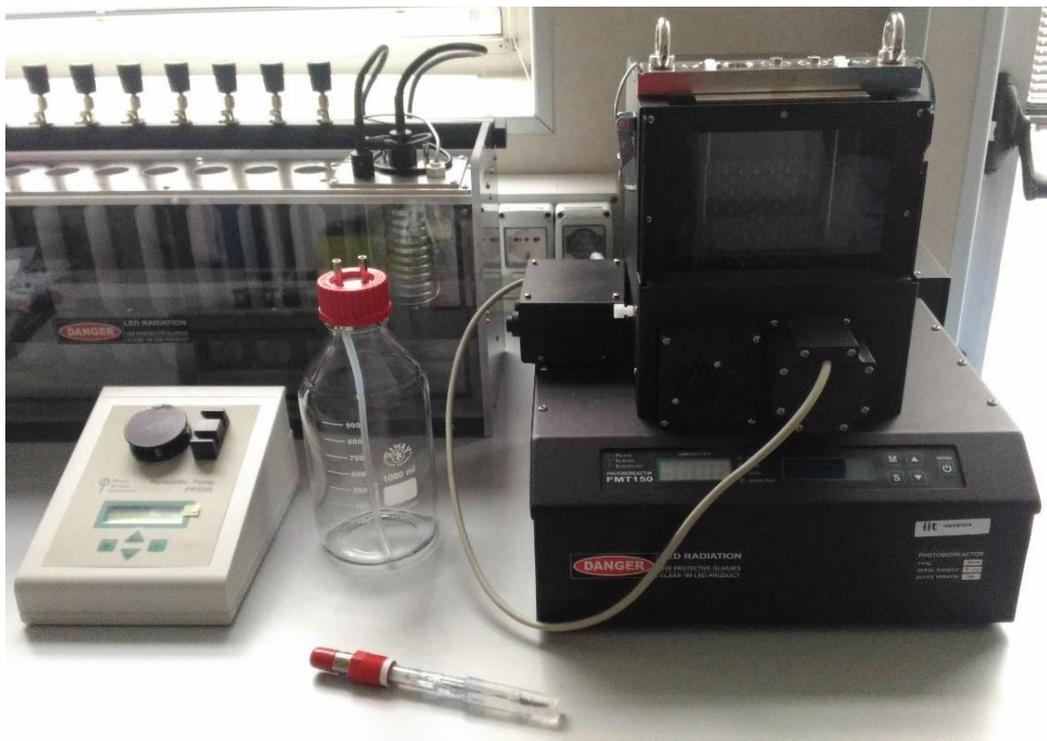


Figura 2.1: Apparato sperimentale.

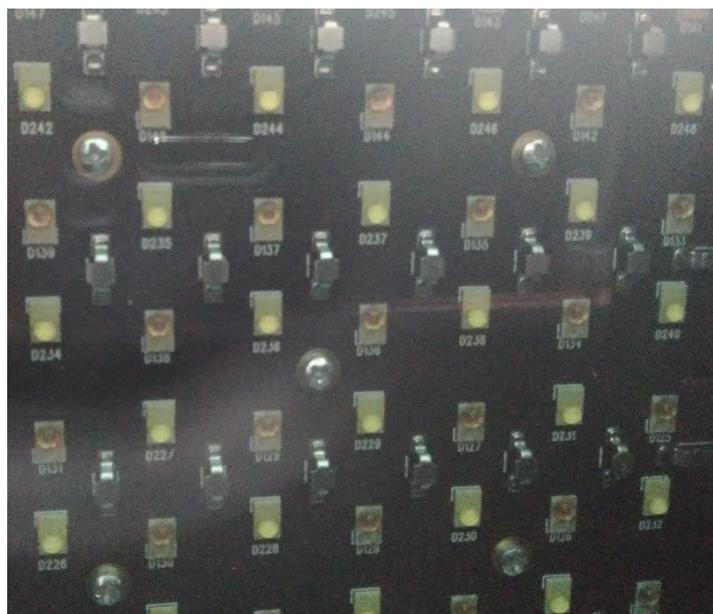
#### 2.1.1 Struttura principale

La struttura principale del fotobioreattore (figura (2.2)) costituisce il punto dove è possibile realizzare il controllo manuale, in quanto offre un pannello con due schermi e alcuni pulsanti ed è il blocco a cui tutti gli strumenti esterni vengono connessi. Tuttavia, avendo a disposizione il *software* esterno apposito, il reattore viene esercito mediante controllo automatico realizzato attraverso l'ausilio di un computer.



**Figura 2.2:** Struttura principale del fotobioreattore.

All'interno della struttura principale, come già affermato, è presente anche il pannello verticale comprendente i LED luminosi necessari all'irraggiamento del brodo di coltivazione (figura (2.3)). L'irraggiamento avviene in maniera altamente uniforme, data la struttura stessa del pannello, e l'intensità irraggiata può essere controllata e variata dal sistema, a seconda delle necessità dell'utente.



**Figura 2.3:** Pannello verticale con i LED luminosi.

In aggiunta al pannello luminoso, il blocco centrale include anche un densitometro, la cui prima finalità è valutare la concentrazione della biomassa, misurando la densità ottica della miscela. Questa misura viene effettuata sfruttando il fenomeno di attenuazione della luce irraggiata da LED multicolori (infatti più la biomassa è concentrata, più la luce risulta attenuata), tramite cui vengono irraggiati due *flash* di luce, uno a 720 nm e l'altro a 680 nm. Entrambe le lunghezze d'onda restituiscono un'intensità misurata che varia con il variare della concentrazione di biomassa, tuttavia con i 680 nm si verifica anche il fenomeno di assorbimento della luce da parte della clorofilla cianobatterica. Questo fenomeno permette, quindi, di stimare anche la concentrazione di clorofilla, valutando il rapporto (variazione relativa) tra la densità ottica a 680 nm ( $OD_{680}$ ) e quella a 720 nm ( $OD_{720}$ ).

Infine, nel basamento della struttura è ancora presente una cella di Peltier necessaria per apportare o rimuovere calore dal brodo di coltivazione.

### 2.1.2 *Vessel* di coltivazione

Il *vessel* di coltivazione (figura (2.4)) si presenta come un parallelepipedo sottile, in cui lo spessore risulta inferiore alle altre due grandezze. La struttura è trasparente ed è costituita da vetro, nelle quattro pareti laterali, e da acciaio inossidabile nelle basi inferiore e superiore; questo consente, altresì, la creazione nella base inferiore di un ottimale ponte termico tra l'interno del *vessel* e la cella di Peltier finalizzata al trasporto di calore e presente nella struttura principale del reattore.



**Figura 2.4:** *Vessel* di coltivazione.

Il *vessel* è inoltre dotato di due maniglie sommitali che ne permettono facilmente la presa e lo spostamento, nonché di tre ingressi destinati all'inserimento di eventuali sonde, i quali possono rimanere chiusi se non utilizzati. Sono presenti quattro ulteriori aperture per connettori *luer*, delle quali una è destinata all'attacco dello *sparger* a L, dove avviene l'introduzione del gas di alimentazione e il rabbocco di *medium*, quando necessario, una all'introduzione dell'inoculo iniziale, una alla rimozione dell'*overflow* per trascinamento e l'ultima per il prelievo dei campioni.

Infine, all'interno del *vessel* si trova inserito il tubo di forma simile a una L (figura (2.5)) che è destinato, appunto, ad assolvere alla funzione di introduzione del gas di alimentazione e di rabbocco del *medium*;

l'alimentazione avviene attraverso dei forellini di diametro molto piccolo presenti sulla parte terminale dello *sparger*.

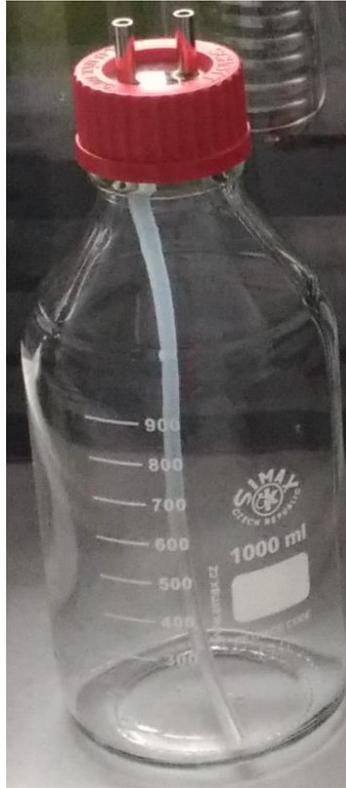


**Figura 2.5:** *Sparger* a L.

### 2.1.3 Umidificatore

L'umidificatore (figura (2.6)) consta in una bottiglia di vetro in cui viene introdotta dell'acqua distillata. La bottiglia presenta due ingressi sulla sommità, uno con un tubo che giunge fino al fondo della bottiglia stessa e l'altro con la sola apertura. Questi permettono di fluxare il gas di alimentazione all'interno della bottiglia e successivamente di estrarlo, in maniera da forzarlo ad attraversare il volume di acqua e quindi umidificarlo, prima di introdurlo all'interno del *vessel*. Questa procedura è necessaria, perché il gas alimentato al reattore non può essere secco, in modo da evitare di asciugare la coltura e, quindi, da allontanare il rischio di diminuzione di volume.

In aggiunta a questo strumento, è presente la valvola *bubble interruption*, necessaria al blocco completo dell'insufflaggio del gas, quando avviene la misura delle densità ottiche; infatti la presenza di eventuali bolle di gas all'interno del *vessel* inficerebbe i risultati delle misure.



**Figura 2.6:** Umidificatore per il gas di alimentazione al fotobioreattore.

#### 2.1.4 Sistema di miscelazione dei gas

L'apparecchiatura in esame (*GMS150 Photon Systems Instruments*) (figura (2.7)) è uno strumento esterno che assolve alla funzione di realizzare precise miscele contenenti fino a quattro differenti gas. Essa è dotata di misuratori termici di portata massica e di controllori di portata massica, i quali consentono una rigorosa regolazione delle portate dei singoli gas. La struttura a disposizione prevede due valvole per la regolazione: una calibrata per aria e azoto molecolare con una portata di 40-2000 mL/min, l'altra per anidride carbonica con una portata di 0,8-40 mL/min.

L'utente può definire la miscela gassosa risultante o fornendo le portate volumiche dei singoli gas, oppure fissando la composizione volumica relativa e la portata gassosa complessiva. Infine, è importante sottolineare come anche questo strumento sia controllabile mediante *software* esterno.



**Figura 2.7:** Sistema di miscelazione dei gas.

### 2.1.5 *Stirrer* magnetico

Lo *stirrer* magnetico (V-200 *Photon Systems Instruments*) è costituito da una apparecchiatura esterna che viene fissata sulla parete frontale della struttura principale, a parziale copertura del *vessel* di coltivazione. Esso si compone di un motore (figura (2.8)) che determina una rotazione mediante l'applicazione di un campo magnetico e di una barra magnetica (figura (2.9)) ricoperta di *teflon* che viene messa in rotazione. Quest'ultima è direttamente immersa nel brodo di coltivazione e viene, appunto, movimentata dall'esterno mediante il campo magnetico.

L'utilizzo dello *stirrer* si rende necessario a causa dell'insufficienza di miscelazione ottenuta con la semplice insufflazione di bolle da parte dello *sparger*; infatti, avvalendosi dello *stirrer*, l'omogeneità della miscela viene notevolmente migliorata e questo consente anche alle sonde per l'ossigeno e l'anidride carbonica di operare in maniera ottimale.



**Figura 2.8:** Motore magnetico esterno, con l'alimentazione e il supporto per il fissaggio al corpo del fotobioreattore.



**Figura 2.9:** Barra magnetica che viene immersa nel brodo di reazione e messa in rotazione.

### 2.1.6 Pompa peristaltica

La pompa peristaltica (PP500 *Photon Systems Instruments*) (figura (2.10)), in cui il moto del fluido viene determinato da strozzature che si spostano progressivamente all'interno del condotto di trasporto, assolve alla funzione di introduzione di medium fresco nel *vessel*. Questa azione consente di mantenere una concentrazione cianobatterica stabile, operando in modalità *turbidostat* e assicurando una densità ottica del brodo di coltivazione costante.



**Figura 2.10:** Pompa peristaltica per la movimentazione fluidica.

### 2.1.7 pH-metro/Sonda di temperatura

Questo strumento (*Mettler Toledo*) (figura (2.11)), destinato principalmente alla misura del pH del brodo di reazione, si presenta sotto forma cilindrica e contiene un elettrolita a gel pressurizzato, una trappola per ioni argento e un elettrolita di riferimento. Inoltre, nella parte terminale, possiede un sensore di temperatura incorporato, elemento che permette di utilizzare la sonda non solo per monitorare il pH, ma anche per misurare la temperatura.



**Figura 2.11:** pH-metro con sonda integrata per la misura della temperatura.

### 2.1.8 Sonda per O<sub>2</sub>

Questo strumento (*Mettler Toledo*) (figura (2.12)) si presenta sotto forma cilindrica ed è finalizzato al continuo monitoraggio della concentrazione dell'ossigeno disciolto nella miscela; è dotato anche di una sonda di temperatura.

Nella sua struttura generale, si individuano un elettrodo di lavoro (catodo), un elettrodo di riferimento (anodo) e una membrana permeabile all'ossigeno, la quale separa il brodo di reazione dagli elettrodi. Il catodo presenta una polarizzazione costante, tramite la quale riduce l'ossigeno, mentre all'anodo si generano ioni argento liberati nell'elettrolita. Si chiude, quindi, il circuito grazie alla migrazione di ioni attraverso l'elettrolita e la corrente che viene misurata permette di valutare la concentrazione dell'ossigeno, in quanto essa risulta proporzionale alla pressione parziale del gas disciolto.



**Figura 2.12:** Sonda per la misura della concentrazione di ossigeno disciolto.

### 2.1.9 Apparecchiature ausiliarie

La tabella (2.1) presenta le ulteriori apparecchiature utilizzate durante preparazioni o analisi.

**Tabella 2.1.** Elenco delle apparecchiature ausiliarie.

Tipologia di apparecchiatura	Modello
<b>Incubatore agitato</b>	New Brunswick Innova 44
<b>Stufa</b>	Electrolux
<b>Bilancia analitica</b>	Mettler Toledo AB204
<b>Spettrofotometro</b>	Biochrom Lightwave II
<b>Misuratore di numero e dimensioni cellulari</b>	Roche Applied Science CASY®

## 2.2 Procedura sperimentale

### 2.2.1 Ceppo batterico e fasi precolturali

Il cianobatterio impiegato nella totalità delle prove sperimentali è costituito dal *wild-type Synechocystis* sp. PCC 6803, nella sua forma tollerante al glucosio, come fornito da Devaki Bhaya (Department of Plant Biology, Carnegie Institution for Science, Stanford, California, USA).

La sua crescita è stata condotta in 25 mL del *medium* BG-11, come descritto in Stanier et al. (Stanier et al., 1971), con alcune modifiche presentate in van Alphen e Helingwerf (van Alphen and Hellingwerf, 2015), finalizzate in particolare alla rimozione dei citrati come fonti di carbonio e all'incremento della

concentrazione di EDTA per mantenere alta la solubilizzazione del ferro. Quest'ultima composizione del *medium* è spesso nota come YBG-11. La composizione utilizzata viene presentata dettagliatamente nella tabella (2.2).

Il protocollo di sintesi del *medium* ne ha previsto la preparazione mediante tre soluzioni indipendenti che sono successivamente state miscelate insieme. Questa via di sintesi, che ha aggiunto i vari componenti separatamente, è stata adottata in modo da assicurarsi che non avvenisse alcuna precipitazione delle sostanze disciolte.

**Tabella 2.2.** Concentrazioni delle sostanze presenti nel *medium* BG-11 modificato, ripartite nelle tre sottosoluzioni sintetizzate. Le tracce metalliche sono esplicitate in coda.

<b>Soluzione</b>	<b>Componenti</b>	<b>Concentrazione, g/L</b>
<b>1) Azoto, Calcio</b>	NaNO <sub>3</sub>	600
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	14,4
<b>2) Magnesio, Ferro, Tracce metalliche</b>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	30
	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,62
	EDTA Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,24
	Tracce metalliche	400 mL
<b>3) Fosfato</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16
	EDTA Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7,44
<b>Tracce metalliche</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,81
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,222
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,391
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,079
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,049

La prima soluzione è stata realizzata con la seguente procedura:

- Si introducono 600 mL di acqua Milli-Q in un cilindro graduato.
- Si aggiunge lentamente NaNO<sub>3</sub> miscelando vigorosamente e si porta il tutto al volume di 950 mL.
- Si aggiunge CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O quando NaNO<sub>3</sub> è completamente disciolto.
- Si porta a volume con acqua fino a 1 L.
- Si sterilizza, filtrando la soluzione.

La seconda soluzione è stata realizzata con la seguente procedura:

- Si usa preferibilmente un cilindro graduato di materiale plastico, dove EDTA Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O viene disciolto in 400 mL di acqua, previa un'accurata miscelazione, e dove FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O viene successivamente aggiunto. Si attende la completa dissoluzione, mantenendo una continua agitazione.

- Si discioglie  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  separatamente in 150 mL di acqua, provvedendo a mantenere il tutto in agitazione.
- Si aggiungono le tracce metalliche alla soluzione EDTA/Fe e successivamente si aggiunge anche la soluzione di  $\text{MgSO}_4$ . Il pH dovrebbe presentare un valore prossimo a 2,2.
- Si porta a volume con acqua fino a 1 L.
- Si sterilizza, filtrando la soluzione.

La terza soluzione è stata realizzata con la seguente procedura:

- Si discioglie  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in 1 L di acqua, miscelando accuratamente. Il pH dovrebbe presentare un valore prossimo a 9,5.
- Si discioglie  $\text{EDTA Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .
- Si sterilizza, filtrando la soluzione.

La fase di precoltura è stata realizzata in un incubatore agitato a 120 rpm a 30 °C per la durata di 4 giorni, sotto un'illuminazione costante di luce rossa a 30  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 2.2.2 Coltura nel fotobioreattore

La precoltura di *Synechocystis* sp. PCC 6803 è stata utilizzata per introdurre nel fotobioreattore 20 mL di coltura. Il volume finale totale contenuto nel vessel è risultato di circa 380 mL, di cui la parte restante è stata costituita dal *medium* BG-11 modificato. Siccome il *medium*, sintetizzato secondo la procedura descritta nel paragrafo precedente, risulta lievemente acido e il pH desiderato deve essere pari a 8, è stato necessario correggerlo e poi aggiungere una soluzione tampone per assicurarsi di mantenerlo prossimo al valore voluto; in aggiunta a questo, è stato introdotto  $\text{NaHCO}_3$  10 mM, in modo da garantire una ulteriore fonte di carbonio. La zona superiore del vessel, inoltre, è risultata priva di miscela e quindi si è presentata come una sezione di disimpegno per le sostanze gassose, essendo occupata solo dai gas prodotti e immessi.

La miscela, durante la fase di lavoro del fotobioreattore, è stata sottoposta a un'illuminazione artificiale esterna di tipo rosso-arancione a 636 nm, grazie al pannello verticale dotato di LED già precedentemente descritto. Sono state condotte prove a intensità luminose fisse, con valori di 50, 200, 300, 500, 800, 950 e 1460  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . L'intensità luminosa è stata incrementata da un valore a quello seguente a intervalli di 24 h, tempo sufficiente per consentire un raggiungimento di condizioni di stabilità nel tasso di crescita del microrganismo e, quindi, anche nel segnale del livello di ossigeno disciolto nella miscela.

I valori di temperatura e pH sono stati mantenuti costanti a 30 °C e 8, rispettivamente. In particolare, su quest'ultimo si è intervenuti anche controllando la pressione parziale dell'anidride carbonica, avvalendosi del sistema di miscelazione dei gas. L'anidride carbonica è stata alimentata in una miscela con azoto molecolare, con  $\text{CO}_2$  al 1% in volume e  $\text{N}_2$  al 99%, con una portata di 150 mL  $\text{min}^{-1}$ .

Il fotobioreattore, infine, è stato esercito in modalità *turbidostat*, misurando la densità ottica a 720 nm tramite il densitometro integrato, calibrato assicurandosi di mantenerla approssimativamente a un valore di 0,4 (con una variazione massima del 3%) con un'intensità di 50  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . L'applicazione della modalità *turbidostat* ha consentito di mantenere con certezza la coltura nella fase esponenziale di crescita sotto tutte le condizioni sperimentali di irraggiamento.

Tutte le condizioni sperimentali precedentemente descritte sono state riassunte nella tabella (2.3).

**Tabella 2.3.** Sintesi delle condizioni sperimentali

	Condizioni sperimentali
<b>Inoculo di cianobatterio</b>	20 mL
<b>Volume totale di miscela</b>	~ 380 mL
<b>Lunghezza d'onda luce irraggiata</b>	636 nm
<b>Intensità luminosa</b>	50, 200, 300, 500, 800, 950, 1460 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$
<b>Durata cicli</b>	24 h
<b>Temperatura</b>	30 °C
<b>pH</b>	8
<b>Portata gassosa in ingresso</b>	150 mL min <sup>-1</sup>
<b>Composizione gas in ingresso</b>	CO <sub>2</sub> 1% <sub>v/v</sub> N <sub>2</sub> 99% <sub>v/v</sub>
<b>OD<sub>720</sub></b>	0,4 con 50 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$

### 2.2.3 Misurazioni del peso secco, delle dimensioni cellulari e del numero di cellule

Al termine di ogni ciclo di 24 h, sono stati prelevati 22 mL di coltura in modo da poter effettuare delle misure in parallelo alle operazioni del reattore. In particolare queste misure sono state indirizzate a valutare il peso secco, le dimensioni e il numero delle cellule cianobatteriche.

Il peso secco è stato determinato avvalendosi di alcune membrane in acetato di cellulosa (Whatman) con un diametro dei pori pari a 0,45 $\mu\text{m}$ . Queste sono state prima lavate con acqua Milli-Q, essiccate in una stufa per 24 h a 90 °C e pesate con una bilancia analitica. Successivamente, le membrane così preparate sono state utilizzate per filtrare 20 mL del campione di coltura. Il tutto è stato lavato con acqua per rimuovere i sali, poi lasciato essiccare in stufa a 90 °C e, infine, pesato. In parallelo a queste azioni, è stata misurata la densità ottica a 720 nm del campione di cellule e il valore è stato utilizzato per normalizzare il peso secco delle cellule per unità di volume.

La dimensione media delle cellule e il loro numero, invece, sono stati misurati mediante lo strumento misuratore CASY<sup>®</sup>. Un volume pari a 20  $\mu\text{L}$  del campione colturale è stato diluito con 10 mL della soluzione CASY<sup>®</sup> ton all'interno di specifiche fiale CASY<sup>®</sup> in materiale plastico e le fiale sono state analizzate, dopo aver azzerato lo strumento di misura mediante la soluzione CASY<sup>®</sup> ton. Le misure sono state condotte operando in un intervallo di calibrazione di 0-5  $\mu\text{m}$  con un capillare di 60  $\mu\text{m}$ .

### 2.2.4 Estrazione dei pigmenti

In aggiunta alle misurazioni precedenti, sono state condotte delle valutazioni relative al contenuto di pigmenti fotosintetici, in particolare di Clorofilla *a* e carotenoidi; la procedura sperimentale adottata è stata desunta da Sinetova et al. (Sinetova et al., 2012).

Nuovamente, ogni 24 h si è prelevato 1 mL di coltura dal fotobioreattore e, successivamente, lo si è sottoposto a una centrifugazione della durata di 7 min con un'accelerazione di 15000g. Il *pellet* ottenuto è stato poi risospeso in metanolo puro pre-refrigerato e vi è stato tenuto per 20 min a 4°C, prima di procedere a una ulteriore centrifugazione con le medesime caratteristiche della precedente. Sono, infine, state eseguite misure di assorbimento alle lunghezze d'onda di 470, 652 e 665 nm mediante uno spettrofotometro.

A partire dai valori di assorbimento alle lunghezze d'onda citate, sono state usate le formule tratte da Welburn (Wellburn, 1994) per ottenere le concentrazioni di clorofilla *a* (equazione (2.1)) e carotenoidi (equazione (2.2)). La concentrazione di clorofilla *b* è stata fissata a 0.

$$\text{Clorofilla } a \text{ (}\mu\text{g/mL)} = 16,72 \cdot A_{665} - 9,16 \cdot A_{652} \quad (2.1)$$

$$\text{Carotenoidi (}\mu\text{g/mL)} = \frac{1000 \cdot A_{470} - 1,63 \cdot [\text{Clorofilla } a] - 104,96 \cdot [\text{Clorofilla } b]}{221} \quad (2.2)$$

### 3. Modellazione e simulazione

#### 3.1 Struttura matematica

La piattaforma *software* utilizzata per la modellazione del sistema provvede a implementare tutta una serie di equazioni tra loro spesso dipendenti e a risolverle con specifici metodi numerici. In particolare vengono impiegate equazioni connesse alla descrizione dell'elemento fluidodinamico, al trasporto di materia e al trasporto di energia. Queste equazioni saranno ora analizzate e descritte dal punto di vista teorico, considerandone i molteplici termini costitutivi. A titolo consultivo, sono stati utilizzati un manuale di fenomeni di trasporto e il manuale del *software* COMSOL® (Bird et al., 2002; COMSOL®, 2017).

Prima, però, di addentrarsi negli specifici ambiti, è necessario presentare l'equazione di continuità (3.1) che è alla base di molte semplificazioni effettuate nei paragrafi successivi. Questa equazione si presenta nella forma di bilancio di materia volumico globale.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u}) = 0 \quad (3.1)$$

Nell'equazione (3.1) si individuano due termini, di cui il primo rappresenta l'accumulo della massa per unità di volume (densità volumica), mentre il secondo il trasporto convettivo della medesima proprietà. Non compaiono il termine di generazione, né quello di trasporto diffusivo, in quanto a livello globale non si genera materia e la somma (che restituisce il termine diffusivo globale) dei termini diffusivi di ciascuna specie presente nel sistema risulta nulla. Laddove si presenti un sistema a densità costante, l'equazione (3.1) si semplifica, restituendo l'equazione (3.2) in cui la divergenza della velocità risulta nulla.

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \quad (3.2)$$

##### 3.1.1 Trasporto di materia

Il trasporto di specie chimiche all'interno del sistema viene descritto dall'equazione di bilancio di materia espresso in termini molari, presentato nell'equazione (3.3). Questa equazione è espressa nella forma relativa a un singolo componente *i*-esimo e rappresenta quindi la conservazione di materia del solo componente *i*-esimo. Tuttavia essa viene declinata per tutti gli *N* componenti, andando quindi a descriverli interamente, e le singole equazioni di bilancio consentono di risalire all'equazione di bilancio di materia globale, laddove venga realizzata una sommatoria su tutti i componenti.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \nabla \cdot C_i \mathbf{u} + \nabla \cdot \mathbf{J}_i^* = R_i \quad i=1,2,3,\dots,N \quad (3.3)$$

L'equazione (3.3) contiene tutte le componenti tipiche di una equazione di bilancio. In particolare:

- $\frac{\partial C_i}{\partial t}$  esprime il termine di accumulo dell'equazione di bilancio, ovvero la variazione nel tempo della concentrazione della specie *i*-esima, quando si operi in un sistema non stazionario.

- $\nabla \cdot C_i \mathbf{u}$  esprime il termine di trasporto convettivo molare di materia e descrive la differenza tra la portata uscente e la portata entrante della specie  $i$ -esima. Di conseguenza la portata molare convettiva netta è fornita dall'opposto di questo termine.
- $\nabla \cdot \mathbf{J}_i^*$  esprime il termine di trasporto diffusivo molare di materia e anch'esso si presenta come la differenza tra la portata uscente e la portata entrante della specie  $i$ -esima.  $\mathbf{J}_i^*$  rappresenta il flusso diffusivo molare della specie  $i$ -esima.
- $R_i$  esprime il termine di generazione di materia della specie  $i$ -esima dovuto alla presenza di reazioni chimiche.

Dall'equazione (3.3) si può ricavare, inoltre, la relazione che esprime il flusso molare totale  $\mathbf{N}_i$  per una specie  $i$ -esima, visibile nell'equazione (3.4), il quale racchiude la componente di flusso convettivo e di flusso diffusivo.

$$\mathbf{N}_i = \mathbf{J}_i^* + C_i \mathbf{u} \quad (3.4)$$

Nelle equazioni precedenti, il flusso diffusivo non viene mai esplicitato, rimanendo espresso come  $\mathbf{J}_i^*$ . Tuttavia risulta necessario esprimerlo con una relazione che consenta di definirlo in funzione della concentrazione della specie  $i$ -esima: questa relazione è costituita dalla prima legge di Fick, presentata nell'equazione (3.5).

$$\mathbf{J}_i^* = -D_i \nabla C_i \quad (3.5)$$

Nell'equazione (3.5), il coefficiente  $D_i$  esprime il coefficiente di diffusività della specie  $i$ -esima.

Procedendo a questo punto a sostituire la relazione (3.5) all'interno dell'equazione (3.3), si ottiene la forma finale del bilancio molare di materia per la specie  $i$ -esima, come descritto dall'equazione (3.6).

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \nabla \cdot C_i \mathbf{u} + \nabla \cdot (-D_i \nabla C_i) = R_i \quad (3.6)$$

L'equazione (3.6) si presenta nella sua forma conservativa, ma, sviluppando il termine convettivo e considerando un fluido incomprimibile, quest'ultimo termine si semplifica (risulta nulla la divergenza del vettore velocità  $\mathbf{u}$ ) e restituisce la forma non conservativa dell'equazione di bilancio, come espressa nella relazione (3.7).

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla C_i + \nabla \cdot (-D_i \nabla C_i) = R_i \quad (3.7)$$

### 3.1.2 Fluidodinamica

La componente fluidodinamica del sistema, tesa a descrivere il moto del fluido all'interno dello stesso sistema, viene rappresentata mediante l'equazione (3.8) di bilancio di quantità di moto per unità di volume.

$$\frac{\partial(\rho\mathbf{u})}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho\mathbf{u}\mathbf{u}) = -\nabla p - \nabla \cdot \boldsymbol{\tau} + \rho\mathbf{g} + \mathbf{F} \quad (3.8)$$

L'equazione (3.8), valida in assenza di turbolenza, presenta tutti gli elementi propri di un'equazione di bilancio, in particolare:

- $\frac{\partial(\rho\mathbf{u})}{\partial t}$  rappresenta il termine di accumulo della quantità di moto.
- $\nabla \cdot (\rho\mathbf{u}\mathbf{u})$  costituisce il termine di trasporto convettivo della quantità di moto, considerando la differenza tra portata uscente e portata entrante.
- $-\nabla p$  rappresenta il termine di produzione di quantità di moto dovuto agli sforzi di pressione.
- $-\nabla \cdot \boldsymbol{\tau}$  costituisce il termine di generazione dovuto agli sforzi viscosi, laddove  $\boldsymbol{\tau}$  rappresenta l'opposto del tensore deviatorio (quest'ultimo esprime, appunto, gli sforzi viscosi nel fluido). Il mero termine privato del segno negativo esprimerebbe la componente di trasporto diffusivo della quantità di moto, sempre nella forma uscente meno entrante.
- $\rho\mathbf{g}$  rappresenta la componente di generazione di quantità di moto dovuta all'interazione gravitazionale;  $\mathbf{g}$  infatti esprime il vettore accelerazione gravitazionale.
- $\mathbf{F}$  rappresenta tutte le componenti di generazione dovute a forze esterne di volume.

Considerando, successivamente, un sistema con fluido a densità costante, l'equazione (3.8) si semplifica nella forma descritta nell'equazione (3.9).

$$\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \rho(\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = -\nabla p - \nabla \cdot \boldsymbol{\tau} + \rho\mathbf{g} + \mathbf{F} \quad (3.9)$$

Anche in questo caso, come per il trasporto di materia, diviene necessario esplicitare il flusso diffusivo  $\boldsymbol{\tau}$  mediante una relazione che permetta di ottenerlo in funzione della velocità  $\mathbf{u}$ . Questa relazione, osservabile nell'equazione (3.10), è fornita dalla legge di Newton.

$$\boldsymbol{\tau} = -\mu \left[ \left( \nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T \right) - \frac{2}{3} (\nabla \cdot \mathbf{u}) \mathbf{I} \right] \quad (3.10)$$

Nell'equazione (3.10), il coefficiente  $\mu$  rappresenta la viscosità dinamica del fluido in esame, l'esponente T rappresenta la trasposta della matrice in argomento e  $\mathbf{I}$  costituisce la matrice identità.

Procedendo, a questo punto, a considerare un sistema con la presenza del fenomeno turbolento, uno dei modelli disponibili è il modello k-ε standard che si avvale dell'impiego della velocità mediata secondo la media di Reynolds. Questo modello si avvale di due equazioni di trasporto ulteriori per consentire il calcolo delle due nuove variabili che vengono introdotte per la chiusura delle equazioni, ovvero l'energia cinetica turbolenta  $k$  (3.11) e la velocità di dissipazione turbolenta  $\varepsilon$  (3.12).

$$\rho \frac{\partial k}{\partial t} + \rho \mathbf{u} \cdot \nabla k = \nabla \cdot \left( \left( \mu + \frac{\mu_T}{\sigma_k} \right) \nabla k \right) + \mathbf{P}_k - \rho \varepsilon \quad (3.11)$$

$$\rho \frac{\partial \varepsilon}{\partial t} + \rho \mathbf{u} \cdot \nabla \varepsilon = \nabla \cdot \left( \left( \mu + \frac{\mu_T}{\sigma_\varepsilon} \right) \nabla \varepsilon \right) + C_{\varepsilon 1} \frac{\varepsilon}{k} \mathbf{P}_k - C_{\varepsilon 2} \rho \frac{\varepsilon^2}{k} \quad (3.12)$$

Le due equazioni (3.11) e (3.12) presentano una forma simile e vi si possono individuare i medesimi termini. Il primo termine rappresenta l'accumulo della quantità in esame, il secondo il suo trasporto per via convettiva, il terzo il suo trasporto per via diffusiva, il quarto è un termine di produzione e, infine, il quinto è un termine di dissipazione.

Nelle due equazioni compaiono anche alcune grandezze non ancora definite, come le costanti  $C_{\varepsilon 1}$ ,  $C_{\varepsilon 2}$ ,  $\sigma_k$  e  $\sigma_\varepsilon$  che rappresentano dei valori fissi propri del modello, il termine  $\mathbf{P}_k$  di produzione dell'energia cinetica turbolenta, la cui espressione è osservabile in equazione (3.13), e il termine  $\mu_T$  di viscosità dinamica turbolenta, espresso dalla relazione (3.14).

$$\mathbf{P}_k = \mu_T \left[ \nabla \mathbf{u} : (\nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T) - \frac{2}{3} (\nabla \cdot \mathbf{u})^2 \right] - \frac{2}{3} \rho k \nabla \cdot \mathbf{u} \quad (3.13)$$

$$\mu_T = \rho C_\mu \frac{k^2}{\varepsilon} \quad (3.14)$$

Nell'equazione (3.14) compare  $C_\mu$ , un'ulteriore costante che presenta un valore fisso proprio del modello di turbolenza adottato.

Avvalendosi del modello k-ε standard, anche l'equazione del tensore  $\boldsymbol{\tau}$  si modifica, restituendo una legge di Newton modificata, come espressa nella relazione (3.15).

$$\boldsymbol{\tau} = -(\mu + \mu_T) \left[ (\nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T) - \frac{2}{3} (\nabla \cdot \mathbf{u}) \mathbf{I} \right] + \frac{2}{3} \rho k \mathbf{I} \quad (3.15)$$

Considerando, ulteriormente, di operare con un sistema bifasico, diviene necessario inserire nuove equazioni o modificare alcune delle precedenti. In particolare, la velocità  $\mathbf{u}$  del sistema diviene una media pesata sulla massa tra le velocità delle due fasi, come descritto dalla relazione (3.16).

$$\mathbf{u} = \frac{\phi_c \rho_c \mathbf{u}_c + \phi_d \rho_d \mathbf{u}_d}{\rho} \quad (3.16)$$

Nell'equazione (3.16), si individuano alcuni termini e, in particolare:

- $\phi_c$  e  $\phi_d$  rappresentano le frazioni volumiche rispettivamente della fase continua e di quella dispersa.
- $\mathbf{u}_c$  e  $\mathbf{u}_d$  rappresentano i vettori velocità rispettivamente della fase continua e di quella dispersa.
- $\rho_c$  e  $\rho_d$  rappresentano le densità rispettivamente della fase continua e di quella dispersa.
- $\rho$  rappresenta la densità della miscela, espressa dalla relazione (3.17).

$$\rho = \phi_c \rho_c + \phi_d \rho_d \quad (3.17)$$

Per valutare il valore della frazione volumica della fase dispersa, viene considerata un'equazione di trasporto di questa grandezza, come presentata nella relazione (3.18),

$$\frac{\partial}{\partial t}(\phi_d \rho_d) + \nabla \cdot (\phi_d \rho_d \mathbf{u}_d) = -m_{dc} \quad (3.18)$$

dove compare nuovamente un termine di accumulo (il primo) e uno di trasporto convettivo (il secondo), più il termine  $m_{dc}$  che denota il trasferimento di materia dalla fase dispersa a quella continua. Se, poi, si suppone costante la densità della fase dispersa, la relazione (3.18) si semplifica nella forma data dalla relazione (3.19).

$$\frac{\partial \phi_d}{\partial t} + \nabla \cdot (\phi_d \mathbf{u}_d) = -\frac{m_{dc}}{\rho_d} \quad (3.19)$$

Per la risoluzione dell'equazione (3.19), è necessaria una ulteriore relazione che permetta di ottenere un valore per la velocità della fase dispersa  $\mathbf{u}_d$  e questa deriva dall'espressione (3.20),

$$\mathbf{u}_d - \mathbf{u}_c = \mathbf{u}_{slip} - \frac{D_{md}}{(1-c_d)\phi_d} \nabla \phi_d \quad (3.20)$$

dove  $\mathbf{u}_{slip}$  rappresenta la velocità relativa tra le due fasi: essa è nulla in caso di flusso omogeneo oppure può essere descritta mediante l'impiego di plurimi modelli. In aggiunta a questa velocità, si presenta la frazione massica  $c_d$  della fase dispersa, descritta dalla relazione (3.21), e il coefficiente di dispersione turbolenta, espresso dalla formula (3.22),

$$c_d = \frac{\phi_d \rho_d}{\rho} \quad (3.21)$$

$$D_{md} = \frac{\mu_T}{\rho \sigma_T} \quad (3.22)$$

dove  $\sigma_T$  è il numero di Schmidt particellare turbolento.

Combinando l'equazione (3.20) con la (3.16), la (3.17) e la (3.21), si ottiene l'espressione (3.23) per la velocità della fase dispersa.

$$\mathbf{u}_d = \mathbf{u} + (1-c_d) \mathbf{u}_{slip} - \frac{D_{md}}{\phi_d} \nabla \phi_d \quad (3.23)$$

In aggiunta a queste relazioni, assumendo inoltre come costanti le densità della fase dispersa e di quella continua, anche l'equazione di continuità si presenta in una forma leggermente modificata, come descritta dalla relazione (3.24).

$$(\rho_c - \rho_d) \left[ \nabla \cdot (\phi_d (1 - c_d) \mathbf{u}_{slip} - D_{md} \nabla \phi_d) + \frac{m_{dc}}{\rho_d} \right] + \rho_c (\nabla \cdot \mathbf{u}) = 0 \quad (3.24)$$

Infine, anche l'equazione (3.8) di bilancio di quantità di moto subisce delle modifiche, determinate dall'aggiunta del fenomeno turbolento, dalla presenza del sistema bifasico e dall'assunzione di operare con densità costanti, restituendo l'equazione (3.25).

$$\begin{aligned} \rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \rho (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = \nabla \cdot \left[ -p \mathbf{I} + (\mu + \mu_T) \left( \nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T - \frac{2}{3} (\nabla \cdot \mathbf{u}) \mathbf{I} \right) - \frac{2}{3} \rho k \mathbf{I} \right] + \\ - \nabla \cdot \left[ \rho c_d (1 - c_d) \left( \mathbf{u}_{slip} - \frac{D_{md}}{(1 - c_d)} \frac{\nabla \phi_d}{\phi_d} \right) \left( \mathbf{u}_{slip} - \frac{D_{md}}{(1 - c_d)} \frac{\nabla \phi_d}{\phi_d} \right)^T \right] + \rho \mathbf{g} + \mathbf{F} \end{aligned} \quad (3.25)$$

### 3.1.3 Trasporto di energia

La descrizione della componente termodinamica del sistema e, in particolare, della temperatura viene effettuata tramite lo studio del trasporto di energia, che risulta descritto in modo funzionale dall'equazione (3.26) di bilancio entalpico per i fluidi.

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} + \rho C_p \mathbf{u} \cdot \nabla T + \nabla \cdot \mathbf{q} = Q_p + Q_{vd} + Q_r + Q \quad (3.26)$$

L'equazione (3.26) presenta i termini propri di una tipica equazione di bilancio e in particolare:

- $\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t}$  costituisce il termine di accumulo.
- $\rho C_p \mathbf{u} \cdot \nabla T$  rappresenta il termine di trasporto convettivo (uno dei meccanismi di trasmissione del calore), sempre nella forma portata uscente meno portata entrante.
- $\nabla \cdot \mathbf{q}$  rappresenta il termine di trasporto diffusivo di calore e, quindi, il termine di conduzione (un ulteriore meccanismo di trasmissione del calore).
- $Q_p$  rappresenta un termine di generazione dovuto al lavoro delle forze di pressione, come esplicitato nella relazione (3.27).
- $Q_{vd}$  rappresenta un termine di generazione dovuto agli sforzi viscosi nel fluido, come esplicitato nella relazione (3.28).
- $Q_r$  rappresenta il termine di generazione dovuto all'irraggiamento (un ultimo meccanismo di trasmissione del calore).

- $Q$  rappresenta un generico termine di generazione di calore, non dovuto ai fenomeni precedentemente citati.

Procedendo a sostituire le relazioni (3.27) e (3.28) all'interno dell'equazione (3.26) e descrivendo il flusso conduttivo mediante la legge di Fourier (eq. (3.29)), in analogia ai trasporti di quantità di moto e di materia, si ottiene l'equazione (3.30) esplicita di bilancio di entalpia per i fluidi. Quest'ultima risulta derivata, mediante opportuni passaggi, dall'equazione più generale (3.31) di bilancio di energia globale.

$$Q_p = \alpha_p T \left( \frac{\partial p}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla p \right) \quad (3.27)$$

dove  $\alpha_p = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial \rho}{\partial T}$  rappresenta il coefficiente di espansione termica.

$$Q_{vd} = -\boldsymbol{\tau} : \nabla \mathbf{u} \quad (3.28)$$

dove  $\boldsymbol{\tau}$  risulta esplicitato dalla relazione (3.10).

$$\mathbf{q} = -k \nabla T \quad (3.29)$$

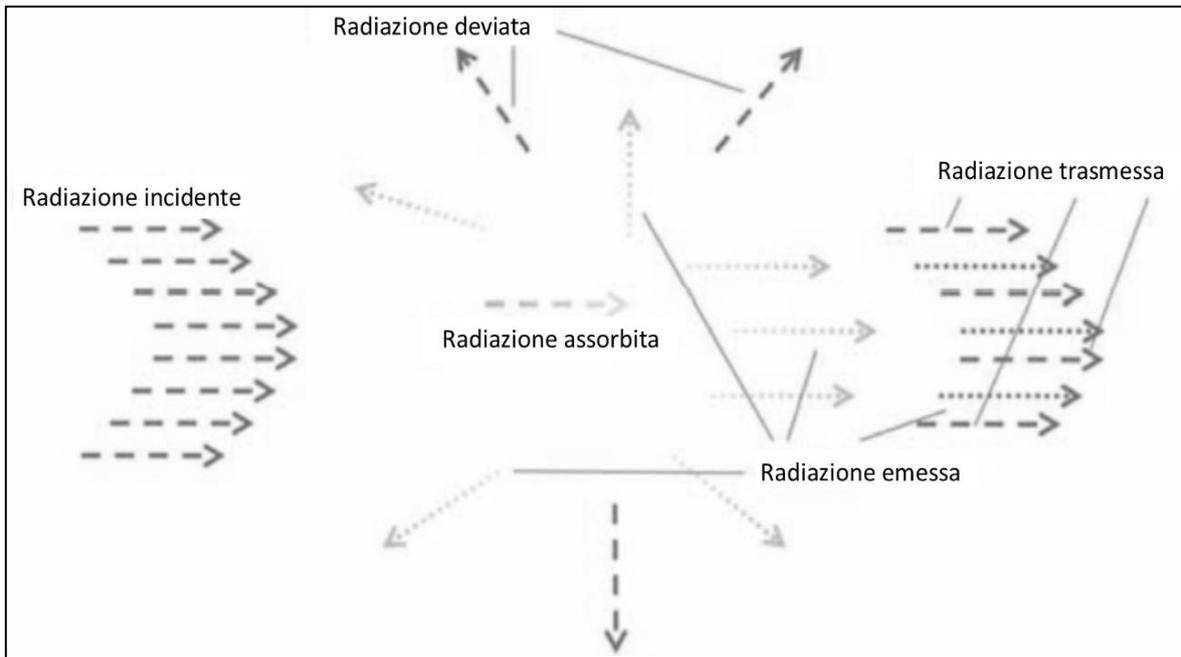
dove  $k$  rappresenta il coefficiente di conducibilità termica.

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} + \rho C_p \mathbf{u} \cdot \nabla T - k \nabla^2 T = \alpha_p T \left( \frac{\partial p}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla p \right) - \boldsymbol{\tau} : \nabla \mathbf{u} + Q_r + Q \quad (3.30)$$

$$\rho \frac{\partial E}{\partial t} + \rho \mathbf{u} \cdot \nabla E + \nabla \cdot \mathbf{q} = -\nabla \cdot (\rho \mathbf{u}) - \nabla \cdot (\boldsymbol{\tau} \cdot \mathbf{u}) + Q_r + Q \quad (3.31)$$

Le equazioni e le definizioni considerate finora non hanno previsto l'esplicitazione della componente di trasmissione di calore per irraggiamento, che è stata semplicemente inclusa, all'interno delle varie relazioni citate, mediante il termine  $Q_r$ . Nel sistema da modellare, inoltre, è presente un fluido non trasparente che, quindi, interagisce con i raggi luminosi, perciò la descrizione del fenomeno dell'irraggiamento deve tenere necessariamente conto anche delle interazioni tra luce e *medium* (figura (3.1)). I fenomeni che si possono verificare quando questa interazione ha luogo possono essere raccolti sotto tre categorie:

- Assorbimento, secondo cui una parte della radiazione incidente viene assorbita dal fluido.
- Emissione, secondo cui il *medium* emette della radiazione in ogni direzione.
- *Scattering*, secondo cui il fluido devia una frazione della radiazione proveniente da una direzione verso altre direzioni. Questo fenomeno può sia attenuare la radiazione in una data direzione, a causa del fatto che ne devia una parte, sia aumentarla, in quanto parti di radiazione deviate da altre direzioni possono giungere lungo la direzione considerata.



**Figura 3.1:** Fenomeni di interazione tra una radiazione incidente e un mezzo non trasparente. (Figura tratta da (COMSOL®, 2017) con modifiche)

Questi fenomeni vengono considerati e quantificati all'interno dell'equazione (3.32) di trasporto dell'intensità irraggiata.

$$\Omega \cdot \nabla I(\Omega) = -\kappa I(\Omega) - \sigma_s I(\Omega) + \frac{\sigma_s}{4\pi} \left[ \int_{4\pi} I(\Omega') \Phi(\Omega', \Omega) d\Omega' \right] + \kappa I_b(T) \quad (3.32)$$

Nell'equazione (3.32), si individuano i termini:

- $\Omega \cdot \nabla I(\Omega)$  che rappresenta il trasporto della proprietà  $I(\Omega)$ , ovvero l'intensità irraggiata lungo la direzione individuata dall'angolo solido  $\Omega$ .
- $\kappa I(\Omega)$  che rappresenta la quantità di intensità irraggiata assorbita e si presenta con il segno meno nell'equazione, in quanto viene sottratta dall'intensità totale.  $\kappa$  indica il coefficiente di assorbimento.
- $\sigma_s I(\Omega)$  che rappresenta la quantità di intensità irraggiata interessata dall'attenuazione dovuta al fenomeno di *scattering*: essendo un'attenuazione, il termine viene appunto sottratto.  $\sigma_s$  indica il coefficiente di *scattering*.
- $\frac{\sigma_s}{4\pi} \int_{4\pi} I(\Omega') \Phi(\Omega', \Omega) d\Omega'$  che rappresenta la quantità di intensità irraggiata apportata dal fenomeno di *scattering*. Compare in questo caso l'angolo  $\Omega'$ , che indica le varie direzioni diverse da quella considerata, e il termine  $\Phi(\Omega', \Omega)$  che indica la funzione di fase dello *scattering*, ovvero la probabilità che un raggio proveniente dalla direzione  $\Omega'$  venga deviato verso la direzione  $\Omega$ .

- $\kappa I_b(T)$  che rappresenta la quantità di intensità irraggiata emessa, dove  $I_b(T)$  indica l'intensità irraggiata da un corpo nero, la cui dipendenza dalla temperatura è indicata nella relazione (3.33). In questa,  $n_r$  indica l'indice di rifrazione del mezzo e  $\sigma$  è la costante di Stefan-Boltzmann.

$$I_b(T) = \frac{n_r^2 \sigma T^4}{\pi} \quad (3.33)$$

Mediante l'intensità irraggiata  $I(\Omega)$ , di cui ne è stata fornita l'equazione di trasporto, si può definire il flusso di calore per irraggiamento  $\mathbf{q}_r$ , come descritto nella relazione (3.34). La divergenza di quest'ultimo, successivamente, costituisce il termine di generazione  $Q_r$  dell'equazione (3.26), esprimibile anche in funzione della radiazione incidente (definita in equazione (3.35)) e della temperatura, come riscontrabile nella relazione (3.36).

$$\mathbf{q}_r = \int_{4\pi} I(\Omega) \Omega d\Omega \quad (3.34)$$

$$G = \int_{4\pi} I(\Omega) d\Omega \quad (3.35)$$

$$Q_r = \nabla \cdot \mathbf{q}_r = \kappa(G - 4\pi I_b(T)) \quad (3.36)$$

Procedendo, quindi, a sostituire le relazioni (3.33) e (3.36) all'interno dell'equazione (3.30), si ottiene la forma finale del bilancio di entalpia visibile nella formula (3.37).

$$\rho C_p \left( \frac{\partial T}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla T \right) - \mathbf{k} \nabla^2 T = \kappa(G - 4n_r^2 \sigma T^4) + \alpha_p T \left( \frac{\partial p}{\partial t} + \mathbf{u} \cdot \nabla p \right) - \boldsymbol{\tau} : \nabla \mathbf{u} + Q \quad (3.37)$$

Considerando la relazione (3.37), risulta necessario individuare una via per valutare la radiazione incidente, prima di poter risolvere l'equazione. Questo può essere effettuato tramite metodologie differenti, una delle quali è costituita dal metodo di approssimazione P1, che assume il mezzo colpito dalla radiazione come otticamente spesso e il fenomeno dello *scattering* come lineare isotropo.

Il metodo citato tiene conto dell'equazione (3.32) di trasporto dell'intensità irraggiata, che contribuisce alla definizione della radiazione incidente, risolvendo un'equazione semplificata per quest'ultima, come descritto nella relazione (3.38),

$$-\nabla \cdot (D_{P1} \nabla G) = Q_r = \kappa(G - 4\pi I_b) \quad (3.38)$$

dove  $D_{P1}$  rappresenta il coefficiente di diffusione P1, definito nella relazione (3.39).

$$D_{p1} = \frac{1}{3\kappa + 3\sigma_s} \quad (3.39)$$

### 3.1.4 Reazioni chimiche

La modellazione delle reazioni chimiche che possono avere luogo all'interno del sistema viene effettuata mediante la tipica equazione cinetica, descritta dalla relazione (3.40), nella quale  $k$  rappresenta la costante cinetica definita dalla legge di Arrhenius (equazione (3.41)),  $R_i$  è la velocità di reazione della specie  $i$ -esima e  $A, B, C$  costituiscono le specie reagenti con i rispettivi coefficienti stechiometrici  $a, b, c$ .

$$R_i = k(T)[A]^a [B]^b [C]^c \dots \quad (3.40)$$

$$k(T) = A e^{-\frac{\Delta E_a}{RT}} \quad (3.41)$$

Nell'equazione (3.41),  $A$  è il fattore pre-esponenziale e  $\Delta E_a$  l'energia di attivazione.

Per quanto concerne, invece, la descrizione del fenomeno dell'assorbimento delle specie gassose all'interno di un liquido, viene impiegata la legge di Henry, che assume la concentrazione della specie nella fase gassosa in equilibrio con la concentrazione della medesima specie nella fase liquida. Questa legge è riassunta nell'equazione (3.42), dove  $C_{i,l}$  è la concentrazione della specie  $i$ -esima in fase liquida,  $H_i$  è la costante di Henry e  $p_i$  la pressione parziale del gas  $i$ -esimo. Essa può essere ricondotta all'equazione (3.43) (con  $C_{i,g}$  concentrazione in fase gassosa della specie  $i$ -esima), mediante la legge di stato dei gas.

$$C_{i,l} = H_i p_i \quad (3.42)$$

$$C_{i,l} = H_i R T C_{i,g} \quad (3.43)$$

In aggiunta a quanto affermato, resta da descrivere la ben più importante velocità di crescita del microrganismo, fatto che risulta tipicamente più complesso delle normali cinetiche di reazione. Il modello più comunemente utilizzato è quello di Monod (espresso nella relazione (3.44)), che tiene conto di come una carenza di substrato possa rallentare e infine interrompere la crescita di un microrganismo: questo parametro è importante, perché è un fenomeno reale e trascurarlo porterebbe a descrivere la crescita batterica mediante una curva esponenziale, completamente impossibile da realizzarsi in natura.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \quad (3.44)$$

L'equazione (3.44) di Monod presenta al suo interno i termini  $\mu$  e  $\mu_{\max}$  che rappresentano rispettivamente il tasso di crescita specifico e il tasso di crescita specifico massimo, il termine  $S$  che esprime la concentrazione di substrato e il termine  $K_s$  che costituisce una costante; risulta evidente come il tasso di crescita specifico massimo venga raggiunto con un largo eccesso di substrato ( $S \rightarrow +\infty$ ). Il tasso

di crescita specifico  $\mu$  rappresenta per la crescita del microrganismo ciò che la costante cinetica costituisce per una reazione chimica, quindi la velocità di crescita  $R_B$  del batterio risulta definita da (3.45), dove  $C_B$  rappresenta la concentrazione di biomassa.

$$R_B = \mu C_B \quad (3.45)$$

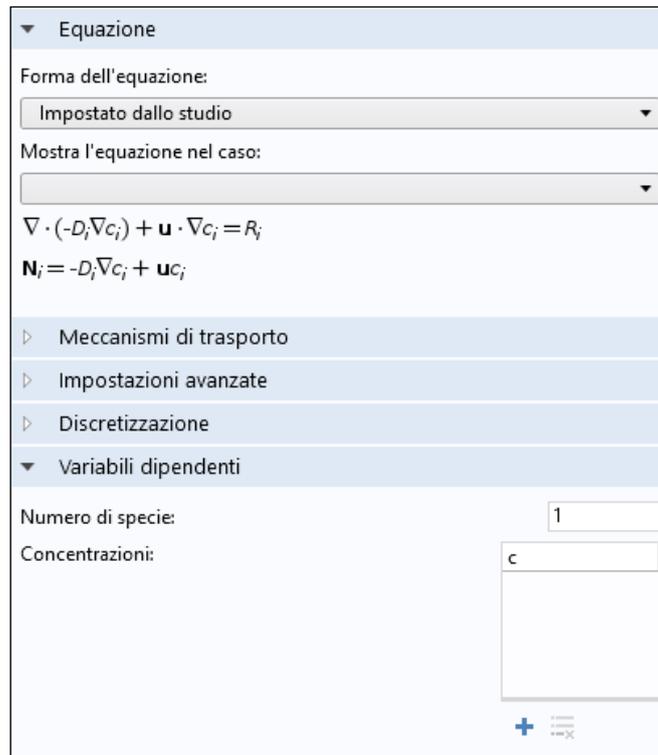
Per quanto concerne i cianobatteri in particolare, diviene necessario considerare la dipendenza di  $\mu$  dalla intensità luminosa, poiché questa costituisce, come già affermato, un fattore tipicamente limitante, più di quanto lo sia la concentrazione di substrato. Per descrivere questa dipendenza sono state proposte molteplici relazioni e, nello specifico, una di queste, figlia dell'equazione di Monod, può essere adottata. Questa relazione, derivata dal modello di Aiba (Aiba, 1982), viene adattata al tasso di crescita specifico, come descritto dall'equazione (3.46) (Tamburic et al., 2012; Zhang et al., 2015).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot I}{k_s + I + \frac{I^2}{k_i}} \quad (3.46)$$

Nella relazione (3.46)  $\mu$  e  $\mu_{\max}$  rappresentano sempre il tasso di crescita specifico e il tasso di crescita specifico massimo,  $I$  rappresenta l'intensità luminosa,  $k_s$  è una costante che rappresenta la saturazione luminosa e  $k_i$  una costante legata al fenomeno della fotoinibizione. In particolare, questa relazione è interessante, perché, oltre a considerare il raggiungimento di un valore massimo per  $\mu$  quando l'intensità luminosa è elevata, descrive anche il fenomeno della fotoinibizione; infatti il termine  $\frac{I^2}{k_i}$  è inserito per esprimere proprio quel fenomeno, in quanto se  $I \rightarrow +\infty$  allora  $\mu \rightarrow 0$ .

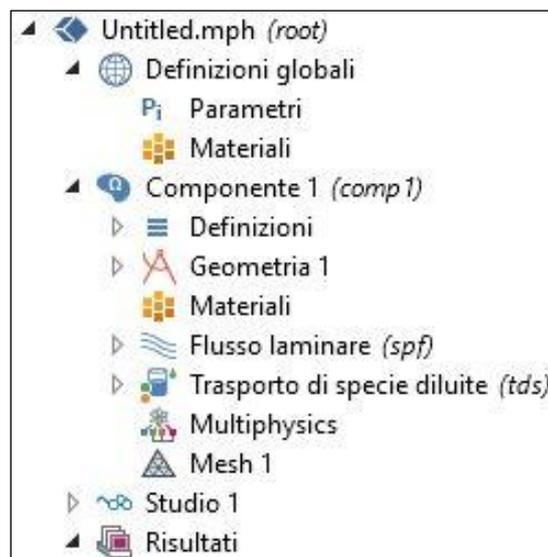
### 3.2 Piattaforma COMSOL®

Il software utilizzato per la modellazione del sistema considerato nel lavoro di tesi e per la realizzazione delle simulazioni è costituito dalla piattaforma COMSOL®. Questa piattaforma è costituita da una serie di componenti, dette fisiche, che permettono di descrivere singolarmente, con un approccio agli elementi finiti, uno specifico aspetto del sistema, come il trasporto di materia, la fluidodinamica, il trasporto di calore e molti altri. Inoltre, ogni fisica può considerare aspetti molto particolari di quelli generali citati, andando a descrivere situazioni specifiche e applicandosi a problemi e sistemi peculiari (es. flusso turbolento con bolle). Ogni fisica è costituita da e presenta una serie di equazioni che sono state implementate nel software e che permettono di descrivere analiticamente il fenomeno affrontato dalla fisica stessa; queste equazioni devono, successivamente, essere risolte durante la simulazione tramite metodi numerici, restituendo le variabili tipiche del fenomeno descritto dalla fisica, che sono definite come variabili dipendenti (esempio in figura (3.2)). Queste rappresentano, comunque, solo quelle principali, in quanto ogni fisica restituisce un'alta quantità di variabili ulteriori che sono strettamente legate a quelle principali.



**Figura 3.2:** Esempio di fisica (trasporto di specie diluite) con le due relative equazioni e le variabili dipendenti. (Figura ricavata da COMSOL®)

Sebbene le fisiche siano un elemento fondante della piattaforma, vi sono altre componenti necessarie alla modellazione e simulazione e queste possono essere osservate da un esempio di albero del modello in figura (3.3).



**Figura 3.3:** Esempio di albero del modello di COMSOL®, contenente i vari elementi costitutivi del modello stesso.

Si osserva una parte di “Definizioni globali” che permette di definire elementi validi per tutti i componenti del sistema modellato, come materiali, variabili e parametri. Infatti il sistema può essere

costituito da più componenti gestiti separatamente e la sezione “Definizioni globali” permette di definire gli elementi in comune una sola volta, mettendoli a disposizione di tutti i componenti e evitando all’utente l’onere di definizioni plurime.

Il blocco successivo “Componente 1” presenta tutti gli elementi costituenti la modellazione di quel componente del sistema globale. Si individuano una sezione di definizioni, una di geometria, una di materiali, le fisiche, le multifisiche e la *mesh*. La sezione “Definizioni” si comporta come quella globale solo applicandosi al mero componente, quindi le variabili o le funzioni, ad esempio, definite qui saranno valide solo nella modellazione del componente in esame. La sezione successiva, “Geometria 1”, è il punto in cui viene costruita la struttura geometrica del componente all’interno del *software*; è presente tutta una serie di elementi geometrici, quali cilindri, cerchi, rettangoli, segmenti e così via, di cui ci si può avvalere per la costruzione del componente. Inoltre COMSOL® presenta una finestra grafica in cui è possibile osservare passo a passo il risultato del lavoro di costruzione, permettendo altresì di accorgersi visivamente di eventuali errori commessi. La successiva sezione “Materiali” consente di definire i materiali di cui è costituito il componente, nonché indicarne i domini di appartenenza nella geometria; COMSOL® possiede, inoltre, un’ampia libreria contenente un elevato numero di materiali con molte proprietà già predefinite, consentendo così all’utente di scegliere gli eventuali materiali di utilità e aggiungerli alla sezione “Materiali”. In coda alla sezione “Materiali” compaiono una dopo l’altra tutte le fisiche di cui si avvale il modello, ognuna contenente le sue specifiche informazioni e le sue regole e condizioni impostate, in quanto ogni fisica necessita di dati e impostazioni specifici, differenti dalle altre. Dopo le varie fisiche, appare la sezione “Multiphysics” (multifisiche), dove è possibile, qualora implementato nel *software*, eseguire degli accoppiamenti tra fisiche differenti, ottenendo un’entità superiore che integra le informazioni contenute nelle fisiche accoppiate. L’ultima sezione del blocco è rappresentata dalla *mesh* (“Mesh 1”), punto in cui si procede a definire una griglia che suddivide i domini del componente in tante aree di dimensioni più o meno ridotte; queste aree costituiscono la discretizzazione dei domini e permettono di realizzare il calcolo per via numerica, il quale è un calcolo di tipo discreto.

Il terzo blocco è rappresentato da “Studio 1” ed è la sezione in cui si definisce la modalità di studio del problema modellato, ad esempio se in regime transitorio, e quindi con le variabili dipendenti dal tempo, o se in regime stazionario, con le variabili indipendenti dal tempo. Tuttavia, in questa sezione si possono anche modificare tutte le impostazioni e le regole legate al metodo numerico di calcolo, come le tolleranze e i passi temporali da considerare.

L’ultimo blocco, infine, è quello dei risultati (“Risultati”), dove vengono mostrati gli output del calcolo concluso e i vari diagrammi. Alcuni sono già presentati di default da COMSOL®, mentre altri devono essere definiti dall’utente, in base alle proprie necessità e alle variabili a cui è interessato.

### 3.3 Struttura del modello

#### 3.3.1 Definizioni globali - Parametri

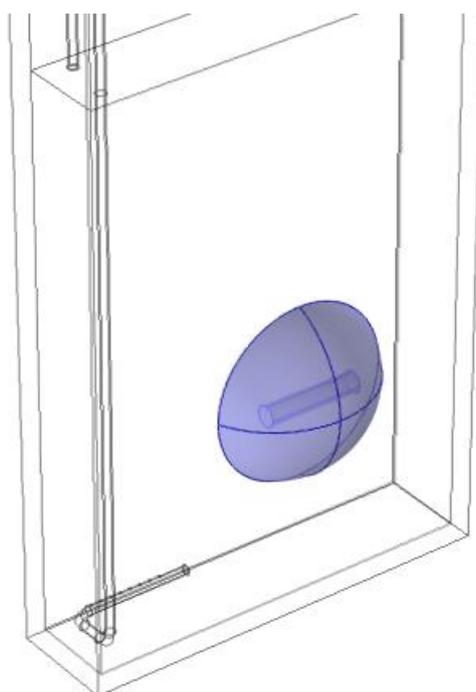
Nel blocco “Definizioni globali” si opera nella sezione “Parametri”, procedendo a definire tutte le costanti del modello. Se ne forniscono il nome, che verrà utilizzato dal *software*, il valore o l’espressione, e un’eventuale descrizione, per rendere più chiara la funzione del parametro. I parametri geometrici inseriti sono presentati nella seguente tabella (3.1).

**Tabella 3.1.** Parametri geometrici.

<b>Grandezza</b>	<b>Espressione</b>
<b>Altezza vessel di coltivazione</b>	19,83 cm
<b>Larghezza vessel</b>	11 cm
<b>Profondità vessel</b>	2,4 cm
<b>Spessore parete vessel</b>	3,3 mm
<b>Altezza zona di miscela</b>	16 cm
<b>Diametro esterno sparger</b>	3 mm
<b>Diametro interno sparger</b>	2 mm
<b>Lunghezza sezione perforata sparger</b>	3 cm
<b>Diametro fori sparger</b>	0,4 mm
<b>Distanza fori sparger</b>	3 mm
<b>Numero fori sparger</b>	8
<b>Diametro barra magnetica rotante</b>	3 mm
<b>Lunghezza barra magnetica rotante</b>	2,75 cm

### 3.3.2 Componente – Definizioni

Nella sezione “Definizioni” il principale elemento inserito è costituito dalla “Mesh mobile”; quest’ultima permette di definire il dominio rotante e, quindi, fornire al *software* le informazioni necessarie relative alla rotazione della barra magnetica. Il dominio rotante, visibile in figura (3.4), è costituito dalla semisfera che è stata costruita intorno alla barra magnetica e la velocità di rotazione angolare imposta è pari a 60 rpm.



**Figura 3.4:** Rappresentazione del dominio sferico costruito intorno alla barra magnetica per finalità computazionali, evidenziato in blu. (Figura ricavata da COMSOL®)

Inoltre, sempre in questa sezione possono essere definite un buon numero di funzioni tra cui una funzione rampa, la quale viene introdotta per evitare problematiche legate ai valori iniziali; infatti il *software* incontrerebbe difficoltà a passare, dall'istante zero a quello successivo, da un valore nullo a un valore subitaneamente maggiore, inoltre si presenterebbero problemi di coerenza tra i valori iniziali e di ingresso in prossimità degli ingressi al reattore. Conseguentemente, la funzione rampa viene applicata in particolare alla “Mesh mobile” e ai flussi in ingresso.

### 3.3.3 Componente – Geometria

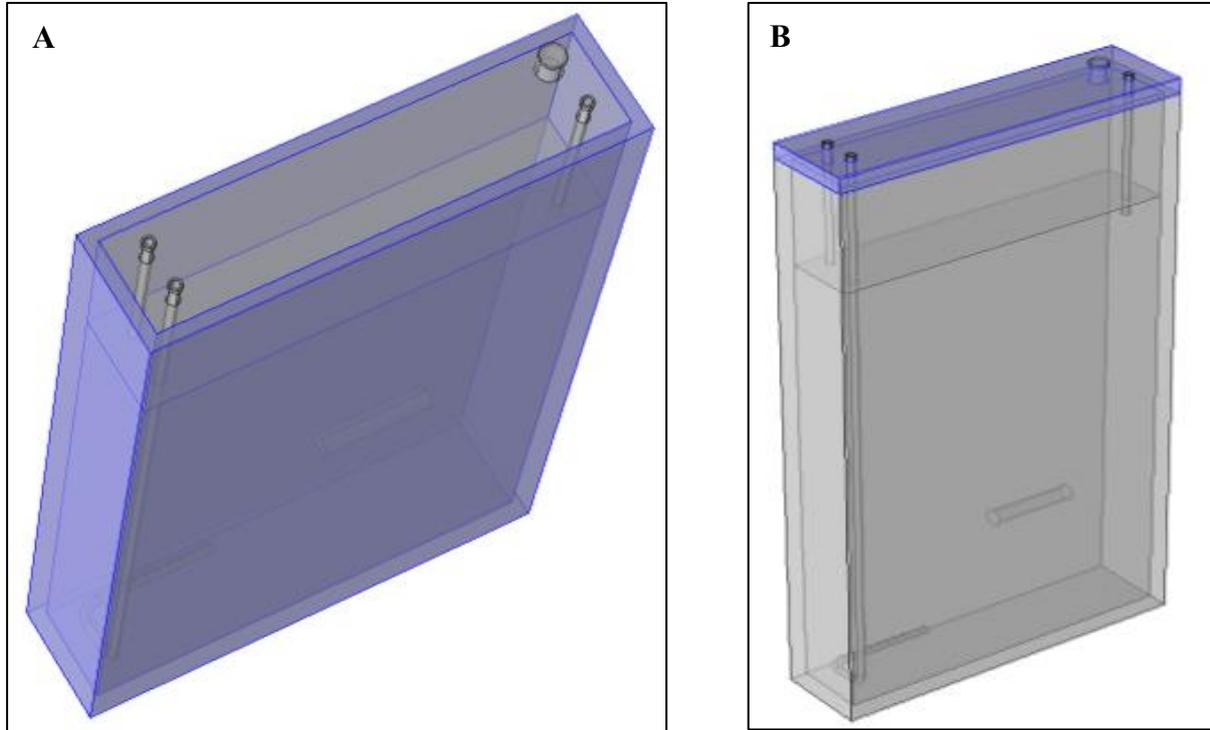
Nella sezione “Geometria” viene costruito il modello del fotobioreattore e in particolare del *vessel*, che rappresenta lo specifico elemento che richiede la modellazione, in quanto i vari fenomeni di interesse si verificano al suo interno. La figura 3D complessiva realizzata è visibile in figura (3.5).



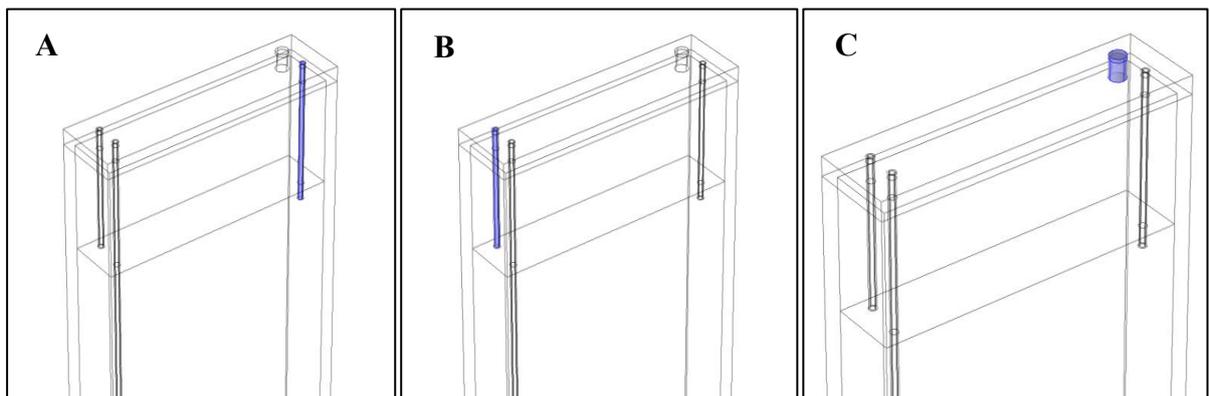
**Figura 3.5:** Modello tridimensionale del reattore, rappresentato in trasparenza. (Figura ricavata da COMSOL®)

All'interno dell'immagine (3.5) complessiva, si possono individuare tutti gli elementi di rilievo che costituiscono il modello del *vessel*. In particolare si osserva la presenza della struttura di contenimento, figura (3.6A), del coperchio di chiusura, figura (3.6B), del condotto per l'estrazione dei campioni, figura

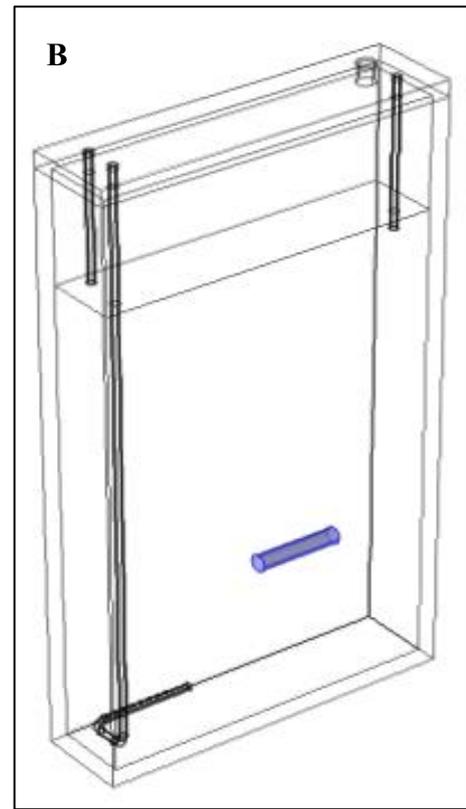
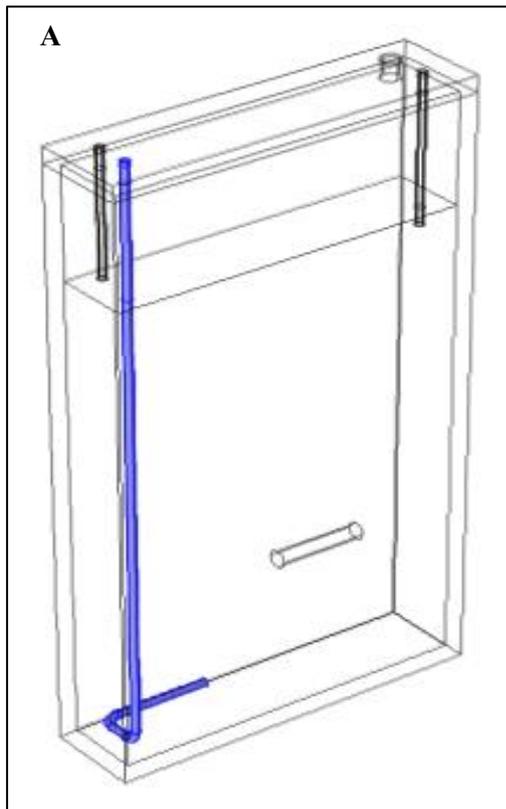
(3.7A), dell'ingresso per l'inoculo della biomassa, figura (3.7B), dell'uscita per *overflow* (operante anche per il gas), figura (3.7C), dello *sparger* a L, figura (3.8A), della barra magnetica rotante, figura (3.8B), della sezione occupata dal brodo di reazione, figura (3.9A), e della sezione di disimpegno dei gas, figura (3.9B).



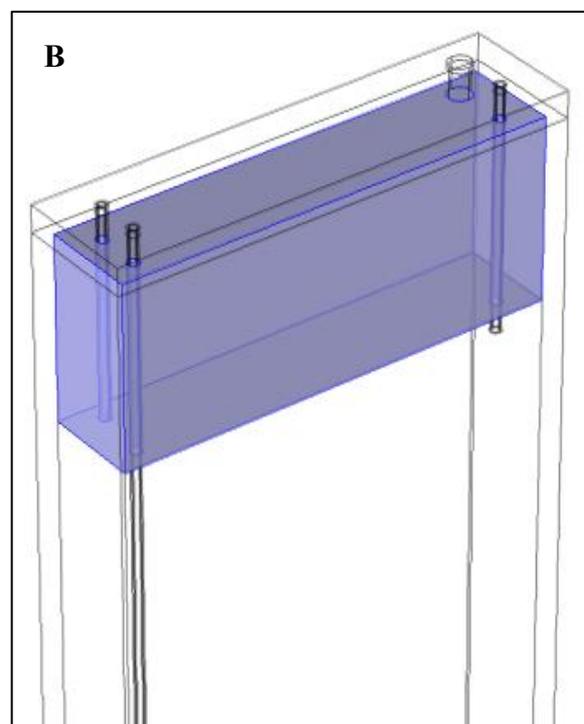
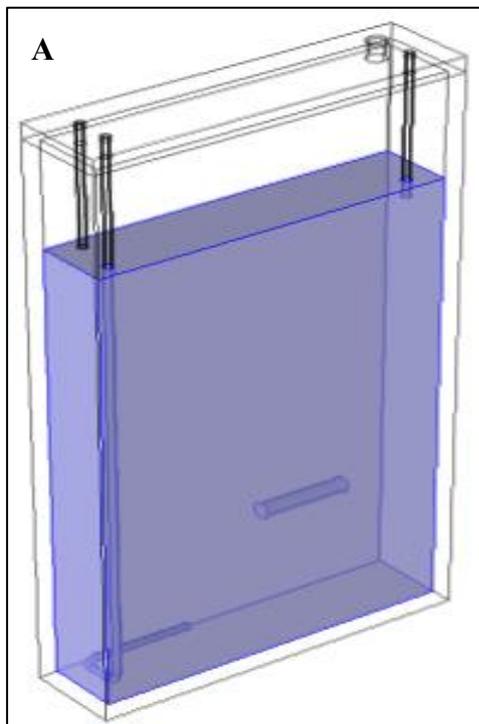
**Figura 3.6:** Modellazione della struttura di contenimento (A) e del coperchio di chiusura (B), evidenziati in blu. (Figura ricavata da COMSOL®)



**Figura 3.7:** Modellazione del condotto per l'estrazione dei campioni (A), dell'ingresso per l'inoculo della biomassa (B) e del foro per la rimozione dell'*overflow* nonché per l'uscita del gas (C), evidenziati in blu. (Figura ricavata da COMSOL®)



**Figura 3.8:** Modellazione dello *sparger* (A) e della barra magnetica rotante (B), evidenziati in blu. (Figura ricavata da COMSOL®)



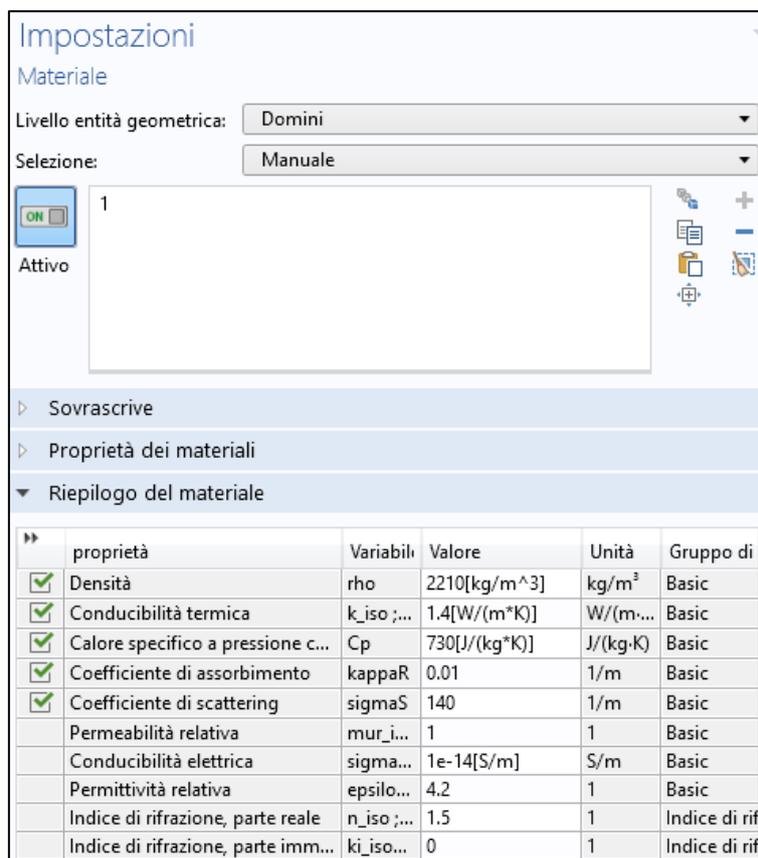
**Figura 3.9:** Modellazione della sezione contenente il brodo di reazione (A) e della sezione di disimpegno dei gas (B), evidenziate in blu. (Figura ricavata da COMSOL®)

In aggiunta alle strutture presentate, è stata inserita una calotta sferica tale da inglobare la barra magnetica e creare un dominio sferico intorno alla barra stessa. Le finalità di questa aggiunta sono state prettamente computazionali, in modo da poter diminuire i tempi di calcolo, grazie all'applicazione della *mesh* mobile al solo dominio sferico; l'immagine 3D con la presenza della calotta evidenziata è osservabile in figura (3.4).

### 3.3.4 Componente – Materiali

Nella sezione “Materiali” vengono introdotti i materiali di cui si compone la struttura modellata. Alcuni di essi, in particolare quelli afferenti alle sostanze contenute nel *vessel*, sono assegnati ai domini, ma le loro proprietà non saranno necessariamente utilizzate nella risoluzione delle varie equazioni, in quanto alcune saranno specificamente assegnate dall'utente e altre saranno valutate dalle fisiche nel processo risolutivo.

Vengono, quindi, definiti cinque tipi di materiale: l'acqua, l'anidride carbonica, l'aria, il vetro e l'acciaio inox. L'acqua viene assunta come approssimazione del brodo di reazione, mentre l'anidride carbonica rappresenta la categoria gassosa dispersa in esso. Conseguentemente, l'acqua viene assegnata al dominio evidenziato in figura (3.9A), mentre l'anidride carbonica non presenta dominio di assegnazione, in quanto interesserebbe il medesimo dominio assegnato all'acqua, ma risulterà poi definita come fase dispersa nella fisica “Modello di miscela”. Proseguendo, l'aria viene assegnata alla zona di disimpegno dei gas, in figura (3.9B), il vetro al dominio in figura (3.6A), ovvero alla struttura del *vessel*, e, infine, l'acciaio inox al coperchio di chiusura, presentato in figura (3.6B), alla base e a tutte le tubature. Tutti questi materiali presentano una sezione di esplicitazione (di cui in figura (3.10) è visibile l'esempio del vetro) di specifiche proprietà che vengono richieste dalle varie fisiche e delle quali alcune sono già fornite dalla libreria del software.

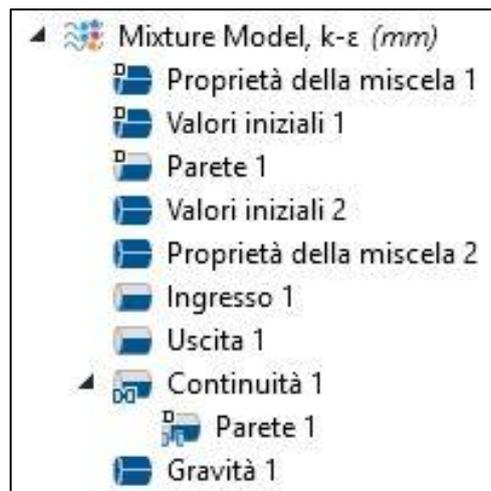


proprietà	Variabil	Valore	Unità	Gruppo di
<input checked="" type="checkbox"/> Densità	rho	2210[kg/m <sup>3</sup> ]	kg/m <sup>3</sup>	Basic
<input checked="" type="checkbox"/> Conducibilità termica	k_iso ;...	1.4[W/(m*K)]	W/(m...	Basic
<input checked="" type="checkbox"/> Calore specifico a pressione c...	Cp	730[J/(kg*K)]	J/(kg·K)	Basic
<input checked="" type="checkbox"/> Coefficiente di assorbimento	kappaR	0.01	1/m	Basic
<input checked="" type="checkbox"/> Coefficiente di scattering	sigmaS	140	1/m	Basic
Permeabilità relativa	mur_i...	1	1	Basic
Conducibilità elettrica	sigma...	1e-14[S/m]	S/m	Basic
Permittività relativa	epsilo...	4.2	1	Basic
Indice di rifrazione, parte reale	n_iso ;...	1.5	1	Indice di rif
Indice di rifrazione, parte imm...	ki_iso...	0	1	Indice di rif

**Figura 3.10:** Scheda di impostazione dei materiali afferente al vetro, con le varie proprietà inserite e quelle specificamente richieste, indicate con un segno di spunta. (Figura ricavata da COMSOL®)

### 3.3.5 Componente – Modello di miscela

La fisica utilizzata per la descrizione della componente fluidodinamica è quella definita “Modello di miscela”. Essa valuta in particolare le variabili: campo di velocità della miscela totale, campo di velocità delle singole componenti della miscela, pressione, frazione volumica della fase dispersa, quadrato della velocità di scorrimento e energia cinetica turbolenta. Questa fisica, inoltre, assume di operare con un sistema bifasico, assunzione che si adatta al sistema da modellare, in quanto esso può essere ricondotto a due sole fasi, una liquida e una gassosa; ovviamente le varie proprietà saranno valutate tenendo conto di tutte le singole componenti, restituendo, quindi, una fase gassosa che non avrà le proprietà di uno solo dei gas e una fase liquida che presenterà proprietà intermedie tra quelle dei componenti. Nella figura (3.11) viene presentato il sottoalbero della fisica con le varie condizioni inserite che verranno descritte nello specifico.



**Figura 3.11:** Sottoalbero della fisica “Modello di miscela”. (Figura ricavata da COMSOL®)

La fisica “Modello di miscela” risolve le equazioni già precedentemente esposte nel paragrafo 3.1.2 e, in particolare, tratta l’equazione (3.25) di bilancio di quantità di moto con l’applicazione del modello di turbolenza k-ε standard (i cui parametri sono presentati in tabella (3.2)), che introduce, tra le altre, le due equazioni (3.11) e (3.12) di trasporto dell’energia cinetica turbolenta e della velocità di dissipazione turbolenta. Queste equazioni e, più in generale, la fisica vengono applicate ai domini interessati dal brodo di reazione e dalla sezione di disimpegno del gas, in quanto è per essi che la componente fluidodinamica è di interesse. Nella fisica, la fase dispersa viene fissata come “Bolle/gocce di liquido”, siccome essa è costituita da una miscela gassosa e si presenta pertanto sotto forma di bolle.

**Tabella 3.2.** Parametri per le equazioni di turbolenza.

Parametro	Valore
$C_{\epsilon 1}$	1,44
$C_{\epsilon 2}$	1,92
$C_{\mu}$	0,09
$\sigma_k$	1
$\sigma_{\epsilon}$	1,3
$\sigma_T$	0,35

Considerando le “Proprietà della miscela 1”, proprie del brodo di reazione, il materiale acqua viene definito come fase continua e il materiale anidride carbonica come fase dispersa, anche se l’assegnazione risulta puramente convenzionale, poiché le effettive proprietà della miscela richieste (densità e viscosità dinamica delle fasi continua e dispersa) vengono ricavate dalle fisiche “Chimica”, che modellano le generali reazioni chimiche e il fenomeno dell’assorbimento gassoso.

Le “Proprietà della miscela 2”, proprie della zona di disimpegno dei gas, presentano impostazioni simili a quelle precedenti, se si eccettua la fase continua costituita da aria e le sue proprietà non calcolate dalla fisica “Chimica”, bensì valutate direttamente dal software in base alle condizioni di temperatura e pressione.

Spostandosi sui “Valori iniziali” dei domini considerati, presentati in tabella (3.3), le variabili da fissare all’inizio del procedimento di calcolo sono il campo di velocità della miscela, la pressione, l’energia cinetica turbolenta e la velocità di dissipazione turbolenta. Il campo di velocità viene posto interamente a zero, poiché il sistema viene considerato immobile prima di iniziare il processo di insufflaggio e di agitazione, la pressione viene descritta mediante una semplice legge di Stevino, per tenere conto della profondità del fluido, mentre l’energia cinetica turbolenta e la velocità di dissipazione turbolenta vengono espresse tramite un valore iniziale valutato direttamente dal *software*, in base alle condizioni operative relative ai flussi in ingresso.

La condizione “Parete” viene assegnata a tutti i domini adiacenti a quelli interessati dal gas e dal *medium*, quindi le pareti vere e proprie del *vessel*, il coperchio e la barra magnetica. Le condizioni che caratterizzano questi domini sono rappresentate dall’assenza di flusso della fase dispersa attraverso la parete, espresso nell’equazione (3.47), dove  $\mathbf{N}_{\phi_d}$  è appunto il flusso della fase dispersa esplicitato in (3.48).

$$-\mathbf{n} \cdot \mathbf{N}_{\phi_d} = 0 \quad (3.47)$$

$$\mathbf{N}_{\phi_d} = \phi_d \mathbf{u}_d \quad (3.48)$$

Considerando a questo punto la condizione “Ingresso”, essa viene assegnata a tutti i fori presenti nello *sparger*, da cui viene insufflato il gas. Nell’“Ingresso” (vedere tabella (3.3)), deve essere fornita una condizione di pressione che viene a coincidere con quella inserita per le condizioni iniziali, nonché una condizione sul flusso della fase dispersa, il cui valore  $N_{\phi_d}$  corrisponde al flusso entrante normale, come espresso nella relazione (3.49); la quantità assegnata a  $N_{\phi_d}$ , è stata ricavata dividendo la portata complessiva di gas per le superfici dei fori dello *sparger* e, inoltre, viene addizionata della funzione rampa, come descritto nel paragrafo 3.3.2. Infine le condizioni sulle variabili turbolente ricevono un valore valutato direttamente dal *software*, in base alle condizioni operative relative ai flussi in ingresso.

$$-\mathbf{n} \cdot \mathbf{N}_{\phi_d} = N_{\phi_d} \quad (3.49)$$

La condizione di “Uscita” (vedere tabella (3.3)), invece, interessa il foro dell’*overflow* che, come già affermato, consente anche la fuoriuscita dei gas interni al reattore. In questo caso viene fissata la pressione atmosferica come pressione di uscita e si presuppone una elevata diluizione all’esterno, avendo di conseguenza una frazione volumica della fase dispersa nulla.

Per quanto concerne la condizione di “Continuità”, essa è necessaria per garantire coerenza tra i valori che le variabili presentano nel dominio del brodo di reazione e in quello fittizio rotante. Perciò viene imposta la condizione “Parete” sulla superficie della calotta sferica, procedendo a fissare il valore della frazione in volume della fase dispersa pari al valore calcolato dalla fisica in quei punti.

Infine, si tiene conto dell'elemento gravitazionale, presente nell'equazione (3.25) di bilancio di quantità di moto, inserendo la condizione “Gravità” su tutti i domini interessati dalla fisica “Modello di Miscela”.

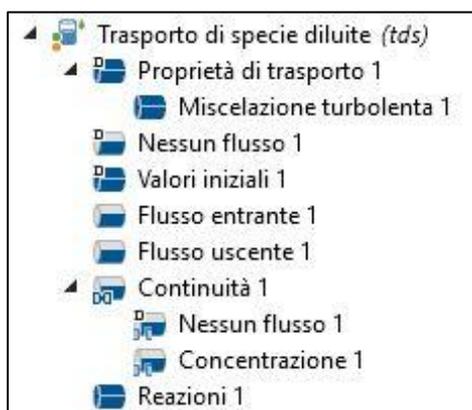
**Tabella 3.3.** Sintesi dei valori iniziali, di ingresso e di uscita

Variabile	Valore
Velocità (iniziale)	(0;0;0) m/s
Pressione (iniziale)	$\rho g(H - z)$
Frazione volumica fase dispersa (iniziale)	0
Pressione (ingresso)	$\rho g(H - z)$
Portata gassosa (ingresso)	150 mL/min
Pressione (uscita)	1 atm
Frazione volumica fase dispersa (uscita)	0

### 3.3.6 Componente – Trasporto di specie diluite

La fisica utilizzata per la descrizione del trasporto di materia è quella definita “Trasporto di specie diluite”, essa calcola i valori delle concentrazioni delle specie che vengono definite al suo interno. Come si può dedurre dal nome della fisica, essa assume di operare in un sistema diluito, ovvero con specie in basse concentrazioni rispetto al solvente. Questa è la situazione che si presenta nel caso del sistema da modellare, sia per la componente liquida, dove l'acqua risulta in quantitativi molto superiori a quelli delle altre specie, sia per quella del gas alimentato, dove l'azoto presenta concentrazioni molto più elevate di quelle dell'anidride carbonica. Siccome il sistema presenta due fasi distinte, una gassosa e una liquida, anche la modellazione del trasporto di materia avviene tramite due fisiche differenti: una che descrive il trasporto per la parte gassosa e una che descrive il trasporto nella parte liquida. L'interlacciamento tra le due miscele avviene mediante una reazione di assorbimento, definita nella parte chimica, che descrive il passaggio delle sostanze dalla fase gassosa a quella liquida e questo è anche necessario, perché le reazioni vere e proprie del sistema si verificano in fase liquida e, conseguentemente, i gas devono venire assorbiti, prima di reagire. Entrambe le fisiche “Trasporto di specie diluite” risolvono l'equazione (3.7) di trasporto di materia, tenendo conto anche dell'aspetto convettivo.

Il primo “Trasporto di specie diluite” interessa la fase gassosa e in figura (3.12) ne viene presentato il sottoalbero, con le condizioni implementate.



**Figura 3.12:** Sottoalbero della fisica “Trasporto di specie diluite” per la fase gassosa. (Figura ricavata da COMSOL®)

Questa fisica viene applicata sia alla zona del brodo di reazione sia alla zona di disimpegno dei gas, in quanto il gas insufflato risulta presente in entrambe le aree e, siccome l'alimentazione gassosa risulta composta da soli azoto e anidride carbonica, queste sono le specie valutate dalla fisica.

Le "Proprietà di trasporto" vengono in parte ricavate dai calcoli realizzati dalle altre fisiche e, nello specifico, la velocità deriva dal "Modello di miscela" e la temperatura dalla "Trasmissione del calore con irraggiamento nei mezzi partecipanti", in parte da dati di letteratura, per quanto riguarda le diffusività, pari a  $0,165 \text{ cm}^2/\text{s}$  per l'anidride carbonica in azoto (Bird et al., 2002) e a  $0,212 \text{ cm}^2/\text{s}$  per l'autodiffusione di azoto in azoto (Winn, 1950). Viene, inoltre, aggiunta la voce "Miscelazione turbolenta", necessaria per considerare la presenza del fenomeno turbolento, dove la viscosità cinematica è calcolata dal "Modello di miscela" e il numero di Schmidt turbolento risulta pari a 0,71.

La condizione "Nessun flusso" fissa un'assenza di flusso (equazione (3.50)) e viene imposta su tutte le pareti, che non possono appunto essere attraversate da un flusso di materia.

$$-\mathbf{n} \cdot \mathbf{N}_i = 0 \quad (3.50)$$

I "Valori iniziali" (vedere tabella (3.4)) vedono le concentrazioni di azoto e di anidride carbonica fissate a  $0 \text{ mol}/\text{m}^3$ , in quanto questi gas vengono insufflati quando il processo viene avviato e prima sono assenti.

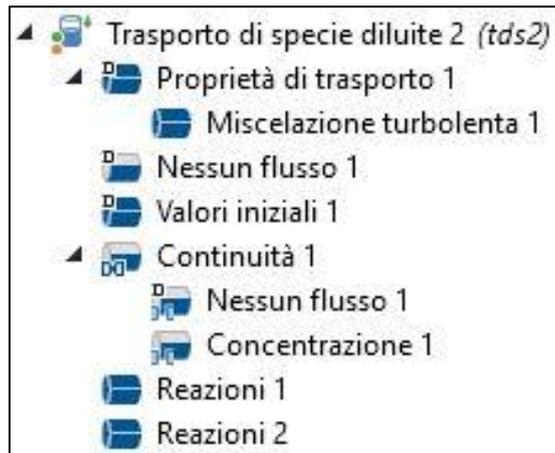
La condizione di "Flusso entrante", invece, assegnata ai fori dello *sparger*, presenta le concentrazioni proprie della miscela gassosa alimentata al reattore (vedere tabella (3.4)), valutate mediante legge di stato dei gas alla temperatura e pressione di esercizio, conoscendo le frazioni volumiche dei due gas alimentati, pari a 0,01 per la  $\text{CO}_2$  e 0,99 per  $\text{N}_2$ .

La condizione di "Flusso uscente" non richiede alcuna impostazione aggiuntiva e viene applicata al foro dell'*overflow*.

La condizione di "Continuità", successivamente, deve essere applicata alla calotta sferica delimitante il dominio rotante, per garantire coerenza nei valori propri di quel dominio e della parte restante del brodo di reazione; viene sovrascritta la condizione "Nessun flusso", introducendo la condizione "Concentrazione" e fissando le concentrazioni dei due gas considerati a un valore pari a quello calcolato dalla fisica in quei punti.

Infine, la voce "Reazioni" consente di considerare il consumo delle due specie gassose determinato dall'assorbimento in fase liquida, ricavando dalla fisica "Chimica 2" il valore per il termine di generazione  $R_i$  dell'equazione (3.7), dovuto alle reazioni chimiche.

Considerando, a questo punto, il secondo "Trasporto di specie diluite", esso viene applicato per la descrizione della fase liquida e in figura (3.13) ne viene presentato il sottoalbero, con le condizioni implementate.



**Figura 3.13:** Sottoalbero della fisica “Trasporto di specie diluite” per la fase liquida. (Figura ricavata da COMSOL®)

Questa fisica viene applicata alla sola zona del brodo di reazione, essendo predisposta appositamente per descrivere la fase liquida, e valuta, quindi, tutte le specie principali presenti nel brodo di reazione, presentate in tabella (3.4).

Le “Proprietà di trasporto” presentano le medesime impostazioni della fisica precedente, se si eccettuano le diffusività, che derivano dalla fisica “Chimica 1”.

Anche la condizione di “Nessun flusso” presenta le medesime caratteristiche e così la condizione di “Continuità”, dove in quest’ultima vengono fissate, nella maniera già descritta, le concentrazioni di tutte le specie definite.

I “Valori iniziali” presentano le concentrazioni delle specie come da tabella (3.4).

Non vengono imposte condizioni di “Flusso entrante” e “Flusso uscente”, in quanto portate entranti e uscenti nella zona liquida sono solamente determinate da flussi gassosi.

La differenza principale rispetto al precedente “Trasporto di specie diluite”, tuttavia, si presenta con le condizioni “Reazioni” che in questo caso sono due. La prima considera il fenomeno dell’assorbimento e, traendo i termini di generazione  $R_i$  dalla fisica “Chimica 2”, descrive la variazione delle concentrazioni di  $\text{CO}_2$  e  $\text{N}_2$  in fase liquida. La seconda, invece, considera la reazione vera e propria del sistema, ovvero quella che avviene ad opera dei microrganismi e che ha luogo nella fase liquida; in questo caso i termini di generazione  $R_i$  vengono ricavati dalla fisica “Chimica 1”.

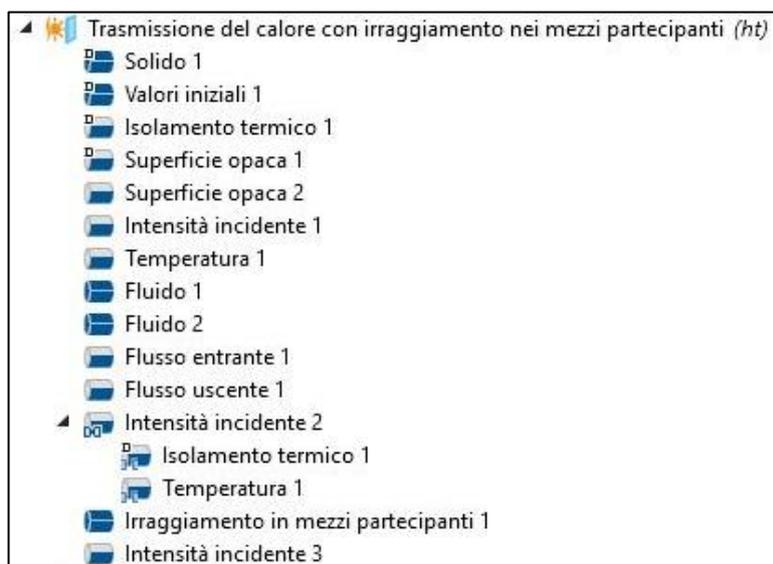
**Tabella 3.4.** Sintesi delle concentrazioni delle specie considerate.

Specie	Concentrazione iniziale, mol/m <sup>3</sup>	Concentrazione ingresso, mol/m <sup>3</sup>
CO <sub>2,g</sub>	0	0,40
N <sub>2,g</sub>	0	39,81
CO <sub>2</sub>	0	0
N <sub>2</sub>	0	0
O <sub>2</sub>	0	0
NaNO <sub>3</sub>	7059,65	0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	97,97	0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	121,77	0
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5,99	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	91,86	0
EDTA Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	26,01	0

### 3.3.7 Componente – Trasmissione del calore con irraggiamento nei mezzi partecipanti

La fisica utilizzata per la descrizione del trasporto di energia è quella definita “Trasmissione del calore con irraggiamento nei mezzi partecipanti”, che determina una sola variabile principale: la temperatura. Già la denominazione della fisica evidenzia la presenza del fenomeno dell’irraggiamento, tipico dei fotobioreattori, ma anche la presenza di un mezzo che partecipa a questo fenomeno, in quanto il sistema analizzato contiene un fluido non trasparente che, quindi, influisce sulla radiazione incidente.

Nella figura (3.14) viene presentato il sottoalbero della fisica con le varie condizioni inserite che verranno descritte nello specifico.



**Figura 3.14:** Sottoalbero della fisica “Trasporto del calore con irraggiamento nei mezzi partecipanti”. (Figura ricavata da COMSOL®)

Questa fisica risolve, come equazione principale, l’equazione (3.30) di bilancio entalpico per i fluidi, a cui viene aggiunta la componente di irraggiamento nel mezzo partecipante. Per considerare questa

componente, viene utilizzata l'approssimazione P1, già descritta nel capitolo teorico 3.2.3, introducendo in particolare l'equazione (3.38) e giungendo poi a risolvere complessivamente l'equazione (3.37), dove l'indice di rifrazione del mezzo  $n_r$  viene assunto uguale a 1,34 (Röttgers et al., 2010). Questa fisica, infine, viene applicata alla totalità dei domini.

La condizione “Solido” viene applicata alle pareti del *vessel* (che risultano appunto costituite da materiale solido) e i parametri richiesti, ovvero la conducibilità termica  $k$ , la densità  $\rho$  e il calore specifico a pressione costante  $C_p$  dei materiali, sono presentati in tabella (3.5) e ricavati dalla libreria dei materiali di COMSOL®. Per quanto concerne la temperatura e la pressione, invece, la prima mantiene il valore calcolato dalla fisica, mentre la seconda risulta pari a 1 atm.

Come “Valori iniziali” (vedere tabella (3.6)), viene utilizzata la temperatura ambiente.

L’“Isolamento termico”, invece, viene imposto su tutte le componenti metalliche interne del sistema più la barra magnetica, presupponendo uno scambio di calore solo tramite le pareti, da cui proviene anche l'intensità luminosa che viene irraggiata; questa condizione impone ovviamente un flusso di calore nullo, come descritto dall'equazione (3.51).

$$-\mathbf{n} \cdot \mathbf{q} = 0 \quad (3.51)$$

Una delle condizioni di “Superficie Opaca” viene successivamente applicata a tutte le superfici in vetro presenti nel sistema e una a quelle in acciaio, in modo da tenere conto del fatto che non presentano emissività, e quindi assorbanza, uguale a 1 e quindi uguale a un corpo nero. I valori di emissività adottati sono pari a 0,92 per il vetro e 0,7 per l'acciaio e sono inseriti in tabella (3.5).

**Tabella 3.5.** Sintesi dei parametri utilizzati nel trasporto di calore.

Parametro	Valore
$k_{\text{vetro}}$	1,4 W/(m K)
$\rho_{\text{vetro}}$	2210 kg/m <sup>3</sup>
$C_{p,\text{vetro}}$	730 J/(kg K)
$k_{\text{acciaio}}$	44,5 W/(m K)
$\rho_{\text{acciaio}}$	7850 kg/m <sup>3</sup>
$C_{p,\text{acciaio}}$	475 J/(kg K)
$\epsilon_{\text{vetro}}$	0,92
$\epsilon_{\text{acciaio}}$	0,7
$C_{p,\text{brodo}}$	4180 J/(kg K)
$\gamma_{\text{brodo}}$	1
$\gamma_{\text{aria}}$	1,4
${}^1 \kappa_{\text{vetro}}$	18 m <sup>-1</sup>
${}^2 \sigma_{s,\text{vetro}}$	16 cm <sup>-1</sup>
${}^3 \kappa_{\text{brodo}}$	1,014 m <sup>-1</sup>
${}^3 \sigma_{s,\text{brodo}}$	0,201 m <sup>-1</sup>

1.(Nicolau and Maluf, 2001); 2. (Fu et al., 2016); 3.(Narasimhan et al., 2006).

La condizione “Intensità incidente 1” assolve a una funzione analoga a quella della “Superficie opaca”, per quanto concerne la superficie interna di separazione tra zona liquida e zona gassosa, vedendo fissato il valore dell’intensità radiativa pari a quello calcolato dal *software* in quei punti.

La condizione “Temperatura”, che impone il valore di temperatura ambiente (vedere tabella (3.6)), viene applicata alle superfici solide delimitanti l’interno del *vessel*.

La condizione “Fluido 1” viene applicata al dominio del brodo di reazione. Essa desume i valori necessari di temperatura, pressione e campo di velocità dalle varie fisiche, la prima da questa medesima, la seconda e il terzo dal “Modello di miscela”. Sono, inoltre, richiesti i dati di conducibilità termica  $k$  e densità  $\rho$ , conseguentemente ricavati dalla fisica “Chimica 1”, e quelli di calore specifico a pressione costante  $C_p$  e di rapporto tra i calori specifici  $\gamma$ , forniti dall’utente e presentati in tabella (3.5).

La condizione “Fluido 2” viene, invece, applicata alla zona di disimpegno dei gas e presenta le medesime caratteristiche della condizione precedente, se si eccettuano i valori di  $k$ ,  $\rho$ ,  $C_p$  e  $\gamma$  che vengono ricavati da quelli forniti dalla libreria del *software* per l’aria: il primo e il terzo valutati in funzione della sola temperatura, il secondo in funzione anche della pressione parziale e il quarto pari a 1,4.

La condizione “Flusso entrante” (vedere tabella (3.6)) viene applicata ai fori dello *sparger* e i valori di temperatura e pressione sono pari rispettivamente al valore ambiente e a 1 atm, mentre la condizione “Flusso uscente” è fissata sul foro dell’*overflow* e non richiede alcuna impostazione aggiuntiva.

La condizione “Intensità incidente 2” ricopre in questo caso il ruolo svolto dalla condizione “Continuità” per le altre fisiche, perché consente di fissare due condizioni sulla calotta sferica a cui viene, appunto, applicata. La prima condizione di continuità tra il dominio rotante e il resto del brodo di reazione viene fissata sulla intensità radiativa, come valutata in quei punti dal *software*. La seconda, invece, prevede l’inserimento della condizione “Temperatura” (a sovrascrivere quella di “Isolamento termico” di *default*), in cui viene impostato il valore di temperatura sempre come calcolato in quei punti dal *software*.

La condizione “Irraggiamento in mezzi partecipanti” è necessaria per fornire le proprietà del mezzo attraverso cui si propaga la luce e per descrivere come essa vi interagisca. Questa condizione viene applicata a tutti i domini (eccetto le basi in acciaio) e i parametri inseriti sono i coefficienti di assorbimento e di *scattering*, presentati in tabella (3.5) per il brodo di reazione e il vetro, e desunti da Meyerott et al. (Meyerott et al., 1960) e Fenn et al. (Fenn et al., 1985) per l’aria, nonché il valore della radiazione incidente iniziale, la quale viene valutata direttamente dal *software*. Le variabili temperatura e pressione, inoltre, sono ricavate la prima dalla medesima fisica, l’altra dal “Modello di miscela”.

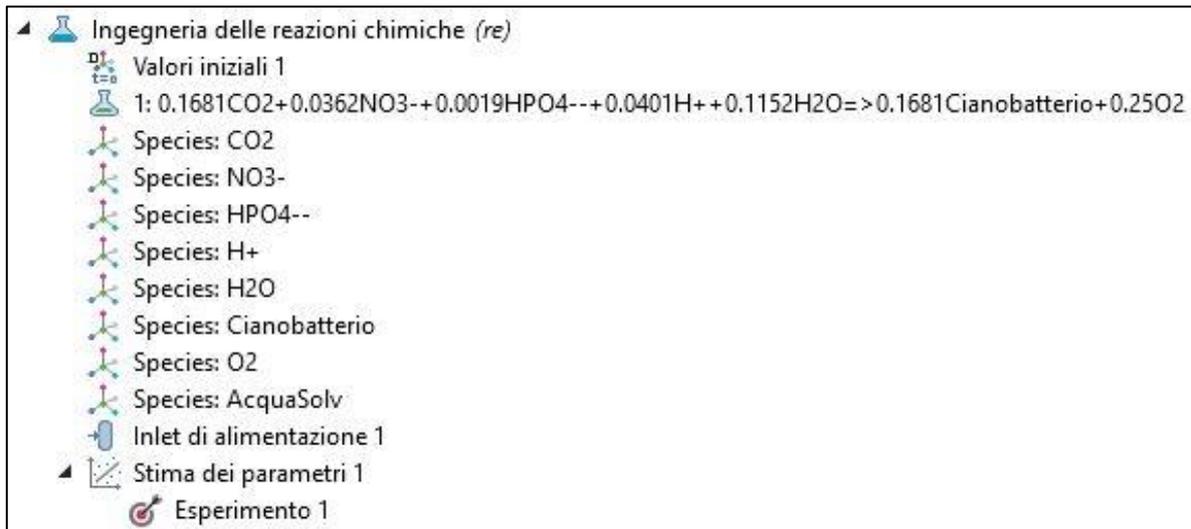
Infine, la condizione “Intensità incidente 3” viene imposta sulla parete posteriore del *vessel* ed è necessaria per fissare l’intensità luminosa che viene irraggiata dal pannello di LED. Il valore stabilito per le simulazioni è pari a  $50 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , come visibile in tabella (3.6).

**Tabella 3.6.** Sintesi dei valori al contorno.

Variabile	Valore
Temperatura ambiente	25°C
Pressione (ingresso)	1 atm
Intensità incidente	$50 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$

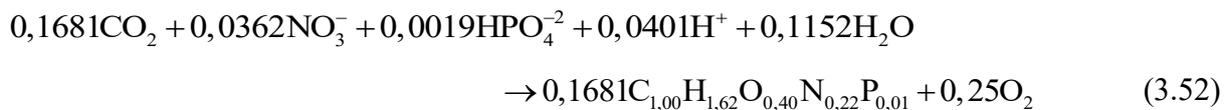
### 3.3.8 Componente – Ingegneria delle reazioni chimiche

La fisica “Ingegneria delle reazioni chimiche” ricopre la funzione di interpolare i dati sperimentali e di restituire un valore per la costante cinetica della reazione principale che ha luogo nel brodo reagente, considerando il sistema alla temperatura di esercizio. In figura (3.15) viene presentato il sottoalbero della fisica.



**Figura 3.15:** Sottoalbero della fisica “Ingegneria delle reazioni chimiche”. (Figura ricavata da COMSOL®)

La reazione considerata nel modellare il sistema, visibile in equazione (3.52), è di tipo empirico ed è stata ricavata da Kim et al. (Kim et al., 2011), dove viene fornita anche una formula chimica empirica descrittiva della composizione del cianobatterio esaminato, rappresentato come  $C_{1,00}H_{1,62}O_{0,40}N_{0,22}P_{0,01}$ .



La reazione (3.52) è stata implementata nella fisica in esame, procedendo a definire tutte le specie coinvolte presenti nella reazione, più il solvente costituito dall’acqua. Le specie di tipo ionico rappresentano quelle saline contenute nel medium, da cui gli ioni risultano appunto ricavati.

I “Valori iniziali” di concentrazione sono pari a quelli già descritti nel sottocapitolo 2.2 e nel paragrafo 3.3.6.

L’“Inlet di alimentazione” considera il quantitativo di anidride carbonica che viene apportato dalla portata entrante gassosa ed è pari a  $0,298 \text{ mol/m}^3$ , valore in equilibrio secondo Henry con la concentrazione alimentata.

La condizione “Stima dei parametri” permette di definire i parametri che il *software* dovrà valutare e di aggiungere dei dati sperimentali in “Esperimento”, su cui stimare gli eventuali parametri di interesse. Nel caso in esame, il parametro da stimare è la costante cinetica della reazione (3.52), che risponde all’equazione (3.40) per la velocità di reazione, e i dati di partenza sono quelli sperimentali di produzione dell’ossigeno a 24 h.

Per concludere la stima del parametro, è necessaria l’introduzione della funzione “Ottimizzazione” all’interno della sezione “Studio”, che verrà affrontata più nel dettaglio nel paragrafo 3.3.11.

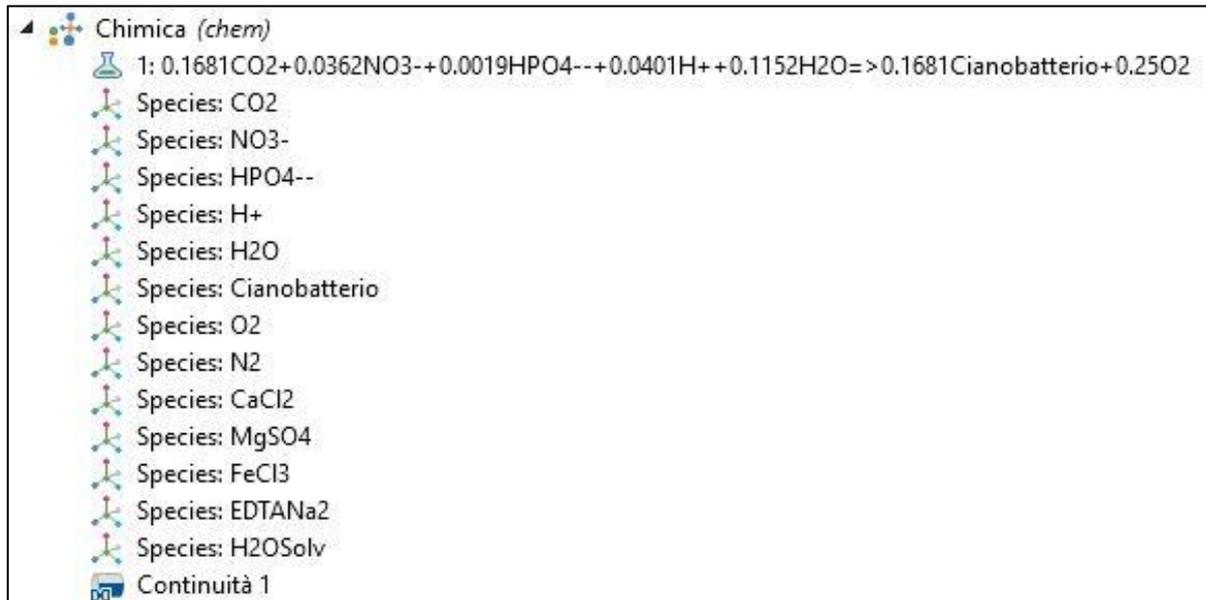
Il valore ottenuto per la costante cinetica risulta pari a  $1,16 \cdot 10^{-6}$ .

### 3.3.9 Componente – Chimica

La fisica utilizzata per l’inclusione delle reazioni chimiche nel modello è la fisica “Chimica”. Essa non presenta variabili principali valutate, ma considera tutto quello che concerne una reazione a partire dalle

velocità di reazione. Siccome, come già affermato per il “Trasporto di specie diluite”, si considerano due tipi di reazioni, quelle di assorbimento del gas in liquido e quella vera e propria in fase liquida, vengono inserite due fisiche “Chimica” differenti, che si occupano di ciascuno dei due aspetti.

La fisica “Chimica 1”, di cui è presentato il sottoalbero in figura (3.16), viene applicata automaticamente alla totalità dei domini e viene utilizzata per modellare la reazione principale che ha luogo nel brodo e che è già stata descritta nell’equazione (3.52). Il valore della costante cinetica per la valutazione delle velocità di reazione, nella forma dell’equazione (3.40), risulta quello ottenuto dall’interpolazione effettuata dalla fisica “Ingegneria delle reazioni chimiche” e pari a  $1,16 \cdot 10^{-6}$ , come mostrato in tabella (3.7).

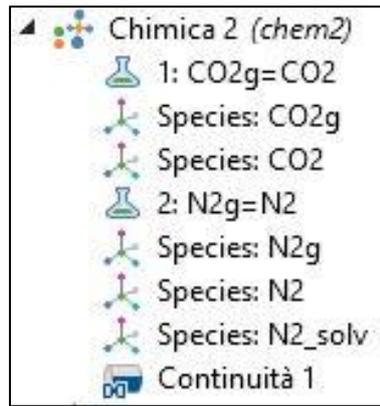


**Figura 3.16:** Sottoalbero della fisica “Chimica 1”. (Figura ricavata da COMSOL®)

Le specie inserite sono tutte quelle presenti nella reazione più quelle già considerate nel paragrafo relativo al “Trasporto di specie diluite”. Anche in questo caso, come già affermato, le specie ioniche coinvolte nella reazione vengono inserite e considerate in vece di quelle saline.

Risulta, infine, necessario inserire una condizione di “Continuità” sulla superficie della calotta sferica delimitante il dominio rotante, per le ragioni già descritte in precedenza.

La fisica “Chimica 2”, applicata automaticamente alla totalità dei domini e di cui è presentato il sottoalbero in figura (3.17), viene invece utilizzata per la modellazione del processo di assorbimento dell’anidride carbonica e dell’azoto nel brodo di reazione.



**Figura 3.17:** Sottoalbero della fisica “Chimica 2”. (Figura ricavata da COMSOL®)

Le specie considerate sono, appunto, le due molecole citate, prima in fase gassosa e poi in fase liquida, che vengono viste reagire secondo una reazione all’equilibrio per ciascuna di esse. La legge utilizzata per la descrizione di questa reazione all’equilibrio è la legge di Henry, visibile nell’equazione (3.42), che nella forma dell’equazione (3.43) fornisce immediatamente il valore della costante di equilibrio, pari a  $H_iRT$ . I valori della costante di Henry per le due specie alla temperatura di esercizio e a pressione atmosferica sono presentati in tabella (3.7), come ricavati da dati di letteratura (Sander, 2015).

Anche per questa fisica, come per la precedente, viene inserita la condizione di “Continuità” sulla superficie della calotta sferica delimitante il dominio rotante.

**Tabella 3.7.** Parametri di reazione.

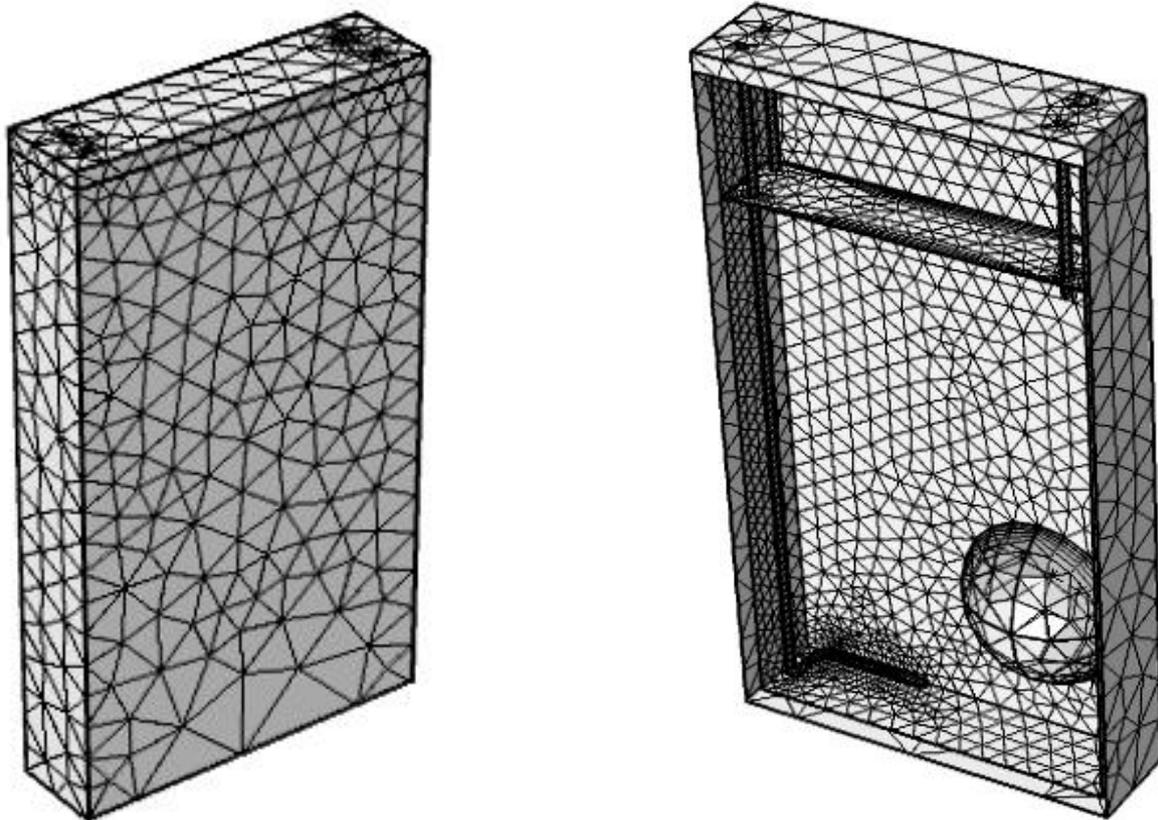
Parametro	Valore
<b>Costante cinetica</b>	$1,16 \cdot 10^{-6}$
$H_{CO_2}$	$2,8893 \cdot 10^{-4} \text{ mol m}^{-3} \text{ Pa}^{-1}$
$H_{N_2}$	$5,8574 \cdot 10^{-6} \text{ mol m}^{-3} \text{ Pa}^{-1}$

### 3.3.10 Componente – Mesh

La *mesh* utilizzata, applicata alla totalità del sistema, è di tipologia tetraedrica non strutturata con le dimensioni riassunte in tabella (3.8). Due immagini della *mesh* sono offerte in figura (3.18).

**Tabella 3.8.** Parametri dimensionali della *mesh*.

Parametri dimensionali	Valore
<b>Dimensione massima degli elementi</b>	0,0311 m
<b>Minima dimensione degli elementi</b>	0,0058 m
<b>Rapporto di crescita massimo per gli elementi</b>	1,6
<b>Fattore di curvatura</b>	0,7
<b>Parametro di definizione per geometrie allungate</b>	0,4



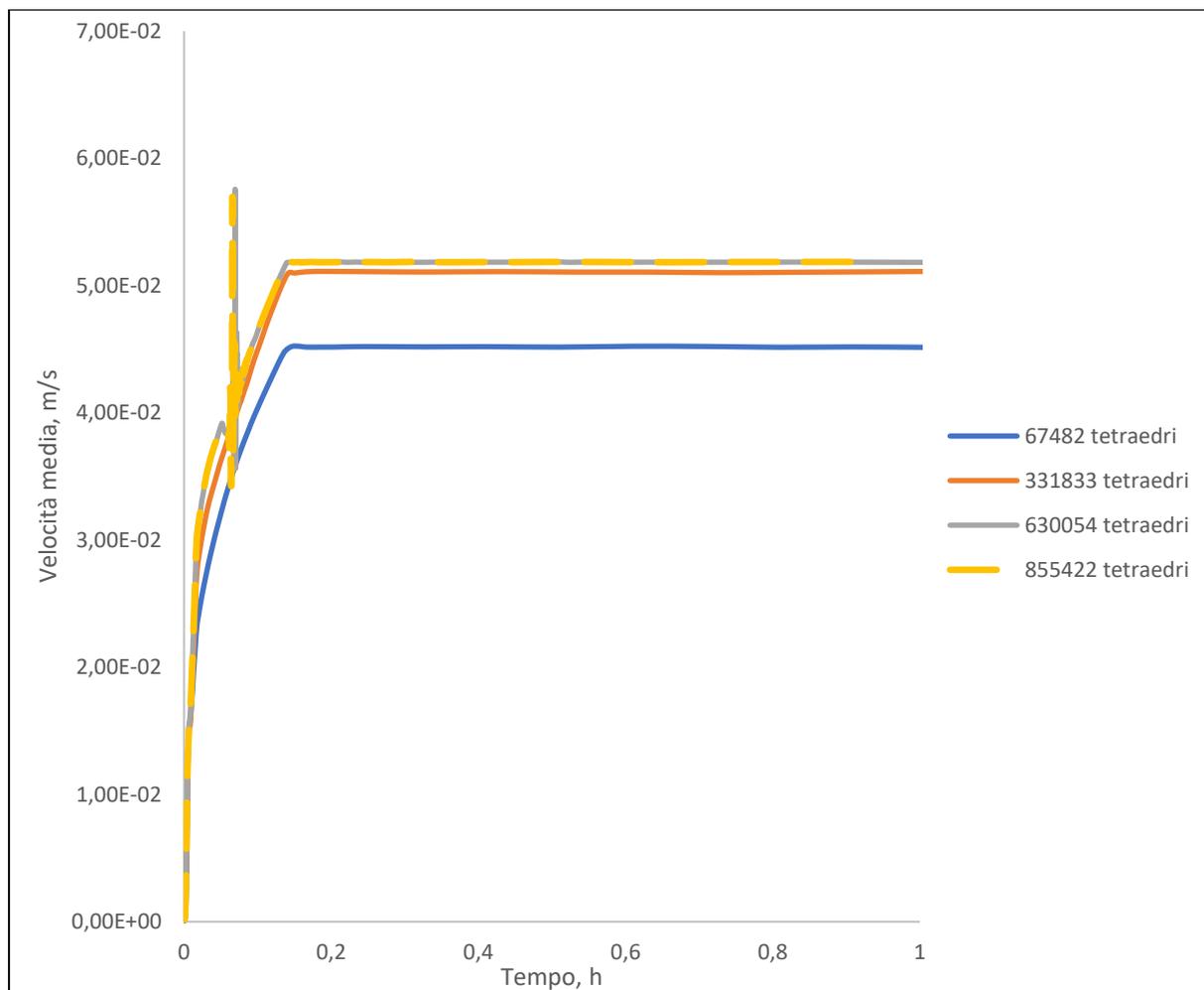
**Figura 3.18:** Modello con rappresentazione della *mesh*: con parete frontale (a sinistra) e privato della parete frontale (a destra). (Figura ricavata da COMSOL®)

In aggiunta alle caratteristiche presentate, la *mesh* viene infittita nelle zone di confine, a causa della presenza del fenomeno turbolento, e viene inserito un raffinamento nei punti di vertice, secondo i valori presentati in tabella (3.9).

**Tabella 3.9.** Parametri dimensionali dello strato limite e di raffinamento nei vertici.

<b>Parametri dimensionali</b>	<b>Valore</b>
<b>Numero di strati</b>	5
<b>Fattore di stiramento allo strato limite</b>	1,2
<b>Fattore di regolazione dello spessore</b>	2,5
<b>Fattore di scala per la dimensione degli elementi</b>	0,35

Si è scelto di adottare la *mesh* con questo tipo di caratteristiche, in quanto, da un'analisi condotta sugli andamenti della velocità media, i risultati ottenuti hanno mostrato la loro indipendenza dal raffinamento della griglia. Infatti, osservando la figura (3.19), si evince come la *mesh* scelta, con 855422 tetraedri, presenti risultati uguali al limite inferiore del numero di tetraedri (pari a 630054), necessario per ottenere l'indipendenza dei risultati dall'infittimento della griglia.



**Figura 3.19:** Andamento della velocità media in funzione del tempo al variare del grado di inaffinamento della *mesh*. Ogni curva è diagrammata utilizzando un numero di tetraedri differente, come descritto dalla legenda.

### 3.3.11 Studio

Lo studio condotto sul sistema modellato è di tipo “Transitorio”, in quanto è di interesse valutare come il sistema si evolve nel tempo, e si avvale di un risolutore di tipo MUMPS (“MULTifrontal Massively Parallel Solver”). Questo risolutore opera su sistemi di equazioni lineari nella forma  $Ax=b$ , con  $A$  matrice quadrata sparsa non simmetrica, simmetrica definita positiva o solo simmetrica, e utilizza un approccio multifrontale (più operazioni in parallelo) che si basa sulla fattorizzazione di Gauss del tipo  $A=LU$ , con  $L$  e  $U$  rispettivamente matrici triangolari inferiore e superiore, oppure, quando la matrice  $A$  è simmetrica,  $A=LDL^T$ , con  $D$  matrice diagonale.

Il *software* COMSOL<sup>®</sup>, per ogni passo di calcolo, risolve le equazioni per determinare le varie variabili principali in maniera separata, trattando individualmente blocchi di variabili mediante i cosiddetti “risolutori segregati”. Successivamente le variabili così computate vengono unificate e il *software* avanza al passo temporale successivo.

In aggiunta alla parte computazionale più generale, viene inserita la funzione “Ottimizzazione”, necessaria, come già affermato, per la valutazione della costante cinetica della reazione principale e per la sua ottimizzazione. Questa funzione si avvale dell’algoritmo di calcolo Levenberg-Marquardt, che è ideato per risolvere problemi ai minimi quadrati (in questo caso, minimizzandoli) mediante un metodo di Newton, procedendo a individuare una approssimazione della matrice di Hesse e successivamente regolarizzandola. Tramite l’uso di questo algoritmo, risulta possibile definire il valore per la tolleranza

e il numero massimo di iterazioni realizzabili. Esso trae, inoltre, la “Funzione obiettivo” dall’esperimento definito nella fisica “Ingegneria delle reazioni chimiche” e la “Variabile di controllo”, ovvero la costante cinetica, dalla sezione “Stima dei parametri” sempre in “Ingegneria delle reazioni chimiche”.

## 4. Risultati

### 4.1 Descrizione e analisi dei risultati sperimentali

#### 4.1.1 Tasso di crescita e produzione di ossigeno

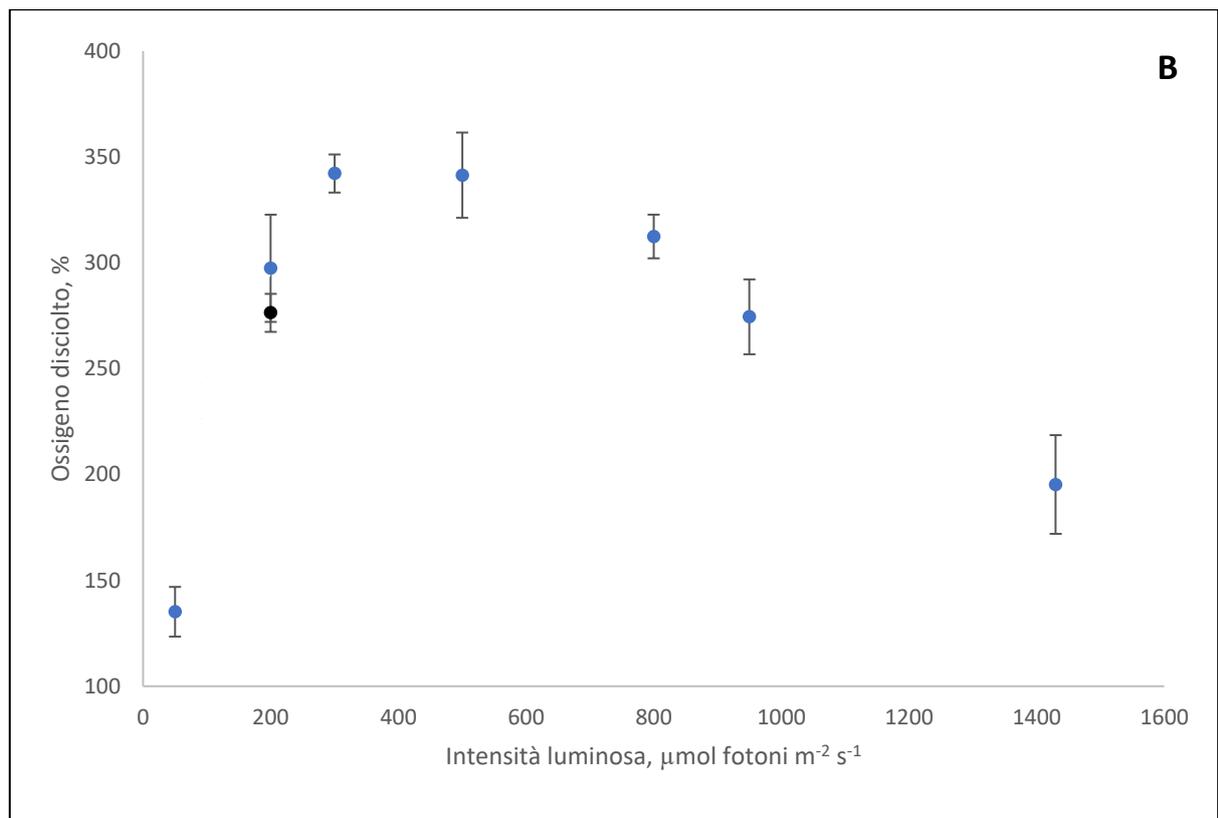
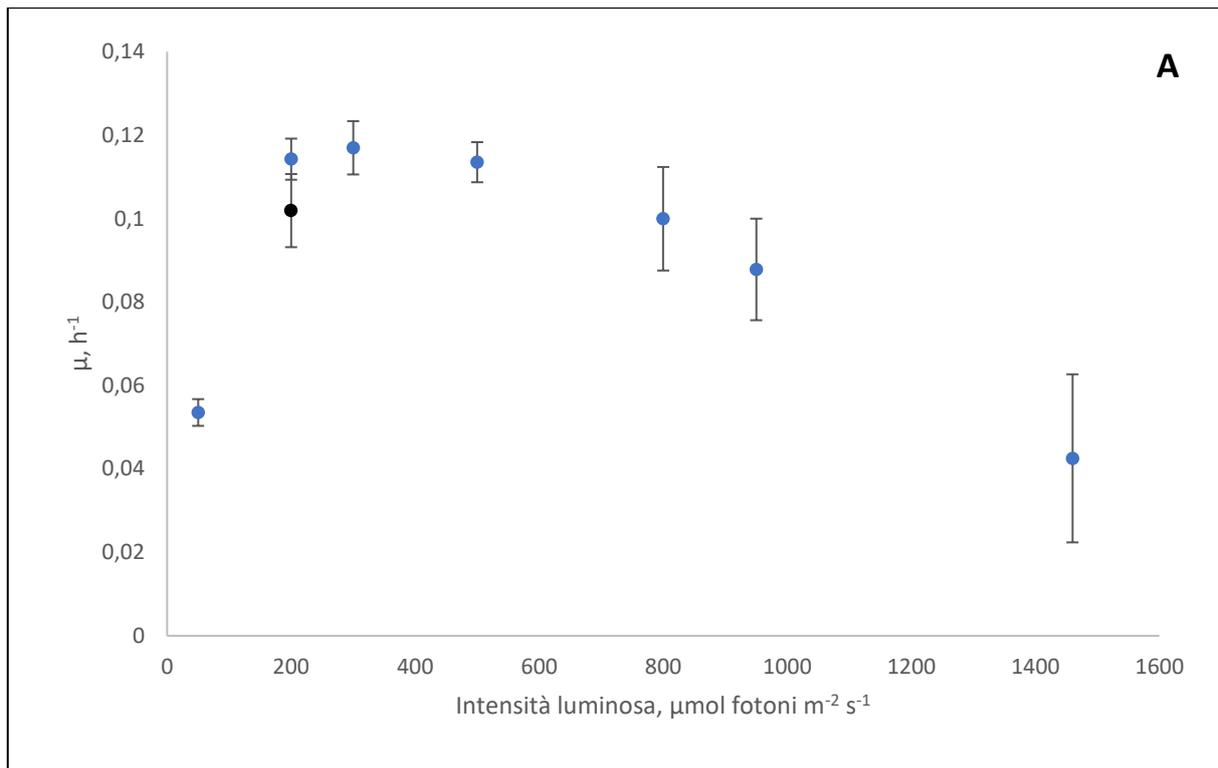
Le azioni effettuate nella conduzione dell'attività sperimentale sono state indirizzate allo studio e alla valutazione del fenomeno della fotoinibizione di lungo termine, procedendo a variare l'intensità luminosa irraggiata con valori progressivamente crescenti. Durante queste operazioni, sono stati misurati il tasso di crescita cellulare e il quantitativo di ossigeno disciolto e, quindi, prodotto (indicazione importante dell'attività del fotosistema II all'interno delle cellule (Schuurmans et al., 2015)), in modo da studiare il loro andamento al variare dell'intensità luminosa e la loro dipendenza dal fenomeno della fotoinibizione.

La dipendenza del sistema dalla sola intensità irraggiata è stata supposta con un buon grado di sicurezza, grazie alle condizioni di esercizio del fotobioreattore, che hanno previsto la conservazione di pH e temperatura a valori costanti e l'applicazione della modalità *turbidostat*, con il mantenimento della densità ottica costante e, quindi, della concentrazione cellulare. Questo ha determinato un esercizio in modalità semi-continua e il mantenimento della coltura nella fase di crescita esponenziale, condizione necessaria per accertarsi di avere le cellule sempre irraggiate con la medesima intensità luminosa (Martínez et al., 2011).

L'andamento presentato dai due parametri considerati, ovvero il tasso di crescita e il quantitativo di ossigeno, è presentato nella figura (4.1A) e nella tabella (4.1) e nella figura (4.1B) e nella tabella (4.2), rispettivamente; esso è molto simile per entrambi i parametri, al variare dell'intensità luminosa. I valori percentuali del quantitativo di ossigeno sono riferiti a un valore base assoluto di 35  $\mu\text{mol/L}$  corrispondente alla percentuale di  $135,18 \pm 11,75 \%$  a 50  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

**Tabella 4.1.** Tasso di crescita della biomassa al variare dell'intensità luminosa, con il valore mediato su tre esperimenti e la deviazione standard come errore. (\*) Punto di recupero.

Intensità luminosa, $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$\mu, \text{h}^{-1}$
50	$0,0535 \pm 0,0032$
200	$0,1142 \pm 0,0049$
300	$0,1169 \pm 0,0064$
500	$0,1135 \pm 0,0048$
800	$0,0999 \pm 0,0124$
950	$0,0878 \pm 0,0122$
1460	$0,0425 \pm 0,0201$
200*	$0,1019 \pm 0,0088$



**Figura 4.1:** Andamento del tasso di crescita  $\mu$  (figura A) e della quantità di ossigeno disciolto (figura B) al variare dell'intensità luminosa irraggiata. I valori diagrammati presentano la media e la deviazione standard, valutate su tre esperimenti differenti. (•) Punto di recupero a  $200 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

**Tabella 4.2.** Quantitativo di ossigeno disciolto al variare dell'intensità luminosa, con il valore mediato su tre esperimenti e la deviazione standard come errore. (\*) Punto di recupero.

<b>Intensità luminosa, <math>\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}</math></b>	<b>Ossigeno disciolto, %</b>
<b>50</b>	135,18 ± 11,75
<b>200</b>	297,43 ± 25,33
<b>300</b>	342,20 ± 9,01
<b>500</b>	341,41 ± 20,15
<b>800</b>	312,45 ± 10,31
<b>950</b>	274,50 ± 17,69
<b>1460</b>	195,30 ± 23,31
<b>200*</b>	276,37 ± 8,98

Dai valori presentati, risulta evidente come l'andamento dei due parametri considerati possa essere suddiviso in quattro fasi principali: una prima fase a 50  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , dove è assente il fenomeno della fotoinibizione; una seconda fase fino a 500  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , dove il tasso di crescita e l'attività del fotosistema II sono ai loro massimi valori; una terza fase fino a 1460  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , dove il fenomeno della fotoinibizione incide pesantemente e i due parametri si trovano ai valori minimi; una quarta fase a 200  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , destinata a consentire il recupero della biomassa.

Siccome il valore di 50  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  rappresenta l'intensità luminosa a cui la fotoinibizione è un fenomeno particolarmente raro, esso è stato considerato come il valore di intensità luminosa di controllo. A questo valore di intensità luminosa, le cellule hanno presentato un metabolismo lento, di cui è espressione il limitato valore del tasso di crescita di  $0,0535 \pm 0,0032 \text{ h}^{-1}$  (corrispondente a un tempo di raddoppiamento di ~ 13 h) e dell'ossigeno disciolto nel *medium*, pari a  $135,18 \pm 11,75 \%$ .

All'intensità di 200  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , il cianobatterio è cresciuto a velocità raddoppiata rispetto alle condizioni di irraggiamento con l'intensità di controllo; infatti il tasso di crescita ha presentato un valore di  $0,1142 \pm 0,0049 \text{ h}^{-1}$  (corrispondente a un tempo di raddoppiamento di ~ 6 h). Incrementando ulteriormente l'intensità luminosa a 300 e a 500  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , il tasso di crescita non ha presentato significative variazioni, offrendo un valore di  $0,1169 \pm 0,0064 \text{ h}^{-1}$  nel primo caso e di  $0,1135 \pm 0,0048 \text{ h}^{-1}$  nel secondo. Così come il tasso di crescita, passando da 50 a 200  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , anche la concentrazione di ossigeno ha presentato un sostanziale raddoppiamento raggiungendo il valore di  $297,43 \pm 25,33 \%$ . Tuttavia, l'incremento a 300  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ha determinato un'ulteriore aumento a  $342,20 \pm 9,01 \%$ , non misurato prima, valore che è poi rimasto pressoché costante a 500  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $341,41 \pm 20,15 \%$ ). La causa probabile di questo comportamento, che denota un'influenza differente delle intensità luminose sull'attività del fotosistema II e sulla crescita batterica, può essere imputata a una buona organizzazione della conversione di luce ad energia da parte del fotosistema, laddove la mancanza di variazione del tasso di crescita può essere connessa al risultato di molteplici prestazioni fotosintetiche, con un equilibrio ottimale tra le reazioni della fase luminosa (dove avviene la produzione di ossigeno) e quelle della fase oscura.

Superando, successivamente, il valore di intensità pari a 500  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , si è iniziato a osservare il fenomeno della fotoinibizione, che si è progressivamente aggravato al crescere dell'intensità luminosa. Con gli 800  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , il tasso di crescita è diminuito a  $0,0999 \pm 0,0124 \text{ h}^{-1}$  (corrispondente a un tempo di raddoppiamento di ~ 7 h) e l'ossigeno disciolto a  $312,45 \pm 10,31 \%$ , ma alzando ulteriormente l'intensità a 1460  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , il tasso di crescita è diminuito rapidamente a  $0,0425 \pm 0,0201 \text{ h}^{-1}$  (corrispondente a un tempo di raddoppiamento di ~ 16 h), pari a circa la metà del massimo tasso di crescita misurato, e l'ossigeno disciolto ha toccato il valore minimo di

195,30 ± 23,31 %. Da questi risultati appare evidente, quindi, come elevate intensità luminose abbiano alla fine causato pesanti danni al fotosistema II, come riscontrabile in letteratura (Murata et al., 2007).

Infine, si è ritornati all'intensità di 200  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , stabilita come punto di recupero dalla fotoinibizione, in quanto è stato il primo valore a cui si è raggiunta la crescita massima. È importante sottolineare come la biomassa sia riuscita a tornare quasi completamente ai valori di crescita antecedenti la fotoinibizione ( $0,1019 \pm 0,0088 \text{ h}^{-1}$ , corrispondente a un tempo di raddoppiamento di  $\sim 7 \text{ h}$ ) e come il medesimo risultato sia valso anche per l'ossigeno disciolto ( $276,37 \pm 8,98 \%$ ) e, quindi, per l'attività del fotosistema II.

Risulta chiaro dai risultati e dall'analisi condotta come *Synechocystis* sia in grado di sopportare condizioni ambientali molto avverse e come incontri difficoltà evidenti allo sviluppo solo in presenza di luce ad elevata intensità. Inoltre, è degna di nota la sua rapida capacità di ripresa, qualora le condizioni tornino favorevoli (come anche evidenziato in (Constant et al., 2000)), elemento che rende il cianobatterio particolarmente performante.

#### 4.1.2 Dimensioni cellulari e peso secco

Come il tasso di crescita e il quantitativo di ossigeno disciolto, anche il parametro della dimensione cellulare, tramite il diametro, è stato valutato al variare dell'intensità luminosa. Esso, e in particolare la capacità di modificarlo e regolarlo, è un elemento importante per la sopravvivenza dei microrganismi e varia tipicamente con il ciclo vitale cellulare, ma può anche subire regolazioni dovute alla risposta a mutate condizioni esterne, ad esempio per ottimizzare l'acquisizione delle risorse o per ottimizzare il metabolismo (Montgomery, 2015). Dalle misure sperimentali, *Synechocystis* ha mostrato una variazione della dimensione cellulare in funzione delle diverse intensità luminose, come si può osservare nella tabella (4.3).

**Tabella 4.3.** Dimensioni cellulari al variare dell'intensità luminosa, con il valore mediato su tre esperimenti e la deviazione standard come errore. (\*) Punto di recupero.

<b>Intensità luminosa, <math>\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}</math></b>	<b>Dimensioni cellulari, <math>\mu\text{m}</math></b>
<b>50</b>	2,11 ± 0,06
<b>200</b>	3,02 ± 0,13
<b>300</b>	3,22 ± 0,18
<b>500</b>	3,29 ± 0,13
<b>800</b>	3,09 ± 0,23
<b>950</b>	2,94 ± 0,26
<b>1460</b>	2,69 ± 0,21
<b>200*</b>	3,03 ± 0,01

Anche in questo caso, i risultati possono essere suddivisi in quattro blocchi: il primo a 50  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; il secondo fino a 500  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; il terzo fino a 1460  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; il quarto a 200  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Nella prima fase a 50  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , dove è assente la fotoinibizione, le dimensioni cellulari hanno presentato un valore di  $2,11 \pm 0,06 \mu\text{m}$ , che è il dato tipico offerto da *Synechocystis* quando cresce in assenza di *stress* (Lea-Smith et al., 2016).

Nella fase successiva, l'andamento si è mosso parallelamente a quanto ottenuto per l'ossigeno disciolto, poiché un incremento a 200  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ha determinato una crescita dimensionale a  $3,02 \pm 0,13 \mu\text{m}$ , che si è ulteriormente manifestata nel passaggio a 300  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  con un valore di  $3,22 \pm 0,18 \mu\text{m}$ , rimasto poi pressoché costante con  $3,29 \pm 0,13 \mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

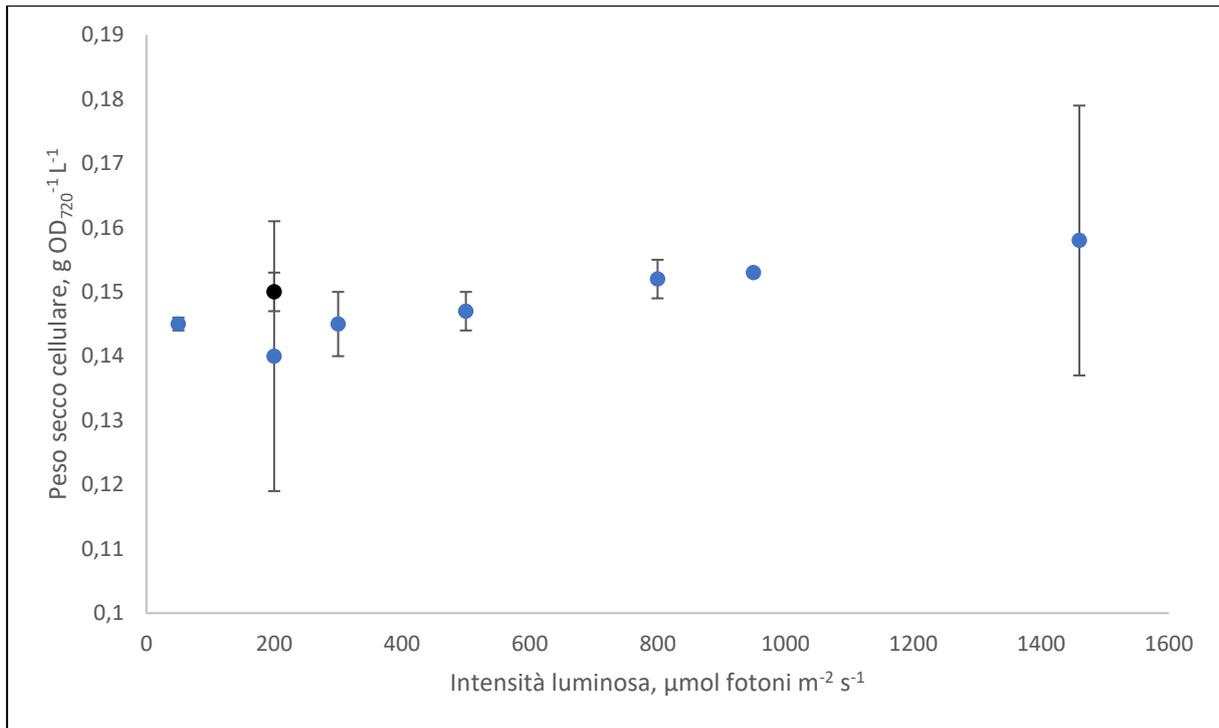
Come per i due parametri precedentemente analizzati, gli effetti della fotoinibizione hanno iniziato a manifestarsi all'intensità di 800  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , dove le dimensioni cellulari si sono ridotte a  $3,09 \pm 0,23 \mu\text{m}$ , per poi diminuire ulteriormente a  $2,69 \pm 0,21 \mu\text{m}$  con la massima intensità irraggiata di 1460  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Infine, ristabilita l'intensità luminosa di ripresa di 200  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , le dimensioni cellulari sono tornate a un valore molto simile ( $3,03 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ) a quello già presentato a quest'intensità, confermando quanto affermato nel paragrafo precedente. Inoltre, l'andamento globale molto simile a quello del tasso di crescita e dell'ossigeno disciolto evidenzia la presenza di uno stretto legame tra questi tre parametri.

Considerando, invece, i dati relativi al peso secco, sempre al variare dell'intensità luminosa, si è verificato che le variazioni delle dimensioni cellulari evidenziate sono state corrisposte da un valore del peso secco cellulare a  $\text{OD}_{720}$  relativamente costante su tutte le differenti intensità luminose, come osservabile nella figura (4.2) e nella tabella (4.4). Questo evento è stato determinato da una progressiva diminuzione del numero di cellule per unità di volume, che ha controbilanciato l'aumento delle dimensioni cellulari. L'aumento delle dimensioni in risposta a condizioni di stress, comunque, è risultato attestato anche in altri lavori di ricerca, dove è stato imputato all'accumulo di granuli a base glicogeno, nel caso di sottoposizione a elevate intensità luminose (Kopečná et al., 2012), e all'accumulo di polioidrossibutirrato, nel caso di sottoposizione ad alte temperature (Červený et al., 2015). Dai presenti risultati, inoltre, viene evidenziata l'influenza dell'aumento di intensità luminosa sia sul metabolismo, sia sul tasso di crescita.

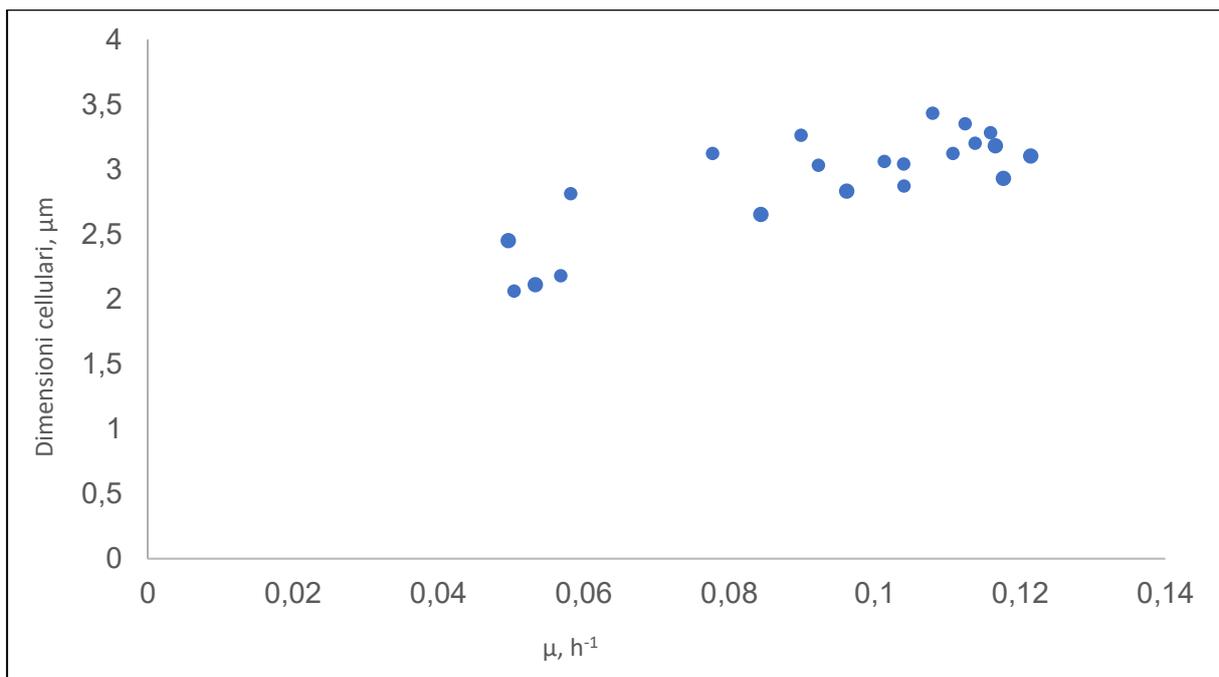
**Tabella 4.4.** Peso secco cellulare a  $\text{OD}_{720}$  al variare dell'intensità luminosa, con il valore mediato su tre esperimenti e la deviazione standard come errore. (\*) Punto di recupero.

<b>Intensità luminosa, <math>\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}</math></b>	<b>Peso secco cellulare, <math>\text{g OD}_{720}^{-1} \text{ L}^{-1}</math></b>
<b>50</b>	$0,145 \pm 0,001$
<b>200</b>	$0,140 \pm 0,021$
<b>300</b>	$0,145 \pm 0,005$
<b>500</b>	$0,147 \pm 0,003$
<b>800</b>	$0,152 \pm 0,003$
<b>950</b>	$0,153 \pm 0,000$
<b>1460</b>	$0,158 \pm 0,021$
<b>200*</b>	$0,150 \pm 0,003$



**Figura 4.2:** Andamento del peso secco cellulare a  $\text{OD}_{720}$  al variare dell'intensità luminosa irraggiata. I valori diagrammati presentano la media e la deviazione standard, valutate su tre esperimenti differenti. (•) Punto di recupero a  $200 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Infine, risulta evidenziabile una correlazione positiva tra il tasso di crescita e le dimensioni cellulari, a differenti intensità luminose, come osservabile in figura (4.3). Questo legame era già stato osservato in *Synechocystis*, con la differenza, però, che l'acclimatazione era avvenuta a intensità luminose più basse (Du et al., 2016).



**Figura 4.3:** Legame tra le dimensioni cellulari e il tasso di crescita a diverse intensità luminose.

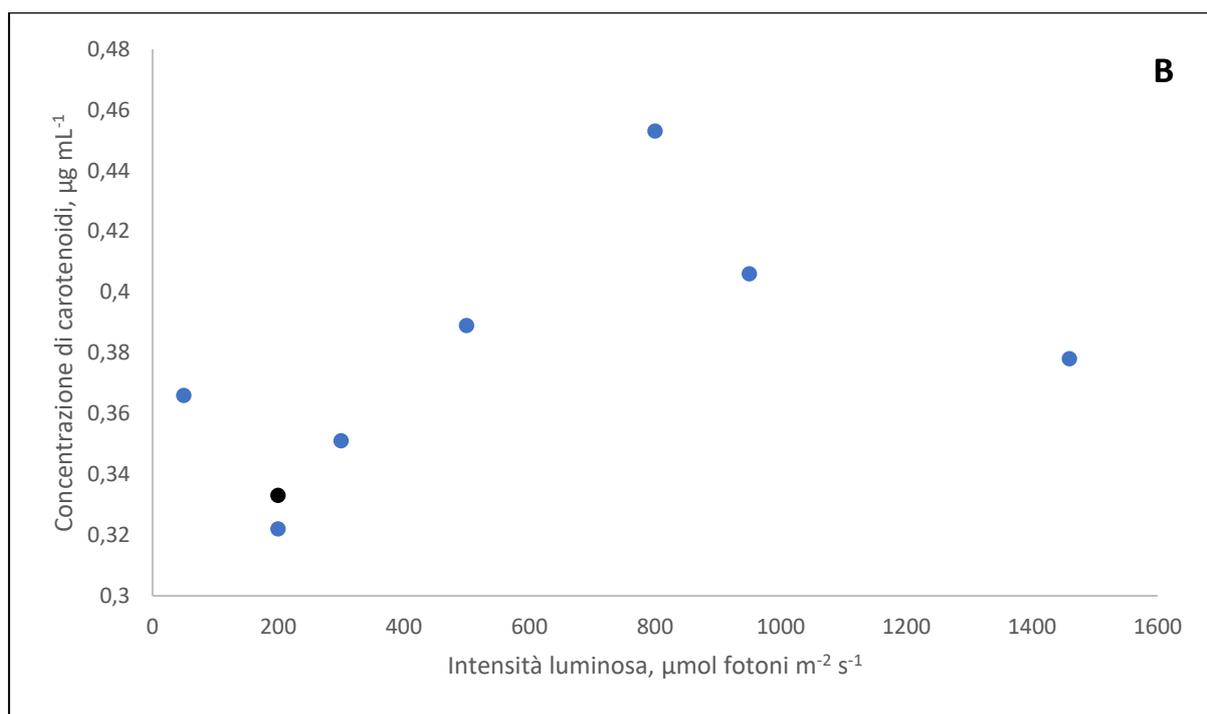
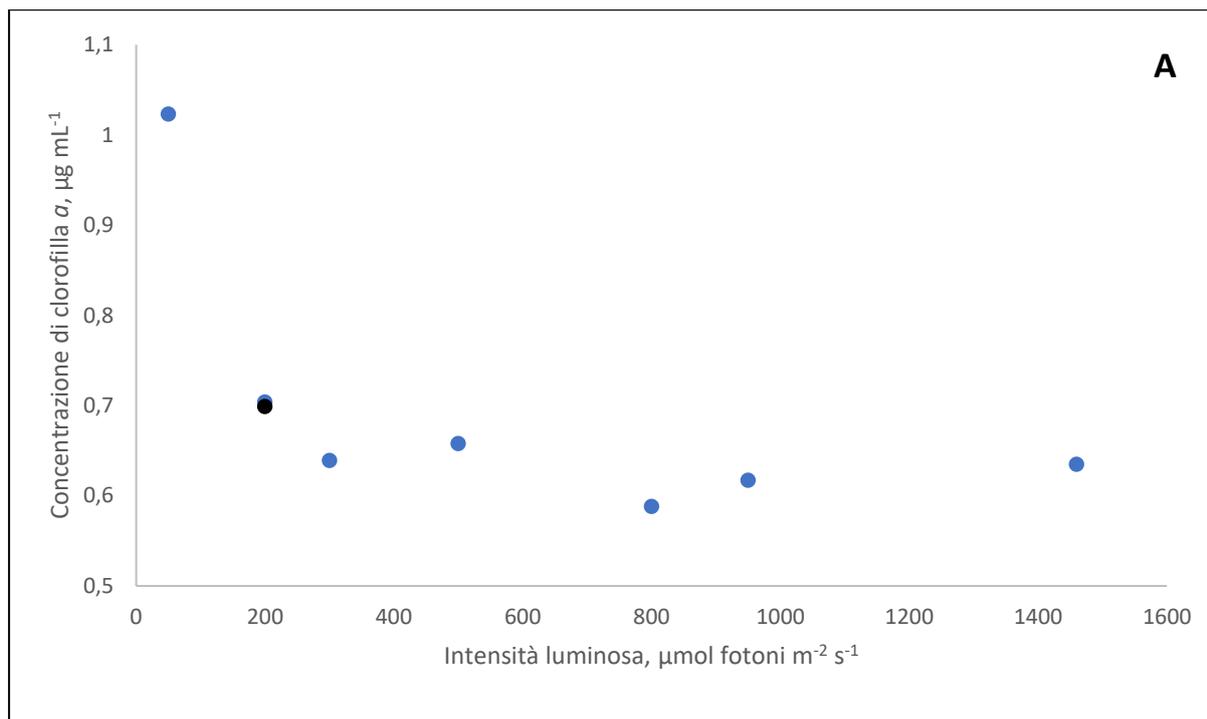
### 4.1.3 Concentrazione di clorofilla *a* e carotenoidi

Le concentrazioni di clorofilla *a* e di carotenoidi costituiscono un ulteriore elemento di interesse, in quanto queste sostanze ricoprono una funzione importante non solo nel garantire una operatività ottimale dei due fotosistemi, ma anche nel limitare i possibili danni sull'apparato fotosintetico perpetrati dalla luce eccessiva (Kopečná et al., 2012; Muramatsu and Hihara, 2012; Zakar et al., 2016).

Anche in questo caso, si è valutata la dipendenza della concentrazione di questi pigmenti fotosintetici con il variare dell'intensità luminosa irraggiata, provvedendo a effettuare delle estrazioni di queste sostanze dalle cellule, come già descritto nella procedura sperimentale. I risultati ottenuti sono stati successivamente confrontati, per quanto riguarda la clorofilla *a*, con quelli ricavati mediando il rapporto OD<sub>680</sub>/OD<sub>720</sub> su tre esperimenti differenti, poiché non è stato possibile ripetere le analisi basate sull'estrazione dei pigmenti. I valori ottenuti sono mostrati in tabella (4.5) e quelli relativi alle concentrazioni ottenute tramite l'estrazione sono raffigurati in figura (4.4A) per la clorofilla *a* e in figura (4.4B) per i carotenoidi.

**Tabella 4.5.** Concentrazione di clorofilla *a* e di carotenoidi al variare dell'intensità luminosa. Rapporto OD<sub>680</sub>/OD<sub>720</sub> al variare dell'intensità luminosa, con il valore mediato su tre esperimenti e la deviazione standard come errore. (\*) Punto di recupero.

<b>Intensità luminosa, μmol fotoni m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup></b>	<b>Clorofilla <i>a</i>, μg mL<sup>-1</sup></b>	<b>Carotenoidi, μg mL<sup>-1</sup></b>	<b>OD<sub>680</sub> / OD<sub>720</sub></b>
<b>50</b>	1,023	0,366	1,774 ± 0,002
<b>200</b>	0,704	0,322	1,548 ± 0,042
<b>300</b>	0,639	0,351	1,518 ± 0,009
<b>500</b>	0,658	0,389	1,496 ± 0,022
<b>800</b>	0,588	0,453	1,475 ± 0,010
<b>950</b>	0,617	0,406	1,545 ± 0,035
<b>1460</b>	0,635	0,378	1,597 ± 0,041
<b>200*</b>	0,699	0,333	1,557 ± 0,010



**Figura 4.4:** Andamento della concentrazione di clorofilla *a* (figura A) e della concentrazione di carotenoidi (figura B) al variare dell'intensità luminosa irraggiata. (•) Punto di recupero a 200  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Si osserva che a 50  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$  i valori di concentrazione di clorofilla *a* e di carotenoidi hanno presentato rispettivamente il dato più alto e il dato più basso su tutte le intensità (rispettivamente 1,023 e 0,366  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , con la misura per estrazione), considerando entrambe le tipologie di misura. Questo risultato denota l'azione di *Synechocystis* indirizzata a massimizzare l'assorbimento luminoso

producendo clorofilla *a* in maggior quantitativo, in modo da rispondere alla bassa intensità luminosa e da poter offrire il maggior tasso di crescita possibile in quelle condizioni.

Aumentando successivamente l'intensità prima a 200, poi a 300 e infine a 800  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , la concentrazione di clorofilla è diminuita progressivamente già di un 30 % nel primo caso, fino a toccare il minimo con l'ultimo valore di intensità (rispettivamente 0,704, 0,639 e 0,588  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , con la misura per estrazione). Contrariamente alla clorofilla, i carotenoidi hanno visto la loro concentrazione aumentare progressivamente (rispettivamente 0,322, 0,351 e 0,453  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , con la misura per estrazione). Questi risultati evidenziano chiaramente le tecniche di risposta del cianobatterio al progressivo incremento dell'intensità irradiata, che integrano due vie opposte: l'aumento della concentrazione dei carotenoidi, che aiutano a prevenire i danni foto-ossidativi causati dalla produzione di radicali liberi; la diminuzione del contenuto di clorofilla *a*, che consente di reprimere la sintesi di nuovo fotosistema I, sensibile alla clorofilla più del fotosistema II (Kada et al., 2003), e conseguentemente abbassare l'assorbimento dannoso della luce eccessiva.

Con gli ultimi valori di intensità irradiata, pari a 950 e 1460  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , dove il fenomeno della fotoinibizione è particolarmente acuto, si è verificato un inaspettato aumento della concentrazione di clorofilla *a* (rispettivamente 0,617 e 0,635  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , con la misura per estrazione) e una rispettiva diminuzione della concentrazione di carotenoidi (rispettivamente 0,406 e 0,378  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , con la misura per estrazione). Questo evento richiederebbe senza ombra di dubbio un'analisi ulteriore, tuttavia, un tentativo di spiegazione può essere proposto, considerando appunto i danni che la fotoinibizione può causare. In particolare, una frazione delle cellule presenti nel fotobioreattore può essere andata incontro a morte, mentre la restante frazione, seppur viva, può aver perso la capacità di minimizzare gli effetti della fotoinibizione (infatti il fotosistema II ha visto diminuita la propria attività, come evidenziato dalla diminuzione di ossigeno disciolto in figura (4.1B)) e di regolare la sintesi dei pigmenti fotosintetici. Conseguentemente a questo quadro, il contenuto più elevato di clorofilla *a* può essere parzialmente dovuto al suo accumulo nelle cellule morte, in quanto il pigmento ha una vita più lunga di quella delle proteine (Vavilin et al., 2005; Yao et al., 2012). Al contrario, la diminuzione dei carotenoidi può essere imputata o al loro sfaldamento a causa delle dure condizioni di *stress* determinate dalla foto-ossidazione (Havaux, 2014; Trautmann et al., 2013), oppure alla impossibilità di nuova sintesi da parte delle cellule morenti, in spinte condizioni fotoinibitorie (Steiger et al., 1999).

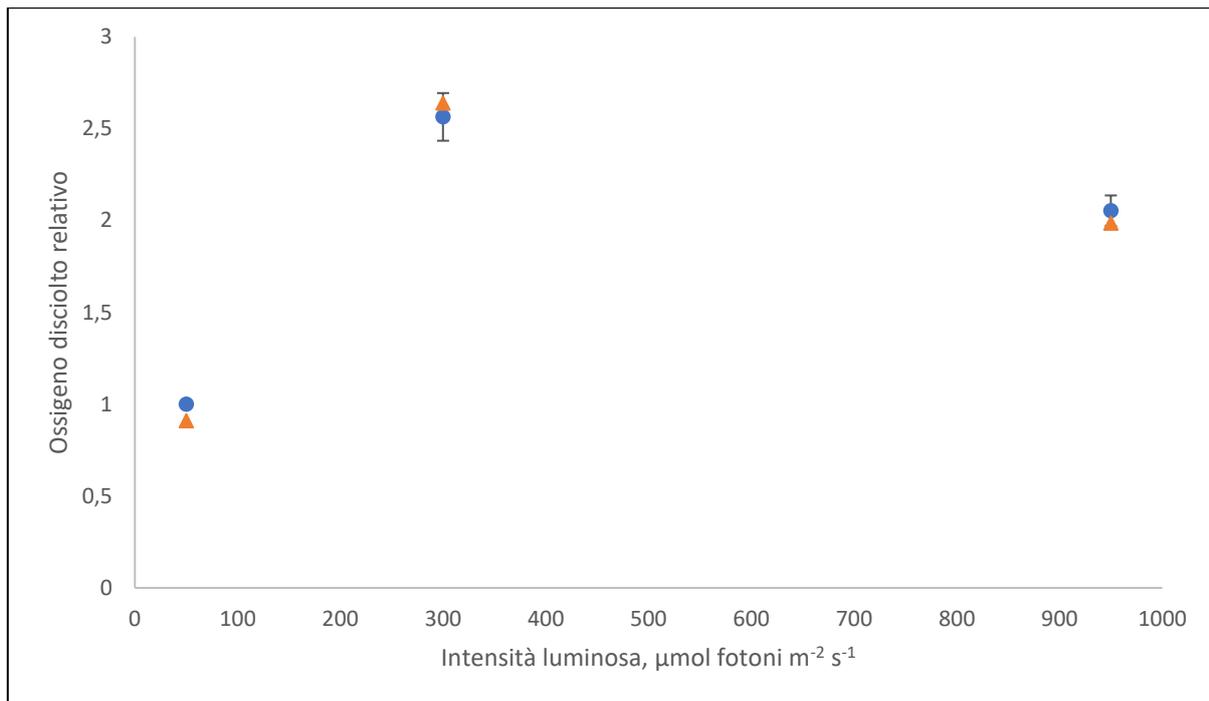
Infine, con il passaggio all'intensità di ripresa di 200  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , i valori di concentrazione dei pigmenti sono sostanzialmente ritornati a quelli misurati in precedenza a questa intensità (0,699  $\mu\text{g mL}^{-1}$  per la clorofilla *a* e 0,333  $\mu\text{g mL}^{-1}$  per i carotenoidi, con la misura per estrazione), in accordo con i risultati presentati nei paragrafi precedenti per gli altri parametri valutati. Questo dato conferma ulteriormente l'elevata capacità di ripresa e di adattamento di *Synechocystis*.

## 4.2 Descrizione e analisi dei risultati del modello

### 4.2.1 Convalida del modello

Prima di poter procedere a presentare i molteplici risultati ottenuti e i plurimi andamenti delle variabili, risulta necessario convalidare il modello che è stato costruito, verificando che i vari risultati ottenuti non siano irrealistici ed errati. Per realizzare questa convalida, viene condotto un confronto tra i dati sperimentali a 24 h della produzione di ossigeno, scalati sempre sul valore di concentrazione di base di 35  $\mu\text{mol/L}$  a 50  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , e quelli ottenuti al medesimo istante temporale mediante i calcoli computazionali del *software*.

I valori puntuali ottenuti alle tre intensità luminose considerate (50, 300 e 950  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), sia per l'approccio sperimentale sia per quello modellistico, sono presentati in figura (4.5).



**Figura 4.5:** Valori sperimentali (blu) e modellistici (arancione) della concentrazione di ossigeno disciolto alle tre intensità di 50, 300 e 950  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , normalizzati rispetto al valore ottenuto a 50  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

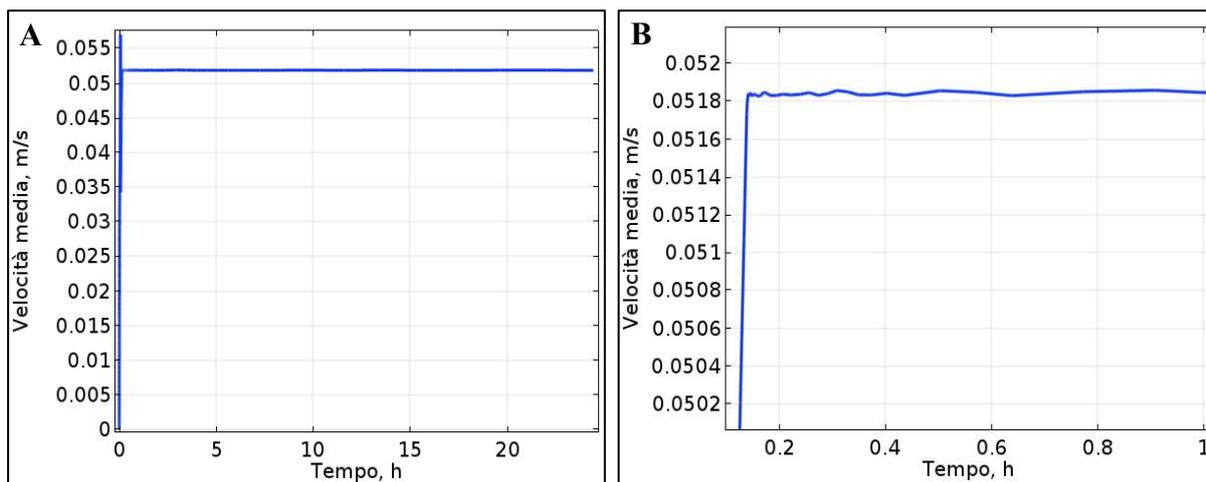
Come si può osservare dal diagramma in figura (4.5), i dati ricavati tramite il modello computazionale risultano molto prossimi a quelli sperimentali, confermando che il modello costruito può essere impiegato per studiare ed analizzare il sistema considerato.

Avendo esposto queste considerazioni, diviene quindi possibile valutare e descrivere gli andamenti delle molteplici variabili del sistema, i quali presenterebbero non pochi problemi, qualora si tentasse di valutarli sperimentalmente. La simulazione è stata condotta su un intervallo temporale di 24 h, in modo da uguagliare la durata di ogni ciclo sperimentale.

#### 4.2.2 Analisi degli andamenti delle variabili di interesse

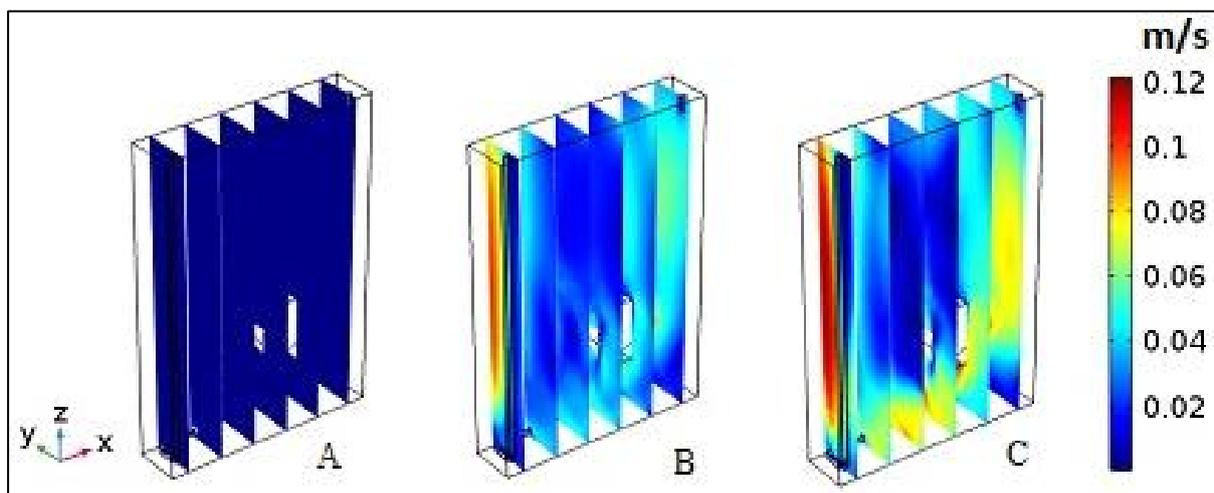
Considerando il primo blocco di variabili attinenti all'ambito fluidodinamico, e in particolare la velocità media, si osserva dalla figura (4.6) che la fase di transitorio risulta molto breve, con il raggiungimento dello stazionario già con un tempo inferiore alla mezzora: questo consente di condurre una riflessione sui valori a 24 h, sapendo che risultano rappresentativi di una buona parte del processo. Verranno, comunque, proposti dei confronti anche a istanti temporali inferiori.

Le figure successive di descrizione dei vari andamenti non vedono rappresentata la zona strettamente occupata dalla barra magnetica rotante, poiché quella zona costituisce una discontinuità nel sistema a causa della presenza dell'elemento rotante. Conseguentemente si osserva una porzione cilindrica bianca rimossa dalla rappresentazione complessiva. Inoltre, le immagini interessano solamente la zona del brodo di reazione, in quanto è quella in cui la modellazione e i risultati sono di particolare interesse.



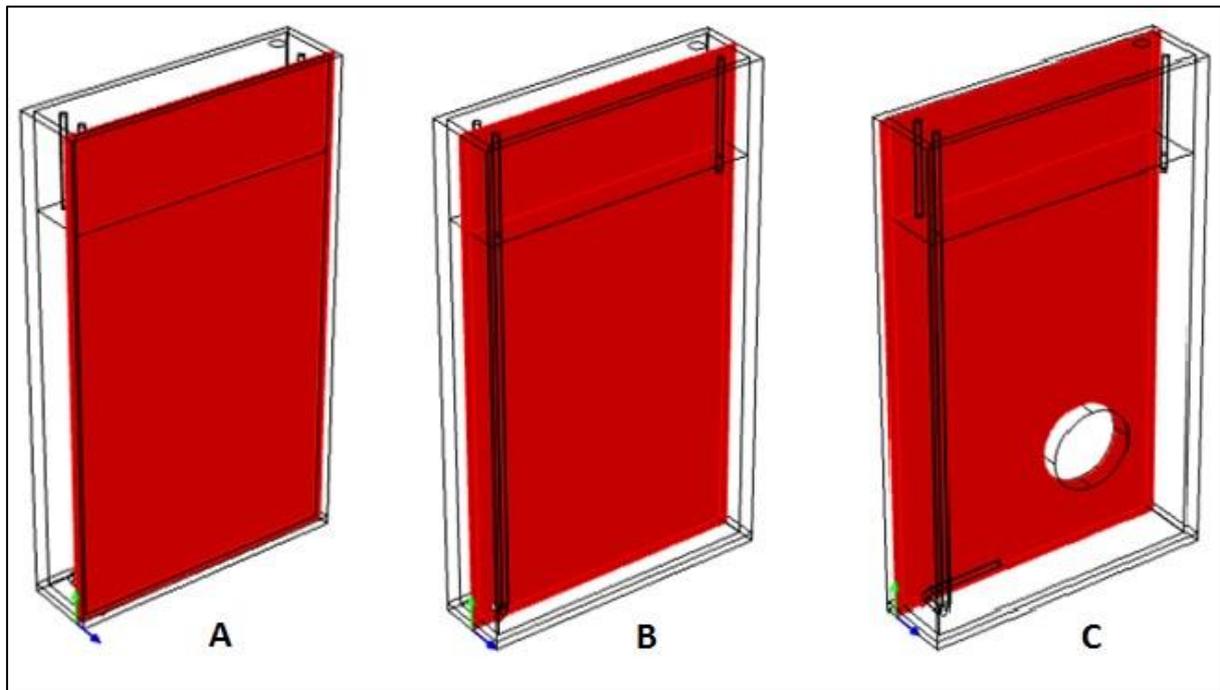
**Figura 4.6:** Andamento della velocità media in funzione del tempo sulle 24 h (A) e con un ingrandimento sulla fase di transitorio (B). (Figura ricavata da COMSOL®)

La prima variabile di interesse per il blocco considerato è la velocità media, già citata. Di questa vengono proposti in figura (4.7) i diagrammi all'istante iniziale, nel transitorio a 0,1 h e allo stazionario a 24 h. Da essi si può osservare come all'istante iniziale la velocità risulti nulla in tutto il sistema, in quanto non sono presenti parti in movimento e soprattutto in maniera coerente con le condizioni iniziali impostate. Negli istanti successivi, invece, essa tende a crescere progressivamente fino a raggiungere dei valori pressoché fissi a 0,2 h, dove viene raggiunto lo stazionario descritto dalla figura (4.7C); infatti in figura (4.7B), all'istante 0,1 h, i valori di velocità risultano maggiori di quelli all'istante iniziale, ma ancora minori dello stazionario.

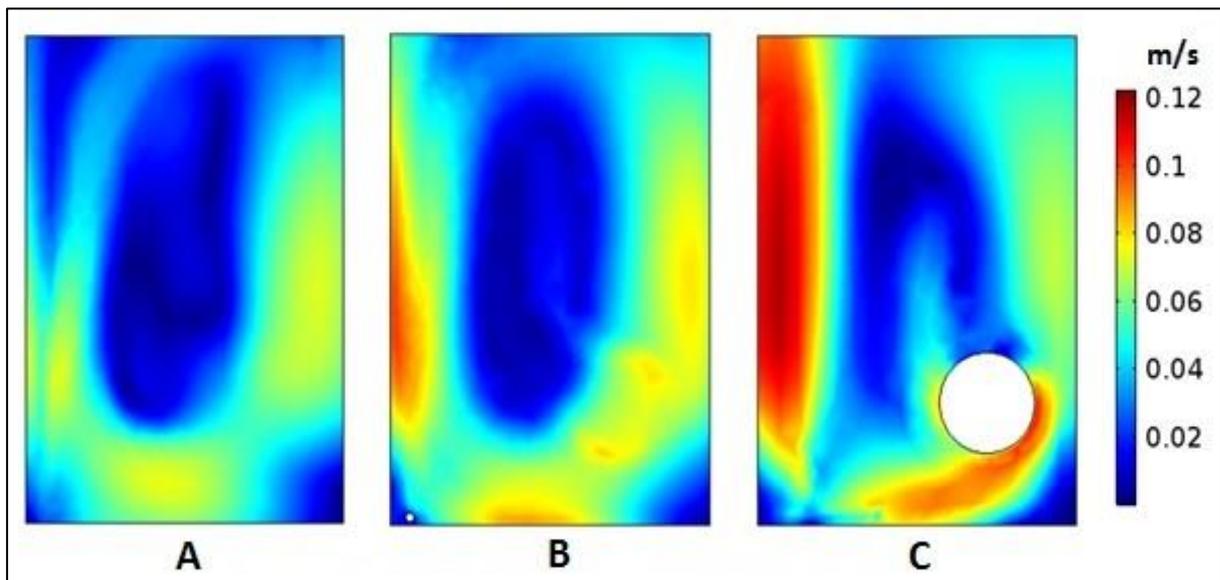


**Figura 4.7:** Andamento della velocità media in m/s nel fotobioreattore rappresentata su piani paralleli yz, all'istante iniziale (A), nel transitorio a 0,1 h (B) e allo stazionario a 24 h (C). (Figura ricavata da COMSOL®)

Considerando a questo punto gli andamenti della variabile in esame a 24 h, è possibile riflettere sul suo comportamento e sulla sua distribuzione all'interno del reattore. Questa analisi è facilitata dalle rappresentazioni su tre piani di taglio xz paralleli, le cui posizioni sono esplicitate in figura (4.8) e che verranno utilizzati anche per le variabili successive. Gli andamenti della velocità media su questi piani, invece, sono visibili in figura (4.9).



**Figura 4.8:** Esplicitazione delle posizioni dei tre piani di taglio xz paralleli su cui vengono rappresentati gli andamenti di alcune variabili: piano di taglio 1 (A), piano di taglio 2 (B), piano di taglio 3 (C). (Figura ricavata da COMSOL®)

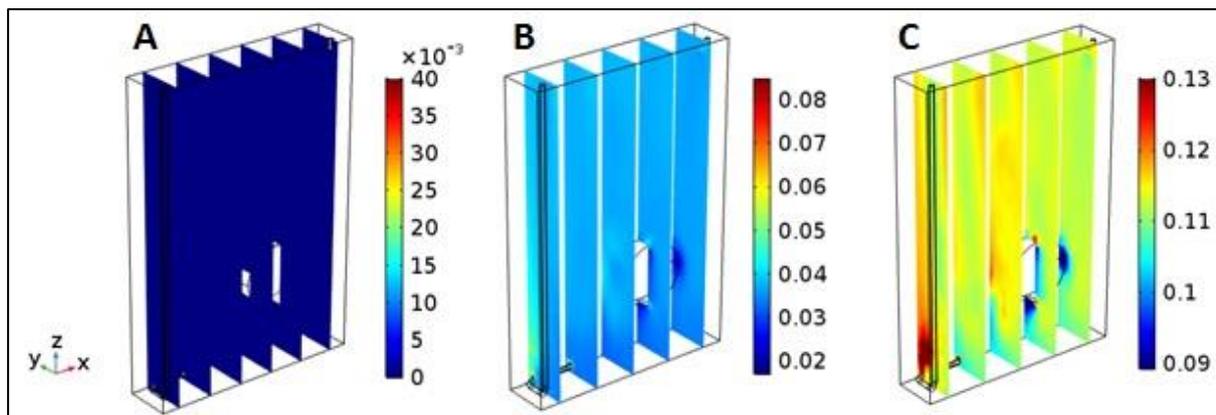


**Figura 4.9:** Andamento della velocità media in m/s a 24 h, presentato sui tre piani di taglio 1 (A), 2 (B), e 3 (C). (Figura ricavata da COMSOL®)

Dalla figura (4.9), il primo elemento da evidenziare, legato ai valori ricoperti dalla velocità media, è determinato dal fatto che si presentano più elevati dal lato del reattore più prossimo sia alla barra rotante, sia all'ingresso dello *sparger* (figura (4.9C)), mentre poi diminuiscono progressivamente allontanandosi e presentandosi minori dal lato più lontano (figura (4.9A)). Questo andamento risulta abbastanza prevedibile, in quanto le zone più altamente miscelate e agitate sono quelle prossime all'ingresso gassoso e alla barra rotante, mentre quelle più lontane appaiono più difficilmente movimentabili. Un'ulteriore osservazione concerne, invece, la posizione delle zone a maggiore velocità rispetto a un

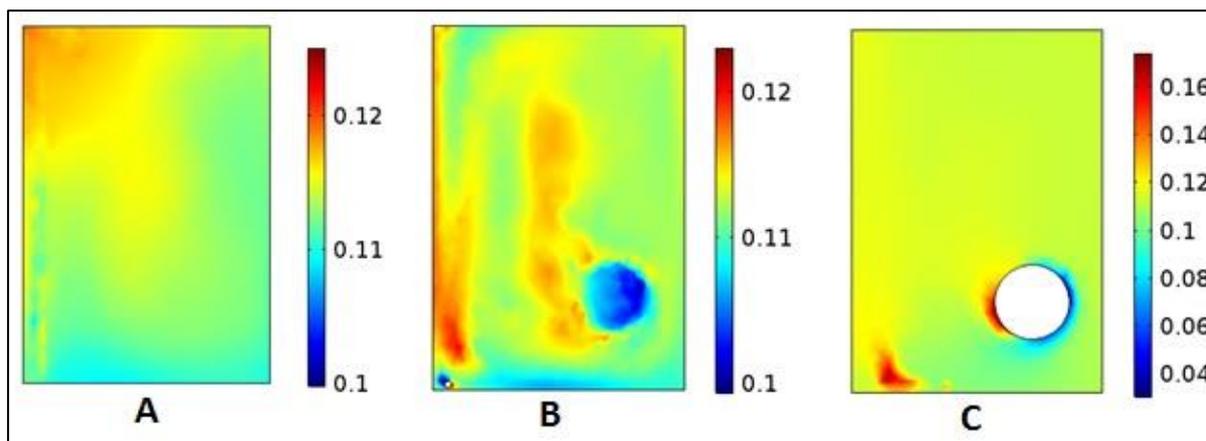
medesimo piano di taglio (si considera in particolare la figura (4.9C)), che si rispecchiano anche negli altri piani. Queste sono in particolare tre: la zona ad altezza della barra magnetica, la zona sulla verticale dell'ingresso dello *sparger* e la zona in alto a destra, in prossimità dell'uscita. Per quanto riguarda la prima, essendo la barra a movimentare il fluido, ci si aspetta che i valori di velocità siano maggiori intorno ad essa, per poi diminuire a distanza maggiore per effetto delle dissipazioni; inoltre l'andamento sembra descrivere perfettamente la rotazione antioraria impressa dalla barra magnetica. Nel secondo caso, invece, la zona è quella principalmente interessata dal moto della fase gassosa; questa esce dallo *sparger* già a velocità maggiore rispetto al resto della fase liquida, perciò la velocità media della miscela vede i propri valori aumentare grazie all'apporto di velocità dato dalla fase gassosa, evento che però si manifesta a valori della coordinata  $z$  più elevati, perché il gas deve prima raggiungere il piano di taglio considerato. In effetti su piani progressivamente più distanti dallo *sparger*, l'effetto risulta progressivamente più attenuato. Considerando, infine, l'ultima zona, i valori maggiori di velocità possono essere giustificati in primo luogo dall'azione di spinta sul fluido, impressa dalla barra magnetica in quella zona, a causa della sua rotazione antioraria, e in secondo luogo dalla prossimità alla zona di uscita che, estraendo il gas, tende a richiamarlo dalla fase liquida determinando una crescita localizzata di velocità.

La seconda variabile da considerare per il blocco fluidodinamico è costituita dalla frazione volumica della fase gassosa dispersa  $\Phi_d$  e anche per questa vengono mostrati, in figura (4.10), i diagrammi all'istante iniziale, nel transitorio a 0,1 h e allo stazionario a 24 h. Come per la velocità media, si osserva un valore nullo della fase dispersa all'istante zero, in quanto essa viene immessa tramite lo *sparger* solo con l'avvio del processo, e un andamento crescente durante il transitorio (figura (4.10B)), via via che il gas entra nel reattore e si distribuisce, fino al valore massimo allo stazionario, ottenuto già a 0,2 h e visibile in figura (4.10C).



**Figura 4.10:** Andamento della frazione volumica della fase dispersa nel fotobioreattore, rappresentata su piani paralleli  $yz$ , all'istante iniziale (A), nel transitorio a 0,1 h (B) e allo stazionario a 24 h (C). (Figura ricavata da COMSOL®)

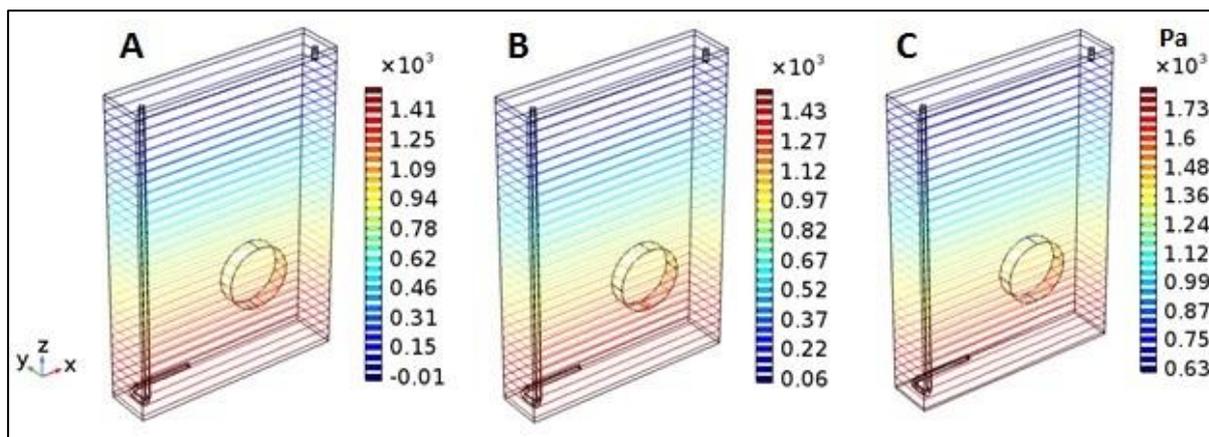
Procedendo, come nel caso precedente, a valutare gli andamenti di  $\Phi_d$  a 24 h, essi vengono proposti in figura (4.11) nuovamente sui tre piani di taglio  $xz$  di figura (4.8).



**Figura 4.11:** Andamento della frazione volumica della fase dispersa, presentato sui tre piani di taglio 1 (A), 2 (B), e 3 (C). (Figura ricavata da COMSOL®)

Nel considerare gli andamenti visibili in figura (4.11), bisogna prestare attenzione al fatto che le scale cromatiche sono diverse per ognuna delle tre immagini, con valori maggiori in figura (4.11C) e minori in figura (4.11A). In merito alla figura, comunque, la prima ovvia considerazione da segnalare è rivolta all'immagine (4.11C), in cui i valori massimi di fase dispersa si presentano immediatamente nei pressi dei fori di ingresso dello *sparger*, dove il gas viene immesso, e poi diminuiscono progressivamente avvicinandosi alla superficie del liquido, in quanto la fase gassosa viene progressivamente assorbita, nonché tende a disperdersi, e quindi vede la sua concentrazione diminuire via via che aumenta l'altezza; inoltre una zona a concentrazione maggiore si presenta vicino alla barra magnetica dal lato dello *sparger*, in quanto la barra tende a richiamare il gas con la sua rotazione antioraria e questo è avvalorato dall'immagine (4.11B), dove il profilo della fase dispersa descrive perfettamente questo richiamo. Una successiva considerazione riguarda le figure (4.11A) e (4.11B), dove il valore di  $\Phi_d$  tende, invece, a crescere con l'altezza (tenendo sempre in conto che in termini assoluti i valori sono comunque minori rispetto al piano in figura (4.11C)); questo si verifica in quanto la fase gassosa tende spontaneamente a salire verso l'alto e deve avere sufficiente tempo per diffondersi nelle altre direzioni, perciò nei piani più distanti dallo *sparger* tenderà ad essere più concentrata nelle zone superiori rispetto a quelle inferiori. Questo giustifica anche il fatto che in figura (4.11A) i gradienti della proprietà in esame risultino meno spiccati rispetto alle altre due immagini, in quanto la fase gassosa in prossimità di quel piano di taglio ha avuto la possibilità di diffondersi a sufficienza in modo da raggiungerlo, ma questo ha anche determinato un miglioramento delle condizioni di omogeneità, con il conseguente abbassamento dei gradienti. Le zone a più bassa  $\Phi_d$  in prossimità della barra magnetica, infine, sono dovute ai punti più pesantemente agitati che trattengono maggiormente il liquido, diminuendo l'accesso della fase dispersa gassosa.

L'ultima variabile da considerare per la componente fluidodinamica è la pressione relativa, di cui vengono proposti gli andamenti all'istante iniziale, nel transitorio a 0,1 h e allo stazionario a 24 h. Essi sono visibili in figura (4.12), mediante diagrammi a isolinee, che descrivono con molta facilità visiva i punti a medesima pressione.

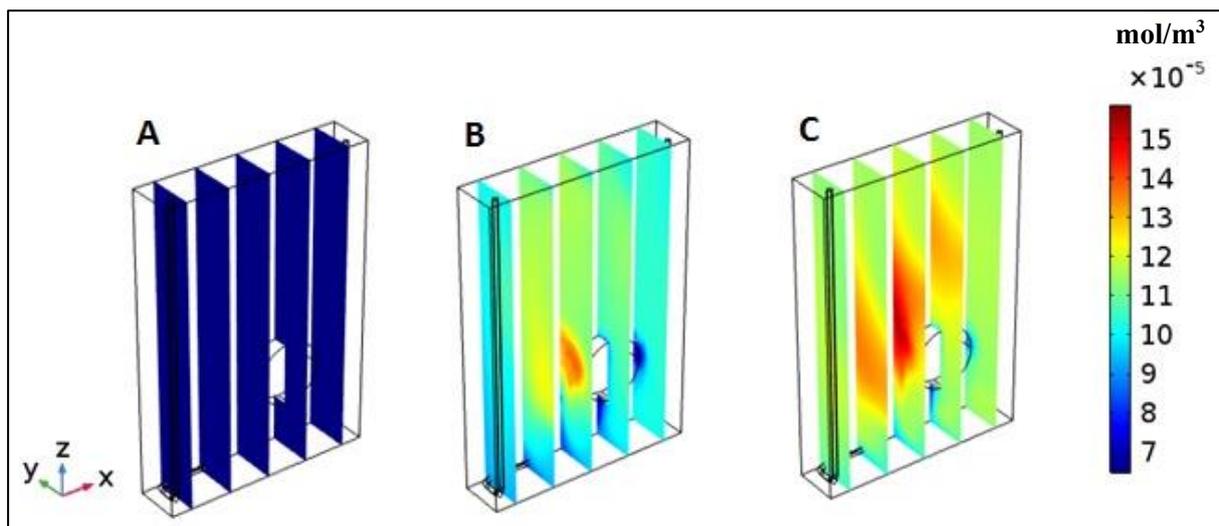


**Figura 4.12:** Andamento della pressione relativa in Pa tramite diagramma a isolinee all'istante iniziale (A), nel transitorio a 0,1 h (B) e allo stazionario a 24 h (C). (Figura ricavata da COMSOL®)

Una prima riflessione immediata in merito alla figura (4.12) è legata all'aumento progressivo della pressione relativa dalla zona superficiale superiore fino alla zona basale. Questo è facilmente giustificabile considerando già solo la semplice legge di Stevino, in quanto la pressione in un fluido cresce all'aumentare della profondità, come avviene nei risultati evidenziati. Una seconda riflessione più sottile, invece, è legata alla lieve differenza di pressione riscontrabile tra l'istante iniziale (figura (4.12A)) e lo stazionario (figura (4.12C)), che può essere giustificata con l'avvio del flusso gassoso in ingresso che introduce continuamente materiale gassoso all'interno del reattore, provocando necessariamente un aumento di pressione globale. In questo modo, la pressione percepita nei vari punti allo stazionario risulta leggermente maggiore di quella percepita nei medesimi punti all'istante iniziale; in effetti i punti di transitorio (figura (4.12B)) costituiscono un intermedio tra le due situazioni.

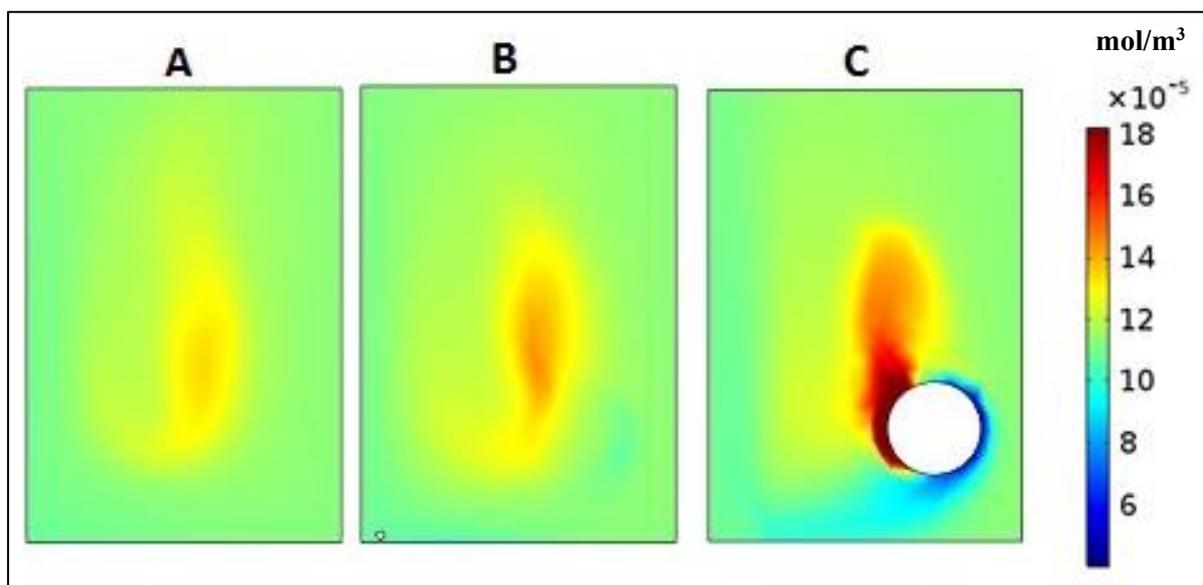
Spostandosi, a questo punto, a descrivere il trasporto di materia, le due variabili considerate sono la concentrazione di anidride carbonica e la concentrazione di ossigeno nel liquido. Esse sono esemplificative, perché la prima specie rappresenta il reagente principale, mentre la seconda il prodotto principale, perciò sono rappresentative dell'andamento del processo nel suo insieme. La  $\text{CO}_2$  assorbita nel liquido, inoltre, descrive anche l'andamento della sua corrispettiva ancora in fase gassosa, poiché il sistema risulta in equilibrio secondo la legge di Henry.

Per la concentrazione dell'anidride carbonica vengono nuovamente proposti, in figura (4.13), i diagrammi all'istante iniziale, nel transitorio a 0,1 h e allo stazionario a 24 h. Si osserva, anche in questo caso, che la concentrazione iniziale (figura (4.13A)) risulta nulla, in quanto all'avvio del processo non è prevista anidride carbonica all'interno del reattore, poi aumenta progressivamente, mano a mano che il gas viene introdotto e si diffonde, fino a raggiungere i valori massimi allo stazionario (figura (4.13C)).



**Figura 4.13:** Andamento in  $\text{mol/m}^3$  della concentrazione di  $\text{CO}_2$  assorbita nel fotobioreattore, rappresentata su piani paralleli  $yz$ , all'istante iniziale (A), nel transitorio a 0,1 h (B) e allo stazionario a 24 h (C). (Figura ricavata da COMSOL®)

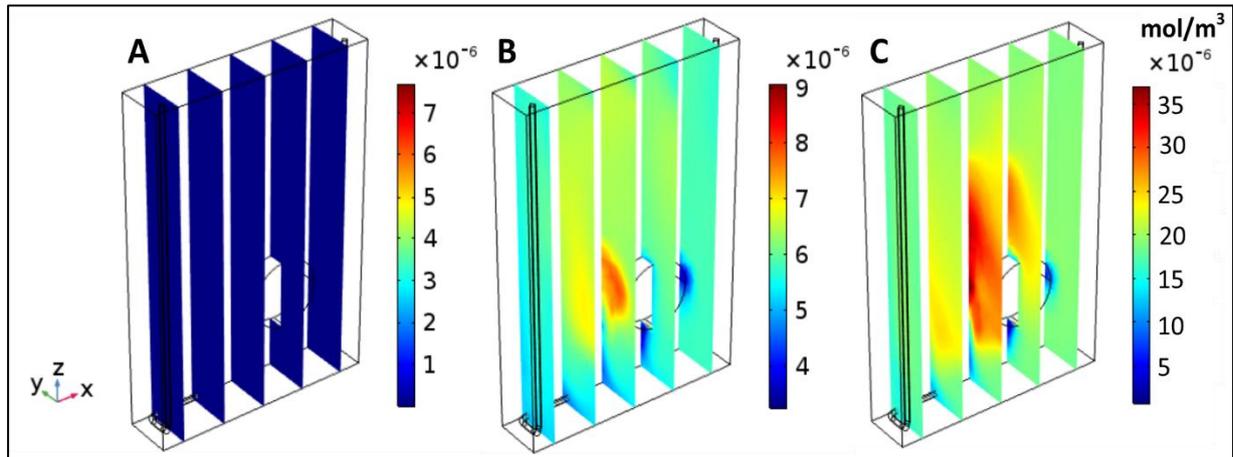
Anche per l'anidride carbonica vengono proposti e analizzati, in figura (4.14), i diagrammi a 24 h, sempre rappresentati sui tre piani di taglio  $xz$  di figura (4.8).



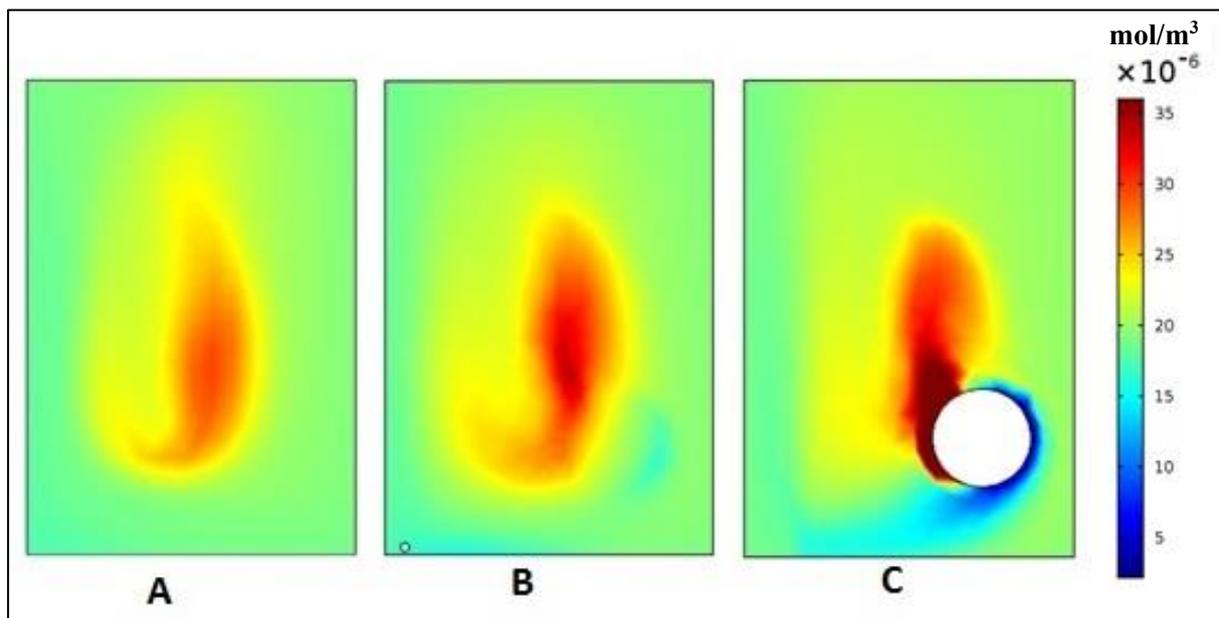
**Figura 4.14:** Andamento in  $\text{mol/m}^3$  della concentrazione di  $\text{CO}_2$  assorbita, presentato sui tre piani di taglio 1 (A), 2 (B), e 3 (C). (Figura ricavata da COMSOL®)

In figura (4.14C) si individua nuovamente la zona di picco di concentrazione in prossimità della barra magnetica, laddove si presenta anche per  $\Phi_d$ , causata dal richiamo determinato dalla rotazione della barra stessa. Inoltre si osserva nelle tre immagini di figura (4.14), come lo era per  $\Phi_d$ , una progressiva diminuzione della concentrazione dell'anidride carbonica allontanandosi dalla zona più prossima allo *sparger*, con anche un progressivo appiattimento dei gradienti. Infine, risulta evidente il picco di concentrazione nella zona centrale del fotobioreattore, determinato quasi sicuramente dall'azione di spinta sia dello *sparger*, sia della barra magnetica, azioni che agiscono in maniera contrapposta, restituendo una spinta complessiva verso il centro.

Considerando, ora, la concentrazione dell'ossigeno, vengono proposti in figura (4.15) e (4.16) i medesimi diagrammi presentati per la concentrazione di anidride carbonica.



**Figura 4.15:** Andamento in  $\text{mol/m}^3$  della concentrazione di  $\text{O}_2$  nel fotobioreattore, rappresentata su piani paralleli yz, all'istante iniziale (A), nel transitorio a 0,1 h (B) e allo stazionario a 24 h (C). (Figura ricavata da COMSOL®)

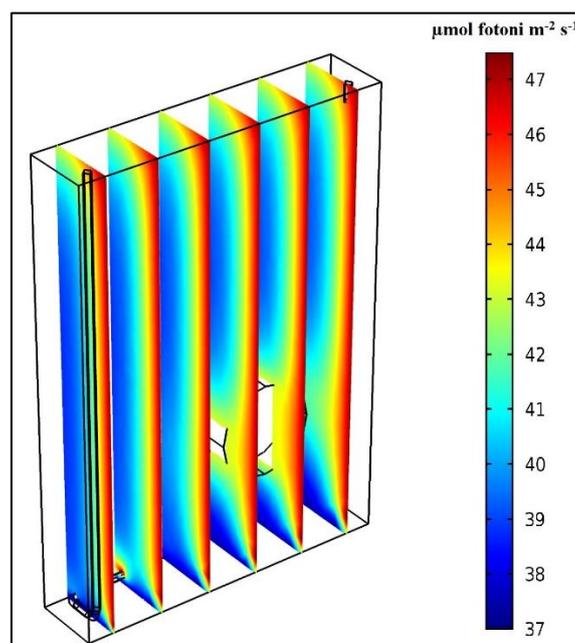


**Figura 4.16:** Andamento in  $\text{mol/m}^3$  della concentrazione di  $\text{O}_2$ , presentato sui tre piani di taglio 1 (A), 2 (B), e 3 (C). (Figura ricavata da COMSOL®)

Dalle figure (4.15) e (4.16), si osserva un andamento che è del tutto simile a quello della concentrazione dell'anidride carbonica assorbita, fatto che avvalorava i due andamenti, in quanto è prevedibile che l'ossigeno, formandosi dalla reazione che consuma l'anidride carbonica, si trovi maggiormente concentrato, laddove essa è maggiormente concentrata. Infine, è interessante osservare come i valori di concentrazione di ossigeno siano minori di quelli di anidride carbonica assorbita, in quanto la cinetica della reazione batterica con formazione dell'ossigeno è particolarmente lenta, rispetto a quella del passaggio della  $\text{CO}_2$  gassosa in soluzione; di conseguenza, l'anidride carbonica assorbita viene più rapidamente rigenerata di quanto non venga consumata per produrre ossigeno e quindi si presenta in concentrazioni maggiori rispetto a quest'ultimo. Questo fatto evidenzia anche come nelle condizioni

simulate il passo cinematicamente limitante del processo sia costituito dalla reazione del metabolismo batterico e non dall'apporto di anidride carbonica al sistema.

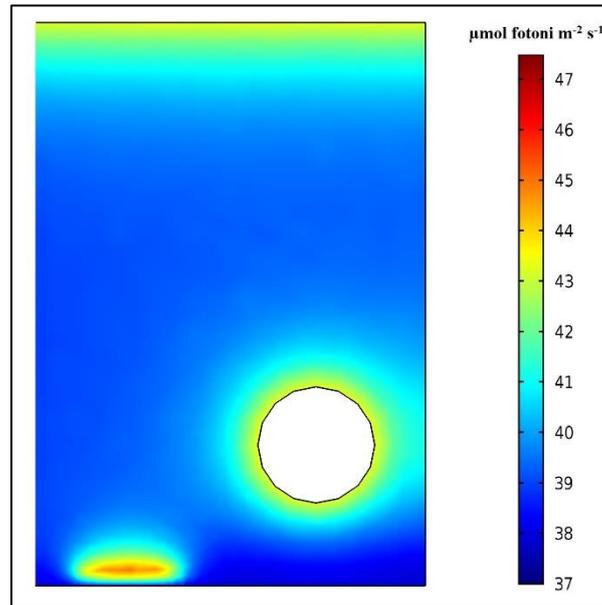
L'ultima variabile di interesse, in questo caso afferente al trasporto di calore, è l'intensità luminosa. Ultima, ma non certo per importanza, in quanto, come già affermato, è uno dei fattori focali per il funzionamento ottimale di un fotobioreattore e rappresenta, quindi, un parametro di spiccato interesse, nonché necessitante di accurato controllo. Gli andamenti di questa variabile allo stazionario a 24 h sono presentati nella figura (4.17) su piani paralleli yz e nella figura (4.18) sul piano di taglio 3 di figura (4.8); entrambe le immagini prevedono l'intensità incidente base per la simulazione, fissata a  $50 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



**Figura 4.17:** Andamento dell'intensità luminosa in  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$  all'interno del fotobioreattore visualizzata su piani paralleli in direzione yz, con l'intensità incidente di  $50 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (Figura ricavata da COMSOL®)

Osservando la figura (4.17), si possono effettuare alcune considerazioni. La prima è legata all'evidente diminuzione dell'intensità luminosa con il progressivo allontanamento dalla parete di irraggiamento, evento atteso e intuibile, in quanto il fluido interagisce con la luce incidente mediante i fenomeni di *scattering* e di assorbimento, che determinano necessariamente un abbassamento progressivo dell'intensità, come attestato anche in letteratura (Grima et al., 1994; Sukenik et al., 1991). La seconda considerazione riguarda, invece, la zona nelle immediate prossimità della barra magnetica, dove la miscela risulta fortemente agitata rispetto al resto del dominio; questa agitazione favorisce il passaggio della luce e, effettivamente, i valori simulati risultano coerenti, in quanto l'andamento dell'intensità luminosa visibile in figura descrive valori maggiori vicino alla barra rispetto alla zona appena più lontana. La terza considerazione concerne la zona basale di contatto tra acciaio e miscela, dove l'intensità luminosa presenta una brusca diminuzione, appena abbandonata la superficie di irraggiamento: questo è determinato dalle differenti proprietà di risposta alla luce proprie dell'acciaio e del brodo di reazione. L'ultima importante considerazione riguarda le zone di contatto diretto con la fase gassosa, sia in prossimità dell'ingresso, sia in prossimità del pelo libero del liquido; in queste aree, infatti, si riscontra un valore maggiore dell'intensità luminosa rispetto alle zone circostanti, a causa della minore capacità di ostacolare la luce propria del gas rispetto a quella propria del torbido brodo di reazione. Per la parte sommitale, più facilmente individuabile in figura (4.17), si osserva una curvatura importante nei valori di intensità, con dati più elevati superiormente e minori inferiormente; per la sezione di alimentazione gassosa, invece, questo fenomeno di minore abbassamento dei valori di

intensità luminosa è più facilmente osservabile in figura (4.18), dove si individua chiaramente un alone a valori più intensi appunto nei pressi dell'ingresso.



**Figura 4.18:** Andamento dell'intensità luminosa in  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$  all'interno del fotobioreattore, visualizzata sul piano di taglio 3, con l'intensità incidente di  $50 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (Figura ricavata da COMSOL®)

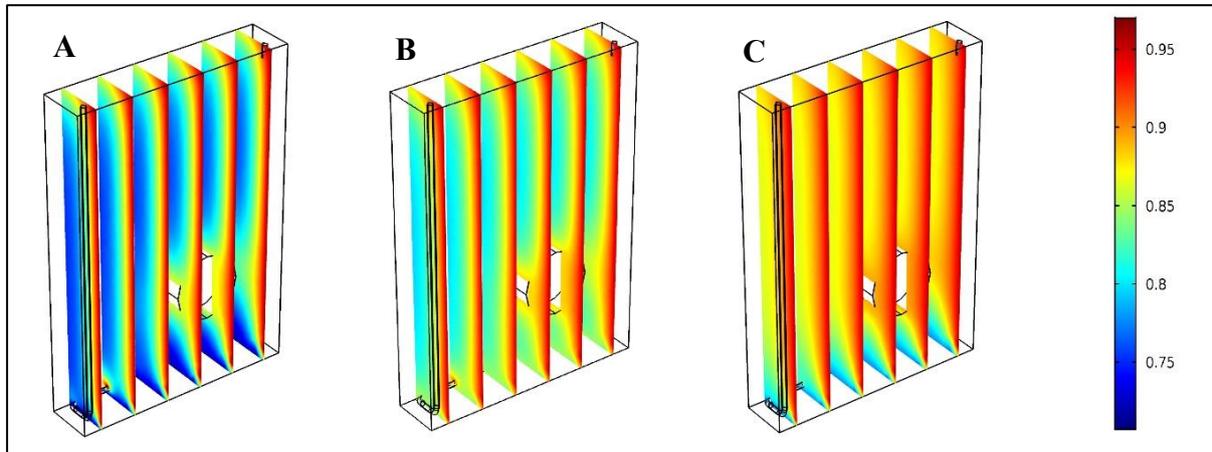
#### 4.2.3 Analisi di sensibilità – Intensità irraggiata

L'importanza dell'intensità luminosa quando si opera con i cianobatteri è già stata ripetutamente sottolineata. La necessità di avere un corretto apporto di energia è fondamentale, per non rischiare di avere una produzione limitata a causa di intensità luminose troppo basse, o di avere comunque produzioni basse, ma determinate da danni anche irreparabili alle strutture del cianobatterio, a causa del fenomeno della fotoinibizione (Chiang et al., 2011; Obeid et al., 2009). Inoltre, all'interno di un fotobioreattore, come già anche osservato nel paragrafo 4.2.2, l'andamento dell'intensità luminosa è tutt'altro che costante e questo condiziona pesantemente le cinetiche di reazione che si vedono assumere valori variabili localmente, ottimali in certe posizioni e penalizzanti in certe altre, con profili dipendenti dalla geometria reattoristica, ad incrementare ulteriormente la complessità di studio (Cornet et al., 1995; Ritchie, 2013). Poste queste necessarie premesse, un'analisi di sensibilità condotta sugli andamenti dell'intensità irraggiata all'interno del fotobioreattore, con diversi valori di intensità luminosa incidente, risulta più che giustificata e indispensabile.

Nel condurre questa analisi di sensibilità sono stati valutati tre differenti valori di intensità incidente, tratti dalle tre fasi principali a cui è andato incontro il cianobatterio nell'analisi sperimentale, ovvero  $50 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , corrispondente all'intensità di controllo,  $300 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , corrispondente alla fase di crescita massima, e  $950 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , corrispondente alla fase di fotoinibizione. Siccome per le ovvie differenze in termini di valore numerico delle intensità incidenti non sarebbe possibile effettuare un confronto visivo immediato basato sulle rappresentazioni cromatiche, dato l'appiattimento cromatico per i valori estremi troppo elevati o troppo bassi, si è optato per diagrammare tutti i risultati di intensità in ogni punto, mediante il rapporto  $R_I$ , espresso nella relazione (4.1), tra l'intensità effettivamente calcolata e l'intensità incidente, in modo da avere valori scalati comparabili, anche a intensità incidenti molto diverse.

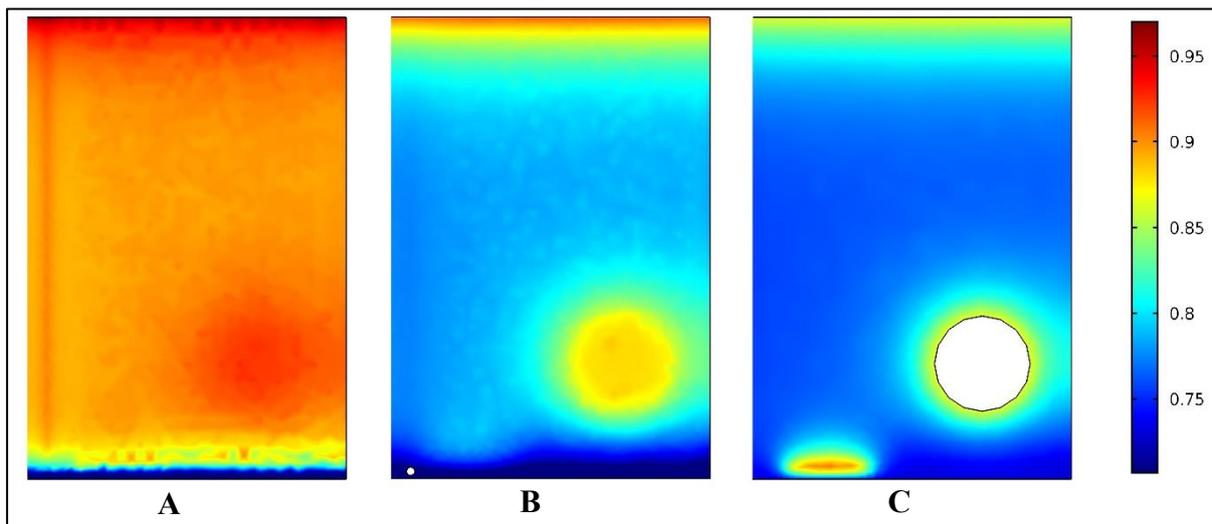
$$R_I = \frac{I_{calc}}{I_{inc}} \quad (4.1)$$

I risultati ottenuti dalle simulazioni del *software* sono presentati in figura (4.19) su piani paralleli in direzione yz e nelle figure (4.20), (4.21) e (4.22) sui tre piani di taglio in direzione xz di figura (4.8), per le tre intensità incidenti.

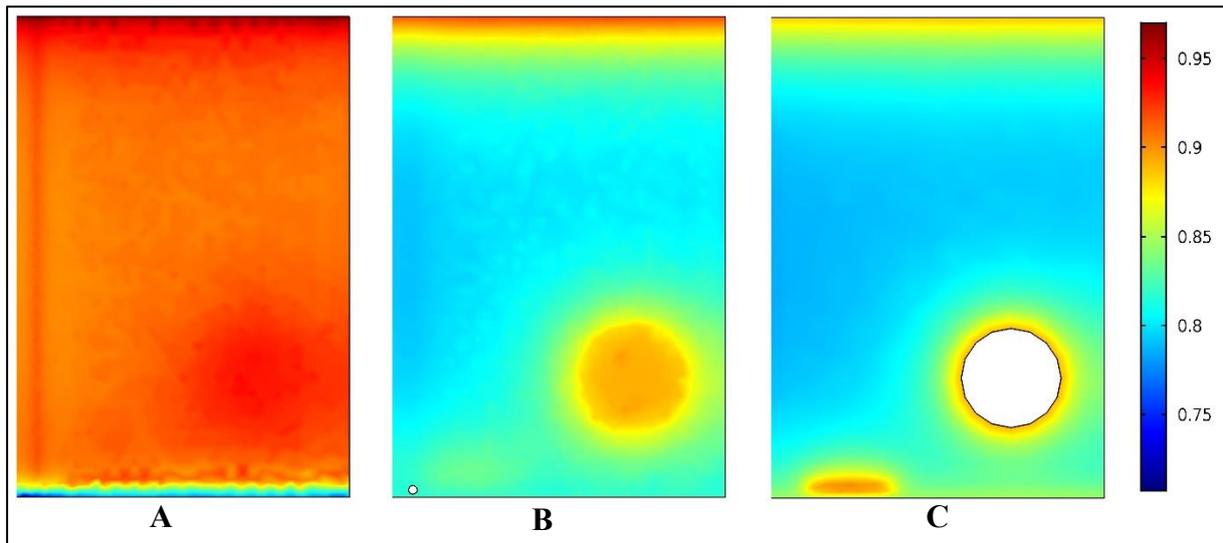


**Figura 4.19:** Andamento del rapporto  $R_I$  all'interno del fotobioreattore, visualizzato su piani paralleli in direzione yz, per le tre diverse intensità incidenti valutate:  $50 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (figura A),  $300 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (figura B),  $950 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (figura C). (Figura ricavata da COMSOL®)

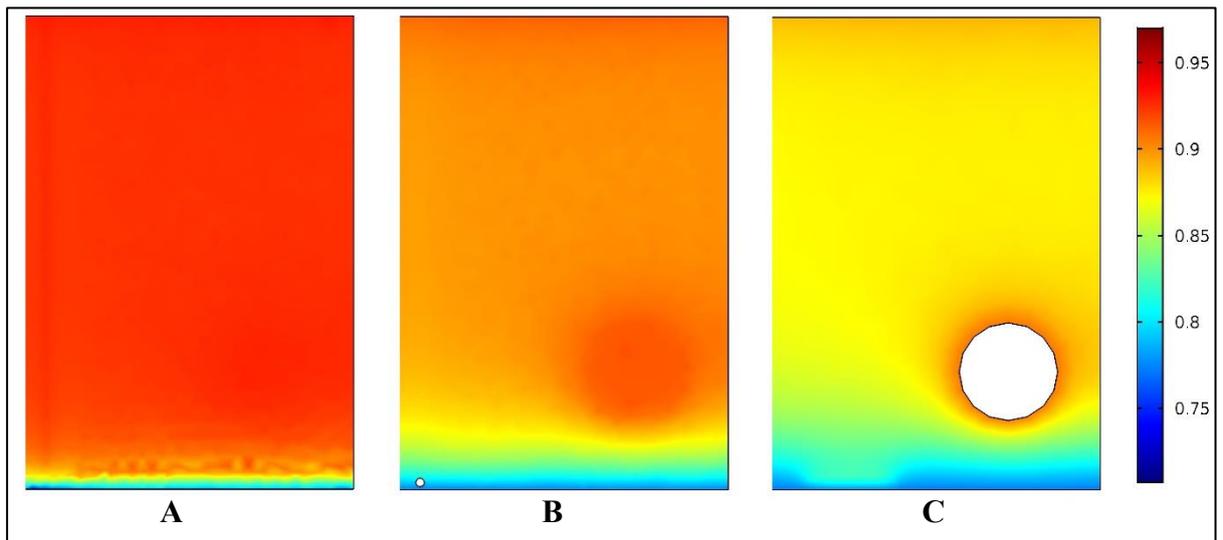
Gli andamenti del rapporto  $R_I$  presentano le medesime caratteristiche evidenziate nel paragrafo 4.2.2 per tutte le tre diverse intensità incidenti, ovvero  $R_I$  offre: valori più elevati rispetto alla zona circostante nei punti prossimi all'alimentazione gassosa (figure (4.20C), (4.21C), (4.22C)), al pelo libero del liquido (figura (4.19)) e in prossimità della barra magnetica rotante (figure (4.20), (4.21), (4.22)); valori inferiori rispetto alla zona circostante per la sezione basale di contatto tra acciaio e brodo di reazione (figure (4.20A), (4.21A), (4.22A)); valori progressivamente decrescenti con l'aumentare della distanza dalla parete irraggiante (figura (4.19)).



**Figura 4.20:** Andamento del rapporto  $R_I$  all'interno del fotobioreattore per l'intensità incidente di  $50 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , visualizzato sui tre diversi piani di taglio in direzione xz: piano 1 (A), piano 2 (B), piano 3 (C). (Figura ricavata da COMSOL®)



**Figura 4.21:** Andamento del rapporto  $R_l$  all'interno del fotobioreattore per l'intensità incidente di  $300 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , visualizzato sui tre diversi piani di taglio in direzione xz: piano 1 (A), piano 2 (B), piano 3 (C). (Figura ricavata da COMSOL®)



**Figura 4.22:** Andamento del rapporto  $R_l$  all'interno del fotobioreattore per l'intensità incidente di  $950 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , visualizzato sui tre diversi piani di taglio in direzione xz: piano 1 (A), piano 2 (B), piano 3 (C). (Figura ricavata da COMSOL®)

Nonostante gli andamenti sembrano essere i medesimi per tutte le tre intensità incidenti, è necessario porre l'attenzione sul fatto che i gradienti di  $R_l$ , e quindi di intensità luminosa, divengono progressivamente meno evidenti al crescere dell'intensità incidente. In effetti questo fenomeno, già visibile nelle zone in prossimità della barra magnetica e del gas, sia in figura (4.19) sia nelle figure (4.20), (4.21) e (4.22), risulta particolarmente evidente all'aumentare della distanza dalla parete irraggiante; infatti con l'intensità di  $950 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , in particolare,  $R_l$  rimane a valori molto elevati anche a distanza massima (figura (4.22C)). Quindi è importante, in fase di predisposizione del reattore, valutare accuratamente il valore di intensità luminosa da irraggiare, poiché questo non condiziona solo i valori interni, ma anche come questi vengono distribuiti.

Un fenomeno del tipo appena descritto non è sicuramente positivo per il cianobatterio, che va appunto incontro al fenomeno dannoso della fotoinibizione, perché si ritrova colpito da alti valori di intensità

luminosa in ogni punto del fotobioreattore, quando l'intensità incidente è abbastanza elevata, come si è manifestato anche nelle prove sperimentali. Qualora, invece, la luce incidente non si presenti con valori così intensi, i gradienti interni risultano più spiccati e questo consente alle cellule non solo di non venire danneggiate, ma anche e soprattutto di potersi rigenerare dai momenti a più alta intensità luminosa. In effetti la miscela reagente è in continua movimentazione e questo determina, a livello microscopico, un continuo passaggio delle cellule attraverso punti a intensità luminosa sempre differente (Grima et al., 1993). Di conseguenza, operare con intensità incidenti più basse può essere ottimale, oltre che per evitare effetti pesanti di fotoinibizione, anche per avvalersi di queste regioni del fotobioreattore a più bassa intensità luminosa, così da consentire una rigenerazione del cianobatterio; inoltre migliorerebbe anche l'efficienza fotosintetica del processo, in quanto elevate intensità incidenti determinano uno spreco di parte della luce fornita (Barbosa et al., 2001). Quest'ultima affermazione è stata anche verificata nel lavoro di tesi valutando l'efficienza fotosintetica stessa, mediante l'integrazione dei dati sperimentali per il peso secco e di quelli modellistico-computazionali per l'intensità luminosa media uscente dal fotobioreattore. L'efficienza fotosintetica è espressa mediante il rapporto tra i grammi di peso secco batterico prodotti in un'ora e le moli di fotoni assorbite in un'ora (queste ultime date dalla differenza tra l'intensità luminosa totale incidente e l'intensità luminosa media uscente); i risultati per le tre intensità incidenti analizzate sono visibili in tabella (4.6) e concordano con precedenti risultati sperimentali (Schuurmans et al., 2015). Quanto affermato poco sopra, quindi, risulta evidente dalla tabella (4.6), poiché i valori dell'efficienza fotosintetica diminuiscono con l'aumentare dell'intensità luminosa irraggiata.

**Tabella 4.6.** Valori dell'efficienza fotosintetica corrispondenti a ciascuna intensità luminosa incidente considerata nell'analisi di sensibilità.

<b>Intensità luminosa incidente, <math>\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}</math></b>	<b>Efficienza fotosintetica, <math>\text{g}_{\text{peso secco}} / \text{mol fotoni}</math></b>
<b>50</b>	2,70
<b>300</b>	1,33
<b>950</b>	0,48

## 5. Conclusioni

L'intero lavoro si è concentrato su un tipo specifico di processo, il fotobioprocesso, in particolare dedicandosi alla categoria del fotobioreattore e, più precisamente, al fotobioreattore a pannello. Questo tipo di processo si rivela particolarmente promettente, come già enucleato, non solo per affrontare il problema attuale dell'inquinamento atmosferico da anidride carbonica, che ne è il principale destinatario, ma anche come possibile realizzatore di prodotti valevoli e di uso più o meno comune. Questi rappresentano di per sé una componente secondaria, in quanto non costituiscono il fine primo del processo, tuttavia sono essenziali a garantire la sostenibilità del processo stesso e quindi la sua adozione, soprattutto da un punto di vista economico. Il fotobioreattore, poi, è sicuramente la via più suggerita per queste svariate applicazioni, poiché offre la possibilità di avere condizioni di reazione più facilmente monitorabili e controllabili. La tipologia a pannello, infine, costituisce, come affermato, una di quelle più funzionali, in particolare per le migliori potenzialità nell'irraggiamento luminoso.

Questo aspetto dell'irraggiamento è stato più volte presentato nel corso dell'elaborato come un elemento cruciale nell'esercizio di un fotobioreattore, in quanto è il fattore, insieme alla concentrazione di anidride carbonica, tipicamente più problematico e limitante per lo sviluppo e la produttività dei cianobatteri. Perciò è stato specificamente analizzato sia in via sperimentale sia in via computazionale, con il cianobatterio *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Il lavoro sperimentale, in primo luogo, è stato concentrato proprio sull'incidenza dell'intensità luminosa irraggiata verso l'attività batterica, in modo da comprendere l'entità del fenomeno fotoinibitorio e studiarne il sopraggiungimento nel cianobatterio impiegato. Provvedendo a modificare il valore di intensità irraggiata a intervalli temporali di 24 h, sono stati studiati alcuni parametri esemplificativi dello stato vitale del cianobatterio, come il tasso di crescita, la concentrazione di ossigeno, le dimensioni cellulari, il peso secco e le concentrazioni di pigmenti fotosintetici, quali clorofilla *a* e carotenoidi. Tutti questi parametri hanno manifestato una dipendenza importante dalle condizioni luminose, corroborando la tesi dell'importanza sostanziale di queste ultime per l'attività cianobatterica e per la sussistenza cellulare. Inoltre, si è evidenziato dai risultati sperimentali come *Synechocystis* subisca la fotoinibizione solo a valori di intensità irraggiata molto alta, caratteristica che lo rende un cianobatterio particolarmente interessante per gli sviluppi futuri della fotobioreattoristica, in quanto permette un margine operativo più ampio rispetto ad altre tipologie di cianobatteri. In aggiunta a questo, è stata osservata sperimentalmente la sua spiccata abilità di recupero dal fenomeno fotoinibitorio (venendo sottoposto a condizioni ottimali dopo condizioni di forte stress), con la quale è riuscito a cancellare tutti gli effetti negativi determinati dal fenomeno in esame; anche questa proprietà è particolarmente interessante da un punto di vista industriale, perché denota l'elevata resilienza di *Synechocystis*.

L'approccio modellistico-computazionale, invece, ha considerato un numero maggiore di aspetti, che hanno riguardato la fluidodinamica, il trasporto di materia, il trasporto di calore e le reazioni chimiche, in modo da studiare e descrivere più nel dettaglio le caratteristiche del fotobioreattore a pannello e da consentirne una comprensione maggiore da un punto di vista ingegneristico, nell'ottica di una futura applicazione e ottimizzazione. L'aspetto più evidenziato e discusso, comunque, è stato di nuovo quello riferito all'intensità luminosa, considerando in particolare, a livello di simulazione, i suoi andamenti all'interno del reattore e l'eventuale dipendenza di questi dal valore dell'intensità incidente. Quanto risultato ha manifestato un elemento problematico dato dalle alte intensità luminose, che tendono ad appiattire i gradienti luminosi interni, generando degli stress eccessivi per il cianobatterio interessato dall'irraggiamento. Questo ha portato a riflettere sulla predilezione delle intensità luminose incidenti di valore minore per una futura ottimizzazione dell'apparecchio, scelta suggerita anche dalla migliore efficienza del processo nello sfruttamento della luce, nel caso a più minore intensità.

Infine, sempre nell'ottica di una ottimizzazione della categoria di fotobioreattore analizzata per una applicazione futura più pervasiva nei possibili sbocchi descritti nell'introduzione al presente lavoro, studi ulteriori dovrebbero essere condotti per via sperimentale e, soprattutto, computazionale. Il primo dovrebbe consistere in uno studio di luce pulsata sul sistema modellato, in modo da poter approfondire l'influenza dell'intensità incidente sugli andamenti luminosi interni e da descrivere e comprendere le loro variazioni in funzione di questa intensità; in effetti l'effetto *flash* può costituire anche un valido ausilio per il miglioramento della produttività del fotobioreattore. Il secondo dovrebbe prevedere l'uso

di coefficienti legati al fenomeno dell'irraggiamento (*scattering* e assorbimento) non costanti su tutto il volume del brodo di reazione, ma variabili in funzione degli spostamenti cellulari, secondo un processo di *particles tracking*. Questo consentirebbe una descrizione più precisa degli andamenti luminosi interni e delle effettive condizioni a cui andrebbero incontro le cellule, valutando più correttamente anche i tempi di permanenza delle cellule nelle aree a diversa intensità luminosa, il qual fatto, come affermato in precedenza, è un elemento molto importante per ottimizzare il funzionamento del reattore. Un ulteriore studio richiederebbe di essere indirizzato alla valutazione degli stress meccanici superficiali dovuti alle condizioni fluidodinamiche che le cellule cianobatteriche potrebbero subire, in modo da comprendere i limiti di resistenza di queste cellule prima che vengano danneggiate e distrutte; lo studio dovrebbe essere incentrato su una variazione progressiva dell'agitazione della miscela, elemento realizzabile sia sperimentalmente sia computazionalmente. Infine, un'ultima via possibile da percorrere consisterebbe nel cambiamento della geometria dello *sparger* e delle modalità di insufflaggio, in modo da studiarne l'influenza sulla solubilizzazione del gas alimentato al brodo di coltura e, come naturale conseguenza, sulle cinetiche di reazione, di cui il gas costituisce un reagente importante.

## 6. Lista dei simboli

**A:** Fattore pre-esponenziale della legge di Arrhenius.

**A:** Matrice quadrata sparsa dei coefficienti non simmetrica, simmetrica definita positiva o solo simmetrica.

**A<sub>j</sub>:** Assorbanza a  $j$  nm.

**b:** Vettore dei termini noti.

**C<sub>B</sub>:** Concentrazione batterica, mol/m<sup>3</sup>.

**c<sub>d</sub>:** Frazione massica della fase dispersa.

**C<sub>i</sub>:** Concentrazione della specie  $i$ -esima, mol/m<sup>3</sup>.

**C<sub>i,g</sub>:** Concentrazione della specie  $i$ -esima in fase gassosa, mol/m<sup>3</sup>.

**C<sub>i,l</sub>:** Concentrazione della specie  $i$ -esima in fase liquida, mol/m<sup>3</sup>.

**C<sub>p</sub>:** Calore specifico a pressione costante, J kg<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>.

**C<sub>ε1</sub>:** Parametro di turbolenza.

**C<sub>ε2</sub>:** Parametro di turbolenza.

**C<sub>μ</sub>:** Parametro di turbolenza.

**D:** Matrice diagonale.

**D<sub>i</sub>:** Coefficiente di diffusività della specie  $i$ -esima, m<sup>2</sup>/s.

**D<sub>md</sub>:** Coefficiente di dispersione turbolenta, m<sup>2</sup>/s.

**D<sub>P1</sub>:** Coefficiente di diffusione P1, m.

**E:** Energia massica, J/kg.

**F:** Forza per unità di volume, N/m<sup>3</sup>.

**g:** Modulo vettore accelerazione gravitazionale, m/s<sup>2</sup>.

**g:** Vettore accelerazione gravitazionale, m/s<sup>2</sup>.

**G:** Radiazione incidente, W/m<sup>2</sup>.

**H:** Altezza, m.

**H<sub>i</sub>:** Costante di Henry della specie  $i$ -esima, mol m<sup>-3</sup> Pa<sup>-1</sup>.

**I:** Intensità irraggiata, W/m<sup>2</sup>.

**I:** Matrice identità.

**I<sub>b</sub>:** Intensità irraggiata da un corpo nero, W/m<sup>2</sup>.

**I<sub>calc</sub>:** Intensità irraggiata calcolata, W/m<sup>2</sup>.

**I<sub>inc</sub>:** Intensità irraggiata incidente, W/m<sup>2</sup>.

**J<sub>i</sub><sup>\*</sup>:** Flusso diffusivo molare della specie  $i$ -esima, mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

**k:** Coefficiente di conducibilità termica, W m<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>.

**k:** Costante cinetica.

**k:** Energia cinetica turbolenta, m<sup>2</sup>/s<sup>2</sup>.

$k_i$ : Costante di fotoinibizione,  $W/m^2$ .  
 $k_s$ : Costante di saturazione luminosa,  $W/m^2$ .  
 $K_s$ : Costante della legge di Monod,  $mol/m^3$ .  
**L**: Matrice triangolare inferiore.  
 $m_{dc}$ : Termine di trasferimento di materia da fase dispersa a fase continua,  $kg\ m^{-3}\ s^{-1}$ .  
**n**: Vettore normale.  
 $N_i$ : Flusso molare totale della specie  $i$ -esima,  $mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ .  
 $n_r$ : Indice di rifrazione del mezzo.  
 $N_{\phi_d}$ : Flusso della fase dispersa,  $m/s$ .  
 $OD_j$ : Densità ottica a  $j$  nm.  
 $p$ : Pressione, Pa.  
 $p_i$ : Pressione parziale della specie  $i$ -esima, Pa.  
**P<sub>k</sub>**: Produzione dell'energia cinetica turbolenta, Pa/s.  
**PHB**: Poli- $\beta$ -idrossibutirrato (bioplastica).  
**PRK**: Fosforibulosiochinasi.  
**q**: Flusso conduttivo,  $W/m^2$ .  
 $Q$ : Termine generico di generazione di calore,  $W/m^3$ .  
 $Q_p$ : Termine di generazione di calore dovuto a forze di pressione,  $W/m^3$ .  
**q<sub>r</sub>**: Flusso di calore per irraggiamento,  $W/m^2$ .  
 $Q_r$ : Termine di generazione di calore dovuto all'irraggiamento,  $W/m^3$ .  
 $Q_{vd}$ : Termine di generazione di calore dovuto agli sforzi viscosi,  $W/m^3$ .  
 $R_B$ : Velocità di crescita batterica,  $mol\ m^{-3}\ h^{-1}$ .  
 $R_i$ : Velocità di reazione della specie  $i$ -esima,  $mol\ m^{-3}\ s^{-1}$ .  
 $R_l$ : Rapporto tra intensità luminosa calcolata e intensità incidente.  
**RuBisCO**: Enzima ribulosio-1,5-bifosfato carbossilasi/ossigenasi.  
 $S$ : Concentrazione del substrato,  $mol/m^3$ .  
 $t$ : Tempo, s.  
 $T$ : Temperatura, K.  
**u**: Vettore velocità,  $m/s$ .  
**u<sub>c</sub>**: Vettore velocità della fase continua,  $m/s$ .  
**u<sub>d</sub>**: Vettore velocità della fase dispersa,  $m/s$ .  
**u<sub>slip</sub>**: Vettore velocità relativa tra le due fasi dispersa e continua,  $m/s$ .  
**U**: Matrice triangolare superiore.  
 $z$ : Coordinata cartesiana verticale, m.  
 $\alpha_p$ : Coefficiente di espansione termica,  $K^{-1}$ .  
 $\gamma$ : Rapporto tra i calori specifici a pressione e a volume costante.  
 $\Delta E_a$ : Energia di attivazione,  $J/mol$ .

$\varepsilon$ : Emissività.

$\varepsilon$ : Velocità di dissipazione turbolenta,  $\text{m}^2/\text{s}^3$ .

$\kappa$ : Coefficiente di assorbimento,  $\text{m}^{-1}$ .

$\mu$ : Tasso di crescita batterico specifico,  $\text{h}^{-1}$ .

$\mu$ : Viscosità dinamica, Pa s.

$\mu_{\text{max}}$ : Tasso di crescita batterico specifico massimo,  $\text{h}^{-1}$ .

$\mu_T$ : Viscosità dinamica turbolenta, Pa s.

$\rho$ : Densità volumica,  $\text{kg}/\text{m}^3$ .

$\rho_c$ : Densità volumica della fase continua,  $\text{kg}/\text{m}^3$ .

$\rho_d$ : Densità volumica della fase dispersa,  $\text{kg}/\text{m}^3$ .

$\sigma$ : Costante di Stefan-Boltzmann,  $\text{W m}^{-2} \text{K}^{-4}$ .

$\sigma_\varepsilon$ : Parametro di turbolenza.

$\sigma_k$ : Parametro di turbolenza.

$\sigma_s$ : Coefficiente di *scattering*,  $\text{m}^{-1}$ .

$\sigma_T$ : Numero di Schmidt particellare turbolento.

$\tau$ : Tensore opposto del tensore deviatorio,  $\text{N}/\text{m}^2$ .

$\phi_c$ : Frazione volumica della fase continua.

$\phi_d$ : Frazione volumica della fase dispersa.

$\Omega$ : Angolo solido, sr.



## 7. Riferimenti bibliografici

- Ai, W., Guo, S., Qin, L., and Tang, Y. (2008). "Development of a ground-based space microalgae photo-bioreactor." *Advances in Space Research*, 41(5), 742-747.
- Aiba, S. (1982). "Growth kinetics of photosynthetic microorganisms." *Microbial reactions*, 85-156.
- Anfelt, J., Kaczmarzyk, D., Shabestary, K., Renberg, B., Rockberg, J., Nielsen, J., Uhlén, M., and Hudson, E. P. (2015). "Genetic and nutrient modulation of acetyl-CoA levels in *Synechocystis* for n-butanol production." *Microbial cell factories*, 14(1), 167.
- Barbato, F., Campiotti, C. A., Giagnacovo, G., Pignatelli, V., Tumminelli, D., Viola, C., and Diorato, E. S. (2012). "Sfruttamento delle microalghe: tra realtà e prospettive." *GREEN : LA SCIENZA AL SERVIZIO DELL'UOMO E DELL'AMBIENTE*, 26(26), 19-28.
- Barbosa, M. J., Rocha, J. M., Tramper, J., and Wijffels, R. H. (2001). "Acetate as a carbon source for hydrogen production by photosynthetic bacteria." *Journal of biotechnology*, 85(1), 25-33.
- Bird, R. B., Stewart, W. E., and Lightfoot, E. N. (2002). *Transport Phenomena (revised 2nd edition)*, John Wiley & Sons.
- Červený, J., Sinetova, M. A., Závřel, T., and Los, D. A. (2015). "Mechanisms of high temperature resistance of *Synechocystis* sp. PCC 6803: an impact of histidine kinase 34." *Life*, 5(1), 676-699.
- Chiang, C.-L., Lee, C.-M., and Chen, P.-C. (2011). "Utilization of the cyanobacteria *Anabaena* sp. CH1 in biological carbon dioxide mitigation processes." *Bioresource technology*, 102(9), 5400-5405.
- COMSOL®. (2017). "COMSOL® User's Guide (version 5.3 a)."
- Constant, S., Eisenberg-Domovitch, Y., Ohad, I., and Kirilovsky, D. (2000). "Recovery of photosystem II activity in photoinhibited *Synechocystis* cells: Light-dependent translation activity is required besides light-independent synthesis of the D1 protein." *Biochemistry*, 39(8), 2032-2041.
- Cooney, C. L. (1983). "Bioreactors: design and operation." *Science*, 219(4585), 728-733.
- Cornet, J.-F., Dussap, C., Gros, J.-B., Binois, C., and Lasseur, C. (1995). "A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors." *Chemical Engineering Science*, 50(9), 1489-1500.
- Cuellar-Bermudez, S. P., Romero-Ogawa, M. A., Vannela, R., Lai, Y. S., Rittmann, B. E., and Parra-Saldivar, R. (2015). "Effects of light intensity and carbon dioxide on lipids and fatty acids produced by *Synechocystis* sp. PCC6803 during continuous flow." *Algal Research*, 12, 10-16.
- Dai, G. Z., Qiu, B. S., and Forchhammer, K. (2014). "Ammonium tolerance in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and the role of the *psbA* multigene family." *Plant, cell & environment*, 37(4), 840-851.
- Dasgupta, C. N., Gilbert, J. J., Lindblad, P., Heidorn, T., Borgvang, S. A., Skjanes, K., and Das, D. (2010). "Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production." *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10218-10238.
- Du, W., Jongbloets, J. A., Hernández, H. P., Bruggeman, F. J., Hellingwerf, K. J., and dos Santos, F. B. (2016). "Photonfluxostat: A method for light-limited batch cultivation of cyanobacteria at different, yet constant, growth rates." *Algal research*, 20, 118-125.

- Dutta, R. (2008). *Fundamentals of biochemical engineering*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- ENGICOIN. (2017). "Engineered microbial factories for CO<sub>2</sub> exploitation in an integrated waste treatment platform." Proposal number: 760994-2 Call: H2020-NMBP-2016-2017.
- Fenn, R., Clough, S., Gallery, W., Good, R., Kneizys, F., Mill, J., Rothman, L., Shettle, E., and Volz, F. (1985). "Optical and infrared properties of the atmosphere." *Handbook of Geophysics and the Space Environment*, 18.
- Fu, T., Tang, J., Chen, K., and Zhang, F. (2016). "Scattering and absorption coefficients of silica-doped alumina aerogels." *Applied optics*, 55(4), 705-711.
- Goli, A., Shamiri, A., Talaiekhosani, A., Eshtiaghi, N., Aghamohammadi, N., and Aroua, M. K. (2016). "An overview of biological processes and their potential for CO<sub>2</sub> capture." *Journal of Environmental Management*, 183(Part 1), 41-58.
- Grima, E. M., Camacho, F. G., Pérez, J., Sevilla, J., Fernandez, F., and Gomez, A. C. (1994). "A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture." *Journal of chemical technology and biotechnology*, 61(2), 167-173.
- Grima, E. M., Pérez, J. S., Camacho, F. G., Sánchez, J. G., and Alonso, D. L. (1993). "n-3 PUFA productivity in chemostat cultures of microalgae." *Applied microbiology and biotechnology*, 38(5), 599-605.
- Havaux, M. (2014). "Carotenoid oxidation products as stress signals in plants." *The Plant Journal*, 79(4), 597-606.
- Hollinshead, W. D., Varman, A. M., You, L., Hembree, Z., and Tang, Y. J. (2014). "Boosting d-lactate production in engineered cyanobacteria using sterilized anaerobic digestion effluents." *Bioresource technology*, 169, 462-467.
- Kada, S., Koike, H., Satoh, K., Hase, T., and Fujita, Y. (2003). "Arrest of chlorophyll synthesis and differential decrease of photosystems I and II in a cyanobacterial mutant lacking light-independent protochlorophyllide reductase." *Plant molecular biology*, 51(2), 225-235.
- Kim, H. W., Vannela, R., Zhou, C., and Rittmann, B. E. (2011). "Nutrient acquisition and limitation for the photoautotrophic growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 as a renewable biomass source." *Biotechnology and bioengineering*, 108(2), 277-285.
- Kiyota, H., Ikeuchi, M., and Hirai, M. Y. (2012). "Response of amino acid metabolism to sulfur starvation in *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Sulfur Metabolism in Plants*, Springer, 53-59.
- Kopečná, J., Komenda, J., Bučinská, L., and Sobotka, R. (2012). "Long-term acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to high light is accompanied by an enhanced production of chlorophyll that is preferentially channeled to trimeric photosystem I." *Plant physiology*, 160(4), 2239-2250.
- Kumar, K., Dasgupta, C. N., Nayak, B., Lindblad, P., and Das, D. (2011). "Development of suitable photobioreactors for CO<sub>2</sub> sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria." *Bioresource technology*, 102(8), 4945-4953.
- Lea-Smith, D. J., Ortiz-Suarez, M. L., Lenn, T., Nürnberg, D. J., Baers, L. L., Davey, M. P., Parolini, L., Huber, R. G., Cotton, C. A., and Mastroianni, G. (2016). "Hydrocarbons Are Essential for Optimal Cell Size, Division, and Growth of Cyanobacteria." *Plant physiology*, 172(3), 1928-1940.
- Martínez, L., Redondas, V., García, A. I., and Morán, A. (2011). "Optimization of growth operational conditions for CO<sub>2</sub> biofixation by native *Synechocystis* sp." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86(5), 681-690.
- McNaught, A. D., and Wilkinson, A. (1997). *Compendium of chemical terminology*, Blackwell Science Oxford.

- Meyerott, R. E., Sokoloff, J., and Nicholls, R. (1960). "Absorption coefficients of air." LOCKHEED MISSILES AND SPACE CO INC SUNNYVALE CA.
- Monshupanee, T., and Incharoensakdi, A. (2014). "Enhanced accumulation of glycogen, lipids and polyhydroxybutyrate under optimal nutrients and light intensities in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Journal of applied microbiology*, 116(4), 830-838.
- Montgomery, B. L. (2015). "Light-dependent governance of cell shape dimensions in cyanobacteria." *Frontiers in microbiology*, 6, 514.
- Muramatsu, M., and Hihara, Y. (2012). "Acclimation to high-light conditions in cyanobacteria: from gene expression to physiological responses." *Journal of plant research*, 125(1), 11-39.
- Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., and Allakhverdiev, S. I. (2007). "Photoinhibition of photosystem II under environmental stress." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767(6), 414-421.
- Narasimhan, S. G., Gupta, M., Donner, C., Ramamoorthi, R., Nayar, S. K., and Jensen, H. W. "Acquiring scattering properties of participating media by dilution." *ACM Transactions on Graphics (TOG)*, 1003-1012.
- Nicolau, V. D. P., and Maluf, F. P. "Determination of radiative properties of commercial glass." *18th Conference on Passive and Low Energy Architecture, Florianopolis (Brazil)*, 7-9.
- Nozzi, N., Oliver, J., and Atsumi, S. (2013). "Cyanobacteria as a platform for biofuel production. ." *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 1.
- Obeid, J., Magnin, J.-P., Flaus, J.-M., Adrot, O., Willison, J. C., and Zlatev, R. (2009). "Modelling of hydrogen production in batch cultures of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*." *international journal of hydrogen energy*, 34(1), 180-185.
- Pade, N., Erdmann, S., Enke, H., Dethloff, F., Dühring, U., Georg, J., Wambutt, J., Kopka, J., Hess, W. R., and Zimmermann, R. (2016). "Insights into isoprene production using the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 89.
- Pulz, O. (2001). "Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms." *Applied microbiology and biotechnology*, 57(3), 287-293.
- Ritchie, R. J. (2013). "The use of solar radiation by the photosynthetic bacterium, *Rhodospseudomonas palustris*: model simulation of conditions found in a shallow pond or a flatbed reactor." *Photochemistry and photobiology*, 89(5), 1143-1162.
- Rosgaard, L., de Porcellinis, A. J., Jacobsen, J. H., Frigaard, N.-U., and Sakuragi, Y. (2012). "Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants." *Journal of biotechnology*, 162(1), 134-147.
- Röttgers, R., Doerfer, R., McKee, D., and Schönfeld, W. (2010). "Pure water spectral absorption, scattering, and real part of refractive index model." *ESA algorithm technical basis document*, 1-18.
- Sander, R. (2015). "Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent." *Atmospheric Chemistry & Physics*, 15(8).
- Schaechter, M. (2009). *Encyclopedia of microbiology*, Academic Press.
- Schuermans, R. M., van Alphen, P., Schuurmans, J. M., Matthijs, H. C., and Hellingwerf, K. J. (2015). "Comparison of the photosynthetic yield of cyanobacteria and green algae: different methods give different answers." *PloS one*, 10(9), e0139061.
- Sinetova, M. A., Červený, J., Zavřel, T., and Nedbal, L. (2012). "On the dynamics and constraints of batch culture growth of the cyanobacterium *Cyanothece* sp. ATCC 51142." *Journal of biotechnology*, 162(1), 148-155.
- Stanier, R., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971). "Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales)." *Bacteriological reviews*, 35(2), 171.

- Steiger, S., Schäfer, L., and Sandmann, G. (1999). "High-light-dependent upregulation of carotenoids and their antioxidative properties in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 52(1-3), 14-18.
- Sukenik, A., Levy, R., Levy, Y., Falkowski, P., and Dubinsky, Z. (1991). "Optimizing algal biomass production in an outdoor pond: a simulation model." *Journal of applied phycology*, 3(3), 191-201.
- Tamburic, B., Zemichael, F. W., Maitland, G. C., and Hellgardt, K. (2012). "A novel nutrient control method to deprive green algae of sulphur and initiate spontaneous hydrogen production." *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(11), 8988-9001.
- Tola, V., and Cau, G. (2010). "Analisi, modellazione e sperimentazione di processi di produzione e trattamento del syngas proveniente da gassificazione del carbone." *Meccanica*.
- Trautmann, A., Watzer, B., Wilde, A., Forchhammer, K., and Posten, C. (2016). "Effect of phosphate availability on cyanophycin accumulation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and the production strain BW86." *Algal Research*, 20, 189-196.
- Trautmann, D., Beyer, P., and Al-Babili, S. (2013). "The ORF slr0091 of *Synechocystis* sp. PCC6803 encodes a high-light induced aldehyde dehydrogenase converting apocarotenals and alkanals." *The FEBS journal*, 280(15), 3685-3696.
- Tsai, D. D.-W., Ramaraj, R., and Chen, P. H. (2016). "Carbon dioxide bio-fixation by algae of high rate pond on natural water medium." *Ecological Engineering*, 92, 106-110.
- United States Congress Office of Technology Assessment. (1984). "Commercial Biotechnology: An International Analysis." Washington D.C.
- van Alphen, P., and Hellingwerf, K. J. (2015). "Sustained circadian rhythms in continuous light in *Synechocystis* sp. PCC6803 growing in a well-controlled photobioreactor." *PloS one*, 10(6), e0127715.
- Vavilin, D., Brune, D. C., and Vermaas, W. (2005). "15N-labeling to determine chlorophyll synthesis and degradation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 strains lacking one or both photosystems." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1708(1), 91-101.
- Verga, R., and Pilone, M. S. (2001). *Biochimica industriale: Enzimi e loro applicazioni nella bioindustria*, Springer Science & Business Media.
- Vogel, H. C., and Todaro, C. M. (2014). *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook - Principles, Process Design, and Equipment (3rd Edition)*, Elsevier.
- Wellburn, A. R. (1994). "The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution." *Journal of plant physiology*, 144(3), 307-313.
- Winn, E. B. (1950). "The temperature dependence of the self-diffusion coefficients of argon, neon, nitrogen, oxygen, carbon dioxide, and methane." *Physical review*, 80(6), 1024.
- Yao, D. C., Brune, D. C., and Vermaas, W. F. (2012). "Lifetimes of photosystem I and II proteins in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *FEBS letters*, 586(2), 169-173.
- Yu, Y., You, L., Liu, D., Hollinshead, W., Tang, Y. J., and Zhang, F. (2013). "Development of *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory." *Marine drugs*, 11(8), 2894-2916.
- Zakar, T., Laczko-Dobos, H., Toth, T. N., and Gombos, Z. (2016). "Carotenoids assist in cyanobacterial photosystem II assembly and function." *Frontiers in plant science*, 7, 295.
- Zavřel, T., Sinetova, M. A., Búzová, D., Literáková, P., and Červený, J. (2015). "Characterization of a model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 autotrophic growth in a flat-panel photobioreactor." *Engineering in Life Sciences*, 15(1), 122-132.

Zhang, D., Dechatiwongse, P., and Hellgardt, K. (2015). "Modelling light transmission, cyanobacterial growth kinetics and fluid dynamics in a laboratory scale multiphase photo-bioreactor for biological hydrogen production." *Algal Research*, 8, 99-107.



## 8. Ringraziamenti

Il primo e più riconoscente ringraziamento va alla mia famiglia, perché senza il loro sostegno non sarei riuscito a portare a compimento questi lunghi anni di studio, ma forse anche e soprattutto per il supporto che non è mai mancato nei momenti difficili e di forte pressione.

Ringrazio anche chi mi ha seguito in questo lavoro di tesi, con un pensiero particolare a Nicolò che, con tanta pazienza da ambo le parti, mi ha infine traghettato in porto da un mare periglioso, e alla professoressa Busini, per il tempo che mi ha dedicato.

Un grazie va ad Andrea, mio collega, amico e compagno di avventure, con cui ho condiviso questi ultimi anni, ma in particolar modo questi ultimi mesi di lavoro sul progetto di tesi, perché ci siamo vicendevolmente forniti aiuto e supporto nei momenti di bisogno.

Grazie a Ginevra, per la pazienza e la capacità di ascoltare, nonché per l'abilità di sdrammatizzare e di mettere le cose sul ridere, che a me manca nei momenti più scuri e che, tuttavia, è fondamentale per mantenere la giusta serenità e tranquillità d'animo.

Grazie anche a Vincenzo, amico fraterno, per le chiacchierate sofferatamente ricercate, che sono state un punto di sfogo e di confronto fondamentale per entrambi.

Grazie al gruppetto dei miei colleghi di corso, a chi mi ha accompagnato fin quasi alla fine e a chi solo per una parte, da Baldo, con il quale abbiamo scoperto un giorno di essere fratelli, così, senza un perché, alla signorina "De Fontaine", per i momenti di idiozia, alla nostra pugliese sssarda Mary Claire, a Mariano, Michele, Simona, Licia e Alessandro.

Un grazie anche a tutti quelli che con la musica mi hanno permesso di staccare dall'università e dai suoi problemi, a partire dai compagni dell'Ensemble Einaudi, ai colleghi di conservatorio e al mio maestro, che seppur burbero, è sempre stato più che comprensivo con me per le mie difficoltà dettate dall'università e disposto a chiudere un occhio.

Un grazie al gruppo dei miei compagni di liceo, tutte persone speciali, con cui ho trascorso molti momenti memorabili, anche dopo aver finito il liceo, e con cui molti altri ne avrò, senza mai annoiarmi.

Un grazie ancora va a tutte le persone del collegio Einaudi con cui mi sono trattenuto e con cui ho scambiato due chiacchiere, dai mitici custodi Emilio e Rossella, ai compagni di collegio e, perché no, a Pino e alle sue chiavette.

Infine, ringrazio tutti quelli che non ho direttamente citato, ma che hanno e hanno avuto uno spazio nella mia vita, perché in questi cinque anni abbondanti hanno sicuramente contribuito ad aiutarmi in una qualche maniera.