

**ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITA' DI BOLOGNA**

Scuola di Scienze  
Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

**Ottimizzazione della produzione di polisaccaridi e lipidi  
nella diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum* in coltura**

Tesi di Laurea in Botanica Marina Applicata

**Relatore**

Prof.ssa Franca Guerrini

**Presentata da**

Alessia Garofalo

**Correlatori**

Dott.ssa Federica Abbondanzi

Dott.ssa Elena Tommasi

III Sessione

Anno Accademico 2015/2016



# Sommario

<b>1 INTRODUZIONE</b> .....	<b>5</b>
1.1 Le microalghe.....	5
1.1.1 Fattori che influenzano la crescita delle microalghe .....	6
1.1.2 Utilizzo, studi e problematiche delle microalghe.....	9
1.2 Sistemi di coltura delle microalghe .....	13
1.3 Le diatomee.....	17
1.3.1 <i>Phaeodactylum tricornutum</i> e sue applicazioni .....	18
<b>2 SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>21</b>
<b>3 MATERIALI E METODI</b> .....	<b>23</b>
3.1 Specie microalgale utilizzata .....	23
3.2 Preparazione del terreno di coltura.....	23
3.3 Disegno sperimentale .....	25
3.4 Andamento della crescita di una coltura “batch” .....	27
3.4.1 Valutazione della crescita attraverso l’analisi della torbidità.....	28
3.5 Analisi dei nutrienti .....	29
3.5.1 Determinazione dei nitrati .....	29
3.5.2 Determinazione del fosforo reattivo.....	32
3.5.3 Determinazione degli anioni mediante cromatografia ionica .....	34
3.6 Determinazione della composizione elementare di carbonio e azoto .....	35
3.7 Determinazione del fosforo intracellulare.....	36
3.8 Estrazione e determinazione dei lipidi.....	36
3.8.1 Determinazione degli acidi grassi totali (TFA) .....	37
3.9 Determinazione delle proteine .....	37
3.10 Determinazione dei polisaccaridi intracellulari .....	38
3.11 Analisi statistica .....	38
<b>4 RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	<b>39</b>

4.1 Crescita di <i>P. tricornutum</i> in colture “batch” con due diverse condizioni nutrizionali: effetto della somministrazione di CO <sub>2</sub> .....	39
4.1.1 Andamento della crescita .....	39
4.1.2 Consumo dei nutrienti .....	40
4.1.3 Composizione elementare.....	43
4.1.4 Composizione cellulare.....	46
4.2 Crescita di <i>Phaeodactylum tricornutum</i> in colture batch in un <i>medium</i> costituito da un refluo industriale (digestato).....	51
4.2.1 Andamento della crescita .....	51
4.2.2 Consumo dei nutrienti .....	53
4.2.3 Composizione elementare.....	55
4.2.4 Composizione cellulare.....	57
<b>5 CONCLUSIONI.....</b>	<b>61</b>
<b>6 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>65</b>

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Le microalghe

Le microalghe appartengono ad uno dei più antichi gruppi di esseri viventi, le ritroviamo in tutti gli ecosistemi terrestri di acqua dolce, salata e salmastra, sono organismi in grado di adattarsi alle differenti condizioni ambientali, si stima che esistano più di 50000 specie di microalghe ma solo un numero più limitato attorno alle 35000 specie è stato studiato ed analizzato. Per la loro sopravvivenza, le microalghe necessitano di luce solare, nutrienti e hanno la capacità di fissare la CO<sub>2</sub> con un'efficienza 10 volte superiore a quella delle piante terrestri, per sintetizzare zuccheri per il proprio metabolismo energetico e biosintetico, producendo ossigeno che viene utilizzato in parte con la respirazione e in parte viene rilasciato in atmosfera, contribuendo così alla produzione di circa il 50 % di O<sub>2</sub> atmosferico. In ambienti acquatici le microalghe sono i produttori primari e costituiscono un importante anello della catena trofica degli ecosistemi marini, garantendo il flusso di energia e di materia necessari per il mantenimento degli organismi eterotrofi. Gli organismi fitoplanctonici presentano una quantità e una differente tipologia di pigmenti fotosintetici: i) le clorofille sono i pigmenti più diffusi, si possono distinguere in tre tipologie (a,b,c), tra questi il più importante è la clorofilla a in quanto presente in tutti i vegetali. Le clorofille appartengono alla famiglia delle porfirine, possiedono un anello tetrapirrolico ciclico con al centro un atomo di Mg<sup>2+</sup>. La clorofilla a assorbe la luce blu a 430 nm e rossa a 663 nm; ii) i carotenoidi sono composti isoprenoidi con 40 atomi di carbonio, svolgono due ruoli importanti: assicurano l'assorbimento della luce in ambiti spettrali non coperti dalle clorofille, sono importanti nella protezione degli apparati fotosintetici dal danno ossidativo. Si dividono in caroteni (privi di O<sub>2</sub>, es β-carotene) e xantofille (con O<sub>2</sub>, es luteina, fucoxantina). I carotenoidi sono di colore arancione, assorbono nel blu-verde tra 450-480 nm; iii) le ficobiliproteine si distinguono sulla base dell'assorbimento in ficoeritrina (rossa), ficocianina (blu) e alloficocianina (blu-porpora). Assorbono tra il verde e il rosso tra 450-670 nm.

### 1.1.1 Fattori che influenzano la crescita delle microalghe

La crescita delle alghe è influenzata da diversi fattori che possono essere raggruppati in 3 categorie (Amicarelli et al., 2012)

- abiotici (luce, temperatura, nutrienti, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, pH e salinità)
- biotici (presenza di patogeni come batteri, virus, funghi, competizione con altre alghe)
- operativi (profondità, frequenza della raccolta, aggiunta di bicarbonato)

- **Luce**

L'intensità e la qualità delle radiazioni luminose influenzano la crescita e la riproduzione degli organismi algali, i quali possono fotoacclimatarsi (fenomeno per cui le alghe possono modificare le loro risposte fotosintetiche in base all'intensità luminosa ambientale) a varie intensità di energia luminosa ed avere un'efficienza fotosintetica più elevata a bassi o alti regimi di luce. La luce è un fattore importante per la crescita della biomassa algale, se presente in eccesso può determinare un danno al fotosistema, in particolare al PSII.

Alla diminuzione dell'intensità della luce la cellula risponde incrementando la clorofilla *a* e gli altri pigmenti come la clorofilla *b* e *c* e le ficobiliproteine. Viceversa, aumentando l'intensità luminosa la clorofilla *a* e gli altri pigmenti che raccolgono la luce diminuiscono mentre aumenta la concentrazione dei carotenoidi secondari come il  $\beta$ -carotene, la luteina e l'astaxantina, che sono coinvolti nei meccanismi di fotoprotezione (Hu, 2013). Inoltre l'elevata intensità luminosa tende ad aumentare la produzione di polisaccaridi nella cellula algale. Le ricerche di Hu (2013) su diversi ceppi hanno evidenziato che il contenuto di lipidi totali incrementa all'aumentare dell'intensità luminosa; tuttavia il contenuto degli acidi grassi polinsaturi (PUFAs) incluso l'acido eicosapentanoico (EPA) è inversamente proporzionale all'intensità luminosa. In *Phaeodactylum tricornutum* è stato osservato un aumento dei livelli di PUFAs ad elevata intensità luminosa (Molina Grima et al., 1999). Questo andamento dipende dal fatto che gli acidi grassi saturi e monoinsaturi sono presenti principalmente sotto forma di triacilglicerolo che si accumula in corpi lipidici nel citoplasma della cellula, mentre i PUFAs sono i maggiori costituenti delle membrane tilacoidali, che tendono ad aumentare al diminuire dell'intensità luminosa per incrementare la fotosintesi (Hu, 2013).

- **Temperatura**

L'effetto della temperatura sulla composizione biochimica algale si può realizzare attraverso due vie: influenzando il tasso delle reazioni chimiche e biochimiche temperatura-dipendenti e influenzando la ripartizione del carbonio fissato fotosinteticamente nelle tre macromolecole principali ossia lipidi, proteine e carboidrati (Hu, 2013). Le diverse specie algali possiedono valori ottimali di temperatura che ne favoriscono la crescita, si osserva che alla diminuzione della temperatura, al di sotto di questo valore, generalmente diminuiscono i lipidi totali ma aumenta il loro grado di insaturazione a livello di membrana, al contrario aumentando la temperatura diminuisce la produzione dei PUFAs. Un altro fenomeno collegato ai cambiamenti della temperatura, che è stato osservato di frequente nelle microalghe, è la variazione dei pigmenti fotosintetici, in particolare, è stato osservato un incremento della clorofilla *a* all'aumentare della temperatura sopra il livello ottimale (Thompson et al., 1992). Un fenomeno simile è stato osservato anche per quanto riguarda il contenuto dei carotenoidi (Liu & Lee, 2000).

- **Nutrienti**

I nutrienti necessari in maggiore quantità per la crescita delle alghe oltre ad ossigeno e carbonio sono l'azoto, il fosforo e il ferro.

L'azoto (N) è l'elemento essenziale per la struttura e la funzione delle proteine nella cellula algale. L'azoto può essere ricavato da fonti diversi come il nitrato, l'ammoniaca e l'urea usati per la crescita e la riproduzione algale. Il contenuto di azoto cellulare varia da specie a specie, il *range* può andare dall'1% ad un massimo del 10% sul peso secco dell'alga (Grobbelaar, 2013). Le microalghe in generale hanno una bassa capacità di produrre sostanze azotate di riserva in condizioni di azoto sufficienza, ad eccezione delle cianofite che possono accumulare ficocianina e altre ficobiliproteine come riserva di azoto. In condizioni di azoto limitazione diversi gruppi tassonomici mostrano un aumento sia della biosintesi che dell'accumulo di lipidi, in particolare si osserva un accumulo della componente neutra dei lipidi sotto forma di triacilglicerolo; altre specie algali al contrario, in condizioni di azoto limitazione mostrano un accumulo di carboidrati invece dei lipidi. Un'altra caratteristica osservata in microalghe cresciute in azoto limitazione, è quella di accumulare carotenoidi secondari spesso questo è accompagnato da una diminuzione del contenuto cellulare della clorofilla *a* (Hu, 2013; Peng et al., 2014).

Il fosforo (P) è essenziale per la crescita e i processi cellulari come il trasferimento di energia e la biosintesi di acidi nucleici (Grobbelaar, 2013; Hu, 2013). Il fosforo viene incorporato nella materia organica attraverso vari processi di fosforilazione. Il fosforo inorganico può essere accumulato nella cellula sotto forma di granuli di polifosfato, questi ultimi si possono vedere quando la concentrazione di fosforo è ottimale per la crescita della cellula mentre scompaiono quando il fosforo diminuisce (Hu, 2013). Alcuni processi che si instaurano nelle cellule algali in seguito alla carenza del fosforo, sono simili a quelli osservati in azoto-limitazione: la clorofilla *a* tende a diminuire mentre in alcune alghe si osserva un accumulo di carotenoidi come il  $\beta$ -carotene in *Dunaliella salina* e l'astaxantina in *Haematococcus pluvialis*.

Il ferro (Fe), altro elemento essenziale nella composizione biochimica cellulare, è importante per la fotosintesi, la respirazione, la fissazione di azoto e la sintesi del DNA (Hu,2013).

- **Salinità**

Un aumento della salinità può determinare un lieve incremento dei lipidi prodotti dalle alghe. Variazioni della salinità possono influenzare la carotenogenesi delle alghe. (Hu,2013).

- **pH**

La crescita ottimale delle alghe avviene a valori di pH compreso tra 7 e 9, tale valore può essere influenzato dalla quantità di CO<sub>2</sub> e dai nutrienti. Nelle colture ad alta intensità il carbonio inorganico rappresenta la principale fonte per la fotosintesi, il pH potrebbe influenzare la disponibilità di carbonio per la fotosintesi delle alghe nelle colture intensive (Azov,1982).

In acqua il carbonio può esistere nelle forme di CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, che si trovano in equilibrio tramite l'equazione di seguito riportata



La riduzione del pH si traduce in un aumento di CO<sub>2</sub> in acqua. Il pH, tramite la distribuzione delle diverse forme di carbonio inorganico, ha un effetto indiretto sulla crescita e sulla fotosintesi delle alghe (Yang & Gao, 2003).

### 1.1.2 Utilizzo, studi e problematiche delle microalghe

Fin dai tempi antichi l'uomo ha usato le microalghe come fonte nutrizionale. I primi a fare uso di microalghe furono i cinesi circa 2000 anni fa, i quali durante una carestia per sopravvivere usarono *Nostoc* (appartenente ai cianobatteri azotofissatori) (Mostafa, 2012). Grazie alle loro caratteristiche di organismi semplici e grazie alla diversificata biodiversità, le microalghe possono essere impiegate nella produzione di biocombustibili, nella depurazione di acque reflue e nei diversi settori della farmaceutica, cosmetica e agroalimentare.

Le microalghe presentano delle caratteristiche che le rendono avvantaggiate nella coltivazione su larga scala (Barbato et al., 2012; Giuliano et al., 2013; Yanqun et al., 2008)

- Elevata velocità di crescita
- Capacità di crescere in acque ricche di nutrienti e contribuire ai processi di depurazione di acque reflue
- Capacità di assorbire la CO<sub>2</sub> insufflata dal mezzo di coltura per trasformarla in materia organica
- Capacità di adattarsi ad ambienti estremi (climi caldi e acqua salata)
- Possono essere coltivate in aree senza sottrarre suoli alle colture agricole
- Possono produrre biomassa omogenea
- Non richiedono uso di pesticidi

Ad oggi le colture microalgali presentano dei punti critici (Barbato et al., 2012):

- Le microalghe devono essere separate dalla fase liquida,
- Attualmente si usano solo colture monospecifiche dove vanno evitate contaminazioni da parte di altri organismi
- La resa energetica non raggiunge livelli tali da superare le spese impiegate per la loro coltivazione.

L'interesse e i primi studi effettuati sulla coltivazione delle microalghe in laboratorio risalgono al secolo scorso. Da questi studi partirono le prime ricerche in campo applicativo, partendo con la coltivazione su larga scala di *Chlorella vulgaris*, microalga appartenente al phylum Chlorophyta, e di *Scenedesmus*, in Giappone, Germania e Stati Uniti. In Italia, i primi studi sulle colture algali massive sono iniziate nel 1956 presso l'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università degli Studi

di Firenze (Tredici, 2006). La coltivazione di alghe in ambiente controllato è diventata un'attività di grande importanza economica per la produzione di biomassa che viene impiegata per una molteplicità di scopi, le microalghe rappresentano una fonte preziosa di composti bioattivi come polisaccaridi, amminoacidi, proteine, acidi grassi, carotenoidi, antiossidanti, enzimi, polimeri, peptidi (Barbato et al., 2012; Becker, 2013; Yanqun et al., 2008), alcuni di questi composti inoltre sono degli agenti citotossici che possono essere usati in campo medico soprattutto nella chemioterapia (Mostafa, 2012) contro alcuni tumori. La composizione percentuale di proteine, carboidrati, lipidi e minerali può variare da una specie di microalga ad un'altra. Una microalga in condizioni standard può contenere dal 10-40% i peso secco di proteine, 10-30% di lipidi, 5-30% di carboidrati e 10-40% di altri componenti (ceneri) (Volkman & Brown, 2013). Nelle microalghe i carboidrati sono distribuiti tra la frazione polimerica e la frazione solubile degli zuccheri semplici. La composizione cellulare degli zuccheri nelle microalghe è variabile: il glucosio è la componente predominante dal 20 al 90% sugli zuccheri totali, questa percentuale tende ad aumentare, tranne nelle diatomee, con l'invecchiamento della coltura. Le diatomee, al contrario secernono oltre il 50% dei polisaccaridi prodotti nel mezzo di coltura durante la fase stazionaria di crescita. (Volkman & Brown, 2013). I lipidi rappresentano la fonte primaria di energia per le microalghe, ricoprono la funzione di isolante negli organi interni delle membrane, forniscono ormoni e altre componenti bioattive nella regolazione biochimica cellulare, inoltre svolgono un ruolo fondamentale in diversi organismi inclusi i cianobatteri nella tollerabilità a stress fisiologici. Le principali classi di lipidi che troviamo nelle microalghe sono i trigliceridi, i fosfolipidi e i glicolipidi (Volkman & Brown, 2013). Molte microalghe mostrano inoltre elevati livelli di acidi grassi polinsaturi (PUFAs)  $\omega$ -3 che sono costituiti da una catena acilica e da un gruppo carbossilico in posizione terminale (Goossens, 2012), i più importanti sono l'acido eicosapentanoico (EPA) estratto dalle diatomee e l'acido docosaesanoico (DHA) estratto dalle dinoflagellate marine. I PUFAs sono soggetti all'ossidazione, i prodotti che ne derivano possono avere effetti tossici, la stabilità degli oli di origine algale dipende dalla composizione degli acidi grassi, dalla stabilità fisica e colloidale dei lipidi, dal contenuto di antiossidanti, dalla presenza e dall'attività dei metalli di transizione (Volkman & Brown, 2013). La maggior parte degli  $\omega$ -3 che si trovano in commercio derivano da olio di pesce, quelli estratti da microalghe vengono utilizzati nella formulazione del latte per i bambini. L'EPA e il DHA sono importanti per la

salute umana in quanto contribuiscono al miglioramento della salute cardiovascolare, hanno effetti benefici su diverse forme di cancro, su patologie infiammatorie e autoimmuni, nello sviluppo della retina e sembrano giocare un ruolo importante nello sviluppo fetale e nella funzione del sistema nervoso centrale (Goossens, 2012). Microalghe come *Dunaliella salina* ed *Haematococcus pluvialis* sintetizzano carotenoidi, rispettivamente  $\beta$ -carotene ed Astaxantina. Il  $\beta$ -carotene viene impiegato come colorante alimentare, per la prevenzione dell'avitaminosi A e della degenerazione maculare legata all'età, (una malattia degenerativa della retina), e l'Astaxantina, usata come additivo alimentare nell'industria ittica, ma con potenziali applicazioni anche come antiossidante nell'alimentazione umana (Giuliano et al.,2013) grazie ai suoi effetti antiossidativi, antiinfiammatori, neuroprotettivi, favorisce il flusso sanguigno cerebrale e migliora le funzioni cognitive.

Le microalghe contengono anche vitamine tra cui quelle del gruppo A, del gruppo B inclusa la B12, C, D, E, K. (Barbato et al., 2012).

Attualmente gran parte della biomassa algale prodotta viene commercializzata per l'acquacoltura o come integratore alimentare in forma di tavolette e capsule.

In acquacoltura le microalghe vengono utilizzate sia come alimento dello zooplancton destinato a nutrire le larve dei pesci sia nelle avannotterie per la crescita di molluschi bivalvi (ostriche, capesante, vongole e cozze) (Volkman & Brown, 2013; Barbato et al.,2012); in agricoltura come bio-fertilizzanti; in campo cosmetico per i loro effetti depurativi e drenante per il corpo; in campo medico le microalghe vengono considerate come fonte di sostanze dotate di proprietà antibatteriche, antivirali e antitumorali, possono essere impiegate per la produzione di farmaci nella cura di patologie quali il colesterolo, l'osteoporosi, lo stress, il cancro e l'invecchiamento cellulare.

La ricerca è impegnata a sviluppare dei sistemi per poter utilizzare in futuro le microalghe per la produzione di biodiesel, questo permetterebbe di ridurre le emissioni di CO<sub>2</sub> rispetto all'attuale uso di combustibili fossili. La produzione di biodiesel da microalghe può essere più sostenibile dal punto di vista ambientale e conveniente dal punto di vista economico se è combinata ad altri processi come il recupero dei gas di scarico e il trattamento delle acque reflue (Amicarelli et al., 2012). Le microalghe sono caratterizzate da un elevato contenuto in olio e da alti

rendimenti in biodiesel, non entrano in competizione con la produzione alimentare né con i suoli agricoli né con le fonti di acqua dolce (Amicarelli et al., 2012; Yanqun et al., 2008). Dopo lo sviluppo di biocarburanti di I° e II° generazione, crescente attenzione è stata rivolta verso tecnologie di terza generazione. A questo scopo, le alghe a partire dal 1970 sono state esaminate come possibile alternativa ai combustibili fossili (Yanqun et al., 2008). Il biodiesel si ottiene attraverso un processo chimico di trans-esterificazione (un trigliceride reagisce con metanolo e/o etanolo). Alcune specie di microalghe possono accumulare quantità elevate di lipidi dal 30-50% sul peso secco, e potrebbero essere dei buoni candidati per una coltivazione massiva per la produzione di biodiesel (Yanqun et al., 2008).

Al momento però la produzione di biomassa algale destinata a questo impiego non è diffusa a causa dei costi troppi elevati di tutto il processo produttivo rispetto a quelli dei combustibili tradizionali. È necessario arrivare ad una ottimizzazione dei sistemi di coltivazione, di raccolta e di trasformazione della biomassa algale riducendo in particolare gli eccessivi costi delle sostanze chimiche impiegate come nutrienti.

Il costo eccessivo dei nutrienti impiegati nella formulazione dei terreni di coltura potrebbe essere ridotto utilizzando reflui industriali ricchi di sostanze azotate; fra questi alcuni tipi di digestati che per le loro peculiari caratteristiche possono essere utilizzati ai fini agronomici come fertilizzanti.

Il 25 febbraio 2016 è stato dunque firmato il Decreto del Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali, che aggiorna le regole ed i criteri per l'utilizzazione agronomica degli effluenti di allevamento ed acque reflue (definiti dal decreto 7 aprile 2006, che viene ora abrogato) e del digestato prodotto dagli impianti di digestione anaerobica.

Si definisce digestato un prodotto che deriva dalla digestione anaerobica, in impianti aziendali, di determinati materiali ed utilizzato ai fini agronomici, secondo le nuove disposizioni legislative è da considerarsi un sottoprodotto e non rifiuto (fonte ARPAT, 2016) se rispetta particolari condizioni:

- Prodotto in impianti - aziendali e interaziendali - di digestione anaerobica autorizzati ed alimentati con effluenti di allevamento ed una serie di materie tra cui scarti vegetali ed alcuni scarti dell'agroindustria (art. 22 del titolo IV del DM 5046 del 25/02/ 2016);

- Vi è certezza di impiego agronomico;
- Lo si può usare direttamente, senza ulteriori trattamenti diversi dalle normali pratiche industriali quali la disidratazione, sedimentazione, chiarificazione, centrifugazione ed essiccazione, filtrazione, separazione solido liquido, stripping, nitrificazione denitrificazione, fitodepurazione;
- Soddisfa le caratteristiche di qualità indicate dalla legge nonché le norme igienico-sanitarie e di tutela ambientale comunque applicabili

È vietato poi l'uso agronomico del digestato prodotto da colture che provengano da siti inquinati o da materiale contaminato. Tale materiale, considerato un rifiuto, dovrà essere avviato, preferibilmente, ad incenerimento.

Il digestato viene distinto in:

- Agrozootecnico, prodotto cioè con paglia, sfalci, potature, materiale agricolo derivante da colture agrarie, effluenti di allevamento, materiale agricolo e forestale non destinato al consumo alimentare;
- Agroindustriale, prodotto cioè da acque reflue, residui di attività agroalimentare, acque di vegetazione dei frantoi e sanse umide, sottoprodotti di origine animale.

La norma affronta infine l'uso agronomico nelle zone vulnerabili da nitrati disciplinando divieti, modalità di stoccaggio e di uso agronomico nonché i controlli e monitoraggi necessari per la verifica della concentrazione dei nitrati nelle acque e valutazione dello stato trofico.

Il Decreto disciplina quindi il digestato, insieme ad altre tipologie di effluenti prodotti dalle attività agricole, per il suo utilizzo diretto in campo agricolo.

## **1.2 Sistemi di coltura delle microalghe**

La coltivazione su larga scala delle microalghe è iniziata negli anni '80, i primi studi si concentrarono sul cianobatterio *Spirulina*. Attualmente i maggiori impianti produttivi si trovano nella fascia tropicale, nella California meridionale, in Cina, Taiwan, India, Cuba e Hawaii. (Barbato, 2009).

La coltivazione di biomassa algale per la produzione commerciale può essere di tipo "INDOOR" ossia effettuata all'interno di un edificio o di tipo "OUTDOOR" cioè all'esterno. La scelta del sistema di coltura dipende da una serie di fattori quali il

volume della coltura, la manutenzione e la pulizia e il prodotto finale che si vuole ottenere.

Il sistema di coltura più diffuso si basa sui circuiti *raceways ponds* (figura 1) a bassa profondità dove la circolazione di acqua viene assicurata da agitatori a pale ad energia elettrica (Barbato, 2009). Il primo utilizzo dei *raceways* risale al 1950 (Kulinsky, 2009). Il sistema è dotato di un'elica in continuo movimento per evitare che le alghe si accumulino sul fondo, assicurando così una sufficiente quantità di luce per la fotosintesi. I sistemi di coltivazione all'aperto sono rappresentati anche da laghi artificiali, stagni circolari e sistemi inclinati (Zittelli et al., 2013). In questa tipologia di sistema i parametri che non possono essere controllati sono la temperatura e la luminosità che sono dipendenti dalle stagioni, dagli eventi climatici e dalla localizzazione geografica. La profondità delle colture è inversamente correlata alla concentrazione cellulare e alla quantità di luce disponibile. Profondità di 15-40 cm rappresentano un compromesso fra esigenze contrastanti quali il dispendio di energia per l'agitazione e la raccolta e l'escursione termica diurna (Barbato, 2009). I sistemi aperti sono meno costosi da costruire, hanno una maggiore durata e una maggiore capacità riproduttiva rispetto ai sistemi chiusi (Amicarelli et al., 2012). In molte regioni non tropicali gli impianti di colture algali all'aperto hanno lo svantaggio di trovarsi in condizioni climatiche sfavorevoli da non poter permettere cicli di produzione (Barbato et al., 2012; Amicarelli et al., 2012). I maggiori svantaggi delle colture algali in bacini aperti sono rappresentati da evaporazione dell'acqua soprattutto in caso di elevate temperature, perdite di CO<sub>2</sub>, rischi di inquinamento da altre specie algali indesiderate (che in presenza di condizioni favorevoli possono sostituire la coltura iniziale) o da animali quali insetti o fitoplanctofagi acquatici (rotiferi, copepodi etc.) e protozoi il cui sviluppo risulta quasi sempre incontenibile (Barbato, 2009). I sistemi aperti permettono la crescita solo di specie che possiedono un vantaggio selettivo come ad esempio *Dunaliella salina* che cresce in ambiente ad elevata salinità, *Chlorella* che cresce rapidamente e risulta poco appetibile per gli organismi eterotrofi e *Spirulina* che cresce a valori di pH compresi tra 9-10.



Figura 1. *Raceways ponds* in Kentucky (foto sopra); hawaiiiani (foto in basso) (fonte: web)

I sistemi chiusi, comunemente definiti fotobioreattori (figura 2), a differenza dei sistemi aperti permettono un maggiore controllo dei parametri chimico-fisici e biologici della coltura (Barbato, 2009). I fotobioreattori sono usati per la coltivazione di una sola specie algale per lunghi periodi (Kulinsky, 2009).



Figura 2. Tipologie di fotobioreattori verticali e tubulari (fonte: web)

In termine di design possiamo classificare i fotobioreattori come: piatti o tubulari, orizzontali, verticali, inclinati o a spirale (Amicarelli et al., 2012; Zittelli et al., 2013). Sono costruiti con materiali non tossici, con ottima trasparenza ottica, buona resistenza meccanica e stabilità chimica. Il principale criterio con cui viene progettato un fotobioreattore è quello di permettere alla cellula fotosintetica di raggiungere la migliore efficienza nella conversione dell'energia luminosa sia che si tratti di luce naturale che artificiale (Barbato et al., 2012). I fotobioreattori a differenza dei sistemi aperti mostrano una maggiore gestione e una maggiore complessità, nonché dei costi elevati. I fotobioreattori più usati sono quelli tubulari.

Un fotobioreattore tubulare (figura 3) è costituito da una serie di tubi dritti e trasparenti, di plastica o di vetro con diametro di circa 0,1 m e lunghezza inferiore ad 80 m, nei quali viene catturata la luce (Amicarelli et al., 2012). Per garantire una maggiore irradiazione, i tubi sono disposti parallelamente uno accanto all'altro.



Figura 3. Fotobioreattore tubulare (fonte: web)

Un fotobioreattore verticale è un cilindro trasparente di 2/2,5 m di altezza e 30-50 di diametro, è usato maggiormente in laboratorio (Zittelli et al.,2013).

I fotobioreattori presentano maggiori vantaggi perché consentono un maggiore controllo di pH, temperatura, ossigeno e CO<sub>2</sub>, minore perdita di anidride carbonica, una maggiore densità delle microalghe e produttività volumetrica, una maggiore riduzione delle contaminazioni (Amicarelli et al.,2012). Gli svantaggi sono imputati ad incremento della temperatura, questo richiede dei sistemi di raffreddamento, rischio di accumulo di ossigeno prodotto dalla fotosintesi che richiede sistemi di eliminazione del gas, gli elevati costi di costruzione e funzionamento dell'impianto. (Amicarelli et al.,2012; Barbato,2009). La scelta di un sistema di coltivazione rispetto ad un altro dipende dalla tipologia dell'alga selezionata e dall'uso che se ne vuole fare.

### 1.3 Le diatomee

Le diatomee sono alghe unicellulari non flagellate, singole o coloniali, appartengono alla classe delle *Bacillariophyceae* (divisione *Heterokontophyta*). Le ritroviamo in quasi tutti gli ambienti acquatici marini, di acqua dolce o salmastra, possono essere planctoniche, bentoniche o epifite. Le cellule possiedono una parete rigida il "frustolo" di natura silicea formata da due parti che si sovrappongono l'epiteca la parte superiore e l'ipoteca quella inferiore, ciascuna parte è formata da una parte appiattita detta valva e da una parte laterale il cingolo. In base alla simmetria del frustolo le diatomee vengono suddivise in Centriche (simmetria raggiata) e in Pennate

(simmetria bilaterale), queste ultime possono avere il rafe, un solco longitudinale che decorre sulla superficie valvare. Molte diatomee producono mucillagini, queste sostanze permettono alle diatomee di aderire al substrato, tenere unite le cellule, favorire il galleggiamento, scoraggiare eventuali predatori. La riproduzione è vegetativa con una peculiarità: quando la cellula si divide, ciascuna cellula figlia riceve una delle due parti della teca che a questo punto diventerà l'epiteca ovvero esse dovranno riformare l'ipoteca. La cellula figlia che riceve l'epiteca iniziale rimane delle stesse dimensioni della madre, le altre si rimpiccioliscono progressivamente fino a quando non raggiungono una dimensione critica incompatibile con la vita solo a questo punto si attiva la riproduzione sessuale che riporta la popolazione alle dimensioni ottimali. Alla morte della cellula i frustuli si dissolvono, solo in alcuni casi rimangono intatti e si accumulano sul fondo dando origine a depositi detti diatomiti o farina fossile.

### **1.3.1 *Phaeodactylum tricornutum* e sue applicazioni**

*Phaeodactylum tricornutum* (figura 4) è una diatomea pennata, descritta per la prima volta da Bohlin nel 1897.

#### **Classificazione**

Regno: *Eukaryota*

Phylum: *Bacillariophyta*

Classe: *Bacillariophyta incertae sedis*

Ordine: *Bacillariophyta incertae sedis*

Famiglia: *Phaeodactylaceae*

Genere: *Phaeodactylum*

Specie: *tricornutum*

*P. tricornutum* può presentarsi in tre diversi morfotipi (fusiforme, triradiata e ovale) la forma della cellula può variare in base a stimoli ambientali come luce, raggi UV, disponibilità dei nutrienti, ventilazione, temperatura (Kim et al., 2012; Bartual et al., 2008). *P. tricornutum* è una diatomea piuttosto atipica, le singole cellule presentano solo in parte strutture silicee, mentre solo le cellule ovali sintetizzano le due valve silicee. (Bartual et al., 2008; De Martino et al., 2007). È l'unica diatomea, insieme a

*Thalassiosira pseudonana*, di cui si conosce il genoma (De Martino et al., 2007; Daboussi et al., 2014). È una diatomea che contiene circa il 36,4% di proteine, il 26,1% di carboidrati, il 18% di lipidi (Kim et al., 2012; Atalah et al., 2007).

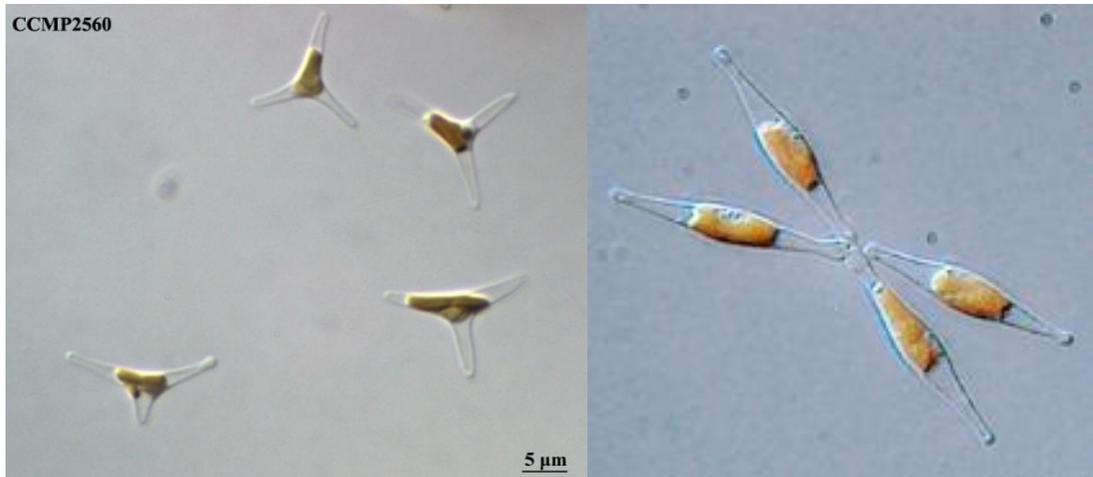


Figura 4. Morfotipi di *P. tricornutum* (fonte: web)

L'interesse commerciale nei confronti di *P. tricornutum* è legato alla sua capacità di produrre acidi grassi polinsaturi (PUFAs) come l'acido eicosapentanoico (EPA) e l'acido docosaesanoico (DHA) (Atalah et al., 2007; Jiang & Gao, 2004; Benavides et al., 2013) che sono componenti importanti per la nutrizione umana, in particolare per la crescita e lo sviluppo dei neonati, in generale queste molecole hanno un ruolo molto importante come agenti anti-infiammatori per il mantenimento della salute cardiovascolare e come anti-tumorali. Dall'acido docosaesanoico (DHA) derivano dei lipidi perossidi, tossici per le cellule, che mostrano effetti antitumorali (Amaro et al., 2013). Amaro et al (2013) nel loro studio evidenziano che il DHA che si accumula nella cellula è in grado di aumentare i livelli intracellulari del p53 (fattore di trascrizione, con funzione di soppressore tumorale), del citocromo C e del regolatore dell'apoptosi (BAX), esercitando così un effetto anti-tumorale in grado di diminuire la proliferazione e/o l'inibizione delle cellule tumorali. *P. tricornutum* è una diatomea unicellulare che accumula EPA (fino al 35%) sul totale degli acidi grassi prodotti (Hamilton et al., 2014) percentuale considerata ottimale per la produzione industriale di EPA. La produzione ottimale di PUFAs si può ottenere in un range di temperatura compreso tra 21,5°C e 23°C (Bojko et al., 2013). L'effetto della temperatura per la produzione di acidi grassi è stato oggetto di studio nelle ricerche di Jiang e Gao (2004), nello studio si evidenzia che passare da una temperatura alta a una inferiore

può incrementare la produzione di EPA, il che risulterebbe più vantaggioso per la diatomea. Chauton et al.,(2013) dimostrano nella loro ricerca, che lo stress derivante dalla carenza di azoto e/o fosforo possa limitare la produzione di lipidi e/o carboidrati. Precedenti studi evidenziano che un aumento della concentrazione di CO<sub>2</sub> porta ad un incremento nella produzione di lipidi in *P. tricornutum*, la diatomea riesce a tollerare elevate concentrazioni di CO<sub>2</sub>. In risposta ad un aumento di CO<sub>2</sub> l'alga mostra una rapida cresce. (Wu et al., 2015). La CO<sub>2</sub>, oltre ad avere effetti fisiologici sulle cellule, determina un cambiamento nel pH (Yongmanitchai & Ward,1991) *P. tricornutum* produce anche carotenoidi, in particolare la fucoxantina, che presenta importanti proprietà (anticancro, anti-ipertensione, anti-infiammatorio, anti-obesità) (Kim et al., 2012).

*P. tricornutum* sintetizza anche polisaccaridi, distinti in tre gruppi (Alekseeva et al., 2005):

1. **Polisaccaridi di riserva** sono il risultato finale della fotosintesi, rappresentati dai  $\beta$ - glucani (es la crisolaminaria) sono localizzati nei vacuoli. I glucani si accumulano in condizioni di carenza di nutrienti, quando la sintesi delle proteine diminuisce.
2. **Polisaccaridi strutturali**, gli eteroglucani che sono componenti della cellula che insieme alle proteine avvolgono la parete silicea delle diatomee.
3. **Polisaccaridi extracellulari** sono sintetizzati da cellule specializzate. Formano rivestimenti viscosi con funzione di aggregazione cellulare, scambio ionico, protezione da predatori e locomozione per le specie bentoniche.

Come accennato precedentemente, molti studi attuali sulle microalghe sono volti alla possibilità di ottenere biodiesel dalla loro coltivazione su larga scala. Le microalghe accumulano composti energetici come il triacilglicerolo e altri lipidi che possono essere considerati precursori per i biocarburanti (Mus et al., 2013). Estrarre dalle alghe acidi grassi a catena media o corta significa ottenere biodiesel resistente all'ossidazione. In questo contesto ricoprono un ruolo importante gli studi di ingegneria genetica condotti inizialmente su *Chlamydomonas reinhardtii* (alga unicellulare) e successivamente su *P. tricornutum*, volti a incrementare la sintesi e l'accumulo a livello cellulare di acidi grassi a catena corta. La coltivazione, pertanto di tali alghe così modificate potrebbe contribuire a ridurre i costi di produzione dei biocarburanti (Radakovits et al., 2011; Benavides et al., 2013).

## 2 SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi anni è stata data sempre maggiore attenzione agli studi sulla coltivazione delle microalghe su larga scala, per il loro potenziale utilizzo in diversi settori industriali fra i quali quelli della produzione di biocarburanti, dell'acquacoltura, della nutraceutica e della farmaceutica.

*P. tricornutum* è una diatomea, che per le sue caratteristiche, potremmo definire versatile, in quanto è ricca di numerosi composti bioattivi quali polisaccaridi, pigmenti, lipidi e acidi grassi polinsaturi fra i quali il principale è l' EPA, che possono essere utilizzati nel campo della nutraceutica e farmaceutica; la componente lipidica di quest'alga inoltre, ne fa un buon candidato a livello industriale per un suo utilizzo nella produzione di biocombustibili, processo questo che consentirebbe una netta riduzione dell'emissione di CO<sub>2</sub> in atmosfera. Dopo l'estrazione di bio-olio inoltre, la biomassa algale residua, potrebbe essere impiegata per l'estrazione di biomolecole di interesse commerciale come polisaccaridi o per la produzione di biogas.

Attualmente, poiché il processo di produzione di biodiesel dalle microalghe non è ancora competitivo nei confronti dell'utilizzo dei carburanti tradizionali, sono necessari miglioramenti tecnologici nelle varie fasi della coltivazione per la riduzione dei costi di produzione e di raccolta della biomassa. Una maggiore sostenibilità di questo processo, sia dal punto di vista ambientale che economico, potrebbe essere ottenuta combinando la coltivazione delle microalghe con altri processi come il recupero di CO<sub>2</sub> di scarico da impianti di lavorazione industriale o dai biodigestori e il recupero dei nutrienti inorganici necessari per la crescita tramite il trattamento delle acque reflue. In particolare l'utilizzo di composti chimici come nutrienti nella preparazione dei terreni di coltura ha costi molto elevati, legati anche alla difficoltà di smaltimento degli stessi che data l'alta concentrazione di sali potrebbero recare danni ai terreni agricoli. Pertanto nella coltivazione, potrebbero essere utilizzati reflui industriali e digestati ricchi di sostanze utili per la crescita algale, facili da reperire e a costi inferiori

In questo contesto si inserisce lo scopo della mia tesi, che consiste nell'ottimizzare la crescita di *P. tricornutum* e verificare quali condizioni nutrizionali determinano la maggiore produzione di polisaccaridi e/o lipidi, ponendo l'attenzione sull'effetto della

somministrazione di CO<sub>2</sub> recuperata dai processi di biodigestione e sull'utilizzo di un refluo industriale come terreno di coltura.

La prima fase del lavoro di questa tesi è inserita all'interno di un progetto che prevede l'utilizzo della CO<sub>2</sub> recuperata dai processi di biodigestione, nella coltivazione delle microalghe. Il lavoro da me svolto in questo contesto, ha previsto l'utilizzo di CO<sub>2</sub> commerciale nella coltivazione di *P. tricornutum* per porre le basi per un confronto futuro dei vari parametri analizzati nella successiva coltivazione dell'alga utilizzando la CO<sub>2</sub> di recupero, in particolare è stata valutata la crescita e la composizione cellulare di *P. tricornutum*, coltivata in un *medium* standard con due diversi rapporti molari di azoto e fosforo (N/P), verificando l'effetto della somministrazione di CO<sub>2</sub> a basse concentrazioni.

Nella seconda parte della tesi l'alga in questione, è stata fatta crescere in un terreno di coltura costituito da un refluo industriale con una composizione di nutrienti paragonabile a quella di un *medium* normalmente impiegato nella coltivazione delle alghe. Lo scopo di questa prova oltre quello di verificare l'eventuale tossicità del liquido utilizzato, è stato quello di valutare la capacità di *P. tricornutum* di rimuovere le varie componenti azotate e il fosforo presenti nel refluo, valutando anche in questo contesto sperimentale, l'effetto della somministrazione della CO<sub>2</sub>. Si è voluto verificare inoltre come la composizione chimica del refluo potesse modificare la composizione finale della biomassa ottenuta in termini di contenuto cellulare di proteine, polisaccaridi e lipidi.

## **3 MATERIALI E METODI**

### **3.1 Specie microalgale utilizzata**

L'attività sperimentale è stata condotta utilizzando un ceppo di *P. tricornutum*, diatomea appartenente al phylum delle Bacillariophyceae, depositato presso la banca algale del Laboratorio di Biologia delle Alghe del Dipartimento di Scienze biologiche geologiche e ambientali dell'Università di Bologna.

### **3.2 Preparazione del terreno di coltura**

Per la coltivazione delle alghe in laboratorio, è stato utilizzato come base il *medium* f/2 (Guillard and Ryther, 1962) (tabella1) modificato variando la concentrazione di azoto e fosforo.

La base del terreno di coltura è l'acqua demineralizzata alla quale viene aggiunto sale proveniente dal Mar Morto, per ottenere una salinità intorno al 23 ‰. L'acqua preparata viene sterilizzata in autoclave a 120 °C per 20 minuti. Una volta raffreddata, l'acqua sterile va conservata in frigorifero.

Il terreno di coltura viene preparato aggiungendo all'acqua di mare, preparata in precedenza, delle soluzioni stock concentrate, anche esse precedentemente autoclavate e conservate in frigorifero. Durante la fase di preparazione del terreno tutto il lavoro viene condotto in sterilità sotto cappa a flusso laminare.

Nutrienti	Stock (g/200 ml)	Medium ml/l	Conc. finale (M)
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	15	1	$8,82 \times 10^{-4}$
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</b>	1	1	$3,6 \times 10^{-5}$
<b>HEPES</b>	46 (pH 7,1-7,3)	1	-
<b>Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub></b>	2,58	1	-
<b>Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub></b>	0,0034	0,080	-
<b>Vitamine</b>	-	0,5	-
<b>Soluzione stock</b>			
<b>Elementi in traccia + EDTA</b>	-	1	-
Elementi in traccia +EDTA	<b>g/100 ml</b>	<b>Medium mg/l</b>	
<b>EDTA</b>	0,359	3,59	$1,17 \times 10^{-5}$
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	0,189	1,89	$1,17 \times 10^{-5}$
<b>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</b>	0,00098	$9,8 \times 10^{-6}$	$3,93 \times 10^{-8}$
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0,0022	$22 \times 10^{-6}$	$7,65 \times 10^{-8}$
<b>MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>	0,018	$180 \times 10^{-6}$	$9,10 \times 10^{-7}$
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	0,0063	$6,3 \times 10^{-6}$	$2,6 \times 10^{-8}$
Vitamine	<b>Stock mg/100ml</b>	<b>Medium mg/l</b>	<b>M</b>
<b>Thiamine B1</b>		0,2	$2,96 \times 10^{-7}$
<b>Cobalamine B12</b>	100	0,05	$2,05 \times 10^{-9}$
<b>Biotin</b>	10	0,005	$3,69 \times 10^{-10}$

Tabella 1. *Medium f2* (Guillard and Ryther, 1962)

### 3.3 Disegno sperimentale

#### Fase 1

Le prove di crescita con *P. tricornutum* sono state effettuate nella prima fase della tesi in due condizioni nutrizionali modificando la concentrazione dei principali macronutrienti del *medium* f/2 come riportato in tabella 2 in modo da ottenere due diversi rapporti molari fra azoto e fosforo ad una salinità del 23‰.

	N-NO <sub>3</sub> (mg/L)	NaNO <sub>3</sub> (M)	P-PO <sub>4</sub> (mg/L)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (M)	N/P
<b>N/P=8+CO<sub>2</sub></b>	33,3	23,5 x10 <sup>-4</sup>	8,98	28,8 x10 <sup>-5</sup>	8
<b>Controllo (N/P=8)</b>	33,3	23,5 x10 <sup>-4</sup>	8,98	28,8 x10 <sup>-5</sup>	8
<b>N/P=4+CO<sub>2</sub></b>	33,3	23,5 x10 <sup>-4</sup>	18	57,6 x10 <sup>-5</sup>	4
<b>Controllo (N/P=4)</b>	33,3	23,5 x10 <sup>-4</sup>	18	57,6 x10 <sup>-5</sup>	4

Tabella 2. Concentrazioni di N e P utilizzate nella formulazione dei terreni di coltura nelle diverse condizioni sperimentali di crescita di *P. tricornutum*

In entrambi gli esperimenti le alghe sono state fatte crescere in duplicato in bottiglie contenenti 1 L di *medium*, in camera termostatica a 20 ± 2 °C all'intensità luminosa di 90-100 μEinstein m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup> con un ciclo di luce: buio di 16:8 ore. Durante tutto il periodo di durata dell'esperimento tutte le colture sono state insufflate costantemente con aria. In entrambe le condizioni nutrizionali 2 beute sono state insufflate per 10 minuti al giorno con un flusso di circa 60 ml/min che corrisponde a una quantità di CO<sub>2</sub> di 1 mg/L, e 2 beute sono state insufflate con aria "controllo" (figura 5).



Figura 5. Allestimento delle colture algali nella camera termostatica

## Fase 2

Un secondo esperimento è stato condotto utilizzando come terreno di coltura un liquido proveniente da un processo di digestione anaerobica (digestato) di provenienza industriale il cui contenuto di N e P mediamente presenta dei valori simili a quelli di un normale terreno di coltura; in particolare le concentrazioni medie annue di N-NH<sub>4</sub>, di N-NO<sub>2</sub>, di N-NO<sub>3</sub> e di P-PO<sub>4</sub> sono rispettivamente pari a 2,43 mg/L, 29 mg/l e 8,73 mg/l. in particolare il refluo da noi impiegato nelle nostre prove presenta una salinità del 15‰ e le concentrazioni di N e P riportate in tabella 3. Le prove di crescita sono state effettuate in duplicato in bottiglie contenenti 1 L di *medium* alle stesse condizioni utilizzate nell'esperimento precedente e anche in questo caso è stato effettuato un confronto fra le colture insufflate solo con aria e le colture a cui veniva somministrata CO<sub>2</sub> per 10 min al giorno.

	<b>N-NH<sub>4</sub>,NO<sub>2</sub>,NO<sub>3</sub>) (mg/L)</b>	<b>N (M)</b>	<b>P-PO<sub>4</sub> (mg/L)</b>	<b>P (M)</b>	<b>N/P</b>
<b>Digestato (+CO<sub>2</sub>)</b>	40,9	29,5 x10 <sup>-4</sup>	1,93	6,22 x10 <sup>-5</sup>	47
<b>Digestato (Controllo)</b>	40,9	29,5 x10 <sup>-4</sup>	1,93	6,22 x10 <sup>-5</sup>	47

Tabella 3. Concentrazione di azoto e fosforo nel digestato

Durante gli esperimenti condotti sono stati analizzati i seguenti parametri sperimentali:

- Valutazione della crescita attraverso la misura di torbidità effettuata, dopo il prelievo di un'aliquota di 5 ml di sospensione algale, a giorni alterni.
- Analisi elementare di carbonio, azoto cellulari e analisi del contenuto di fosforo intracellulare durante le varie fasi della crescita. Un volume variabile da 35 a 15 ml di sospensione algale secondo la fase di crescita della coltura, in duplicato, è stato filtrato attraverso filtri Whatman GF/C, diametro 25 mm, precedentemente calcinati in muffola a 450 °C per 2 ore. I filtri sono stati essiccati e conservati in congelatore fino al momento dell'analisi; il filtrato è stato raccolto e conservato allo stesso modo in congelatore per le analisi dei nutrienti.

- Determinazione del consumo dei principali macronutrienti nei terreni di coltura raccolti durante le varie fasi di crescita.
- Raccolta della biomassa algale in fase di crescita stazionaria, effettuata per centrifugazione con centrifuga Thermo Scientific Multispeed (modello IEC CL31R) a 3000 rpm per 5 min. Dopo la raccolta la biomassa è stata liofilizzata e conservata in essiccatore per le analisi successive.
- Determinazione di componenti cellulari sulla biomassa raccolta: proteine, polisaccaridi, lipidi totali e quali-quantitativa degli acidi grassi.

### 3.4 Andamento della crescita di una coltura “batch”

Gli esperimenti sono stati condotti in condizioni di coltura “batch”: tale metodo prevede che venga posto un piccolo inoculo di sospensione algale in un volume costante di terreno di coltura; in questo modo le cellule algali aumentano la loro biomassa e riducono sempre di più la quantità di nutrienti disponibile fino ad arrivare all'esaurimento di almeno uno dei componenti (fattore limitante), in questa tecnica di coltivazione non si prevedono altre aggiunte di nutrienti.

Sperimentalmente si può osservare che la crescita algale viene rappresentata in 4 fasi (figura 6):

1. **Fase di latenza o lag:** rappresenta la fase di adattamento dell'alga al terreno dopo l'inoculo;
2. **Fase esponenziale:** rappresenta la fase in cui l'alga non è limitata dalle condizioni di crescita, nella coltura si osserva una rapida crescita cellulare con andamento logaritmico; nella curva di crescita questa fase è rappresentata dal tratto con pendenza maggiore;
3. **Fase stazionaria:** fase in cui le cellule raggiungono la crescita massima, durante questa fase la crescita rallenta in conseguenza all'esaurimento dei nutrienti, può durare alcune settimane;
4. **Fase di declino:** fase in cui le cellule tendono a morire

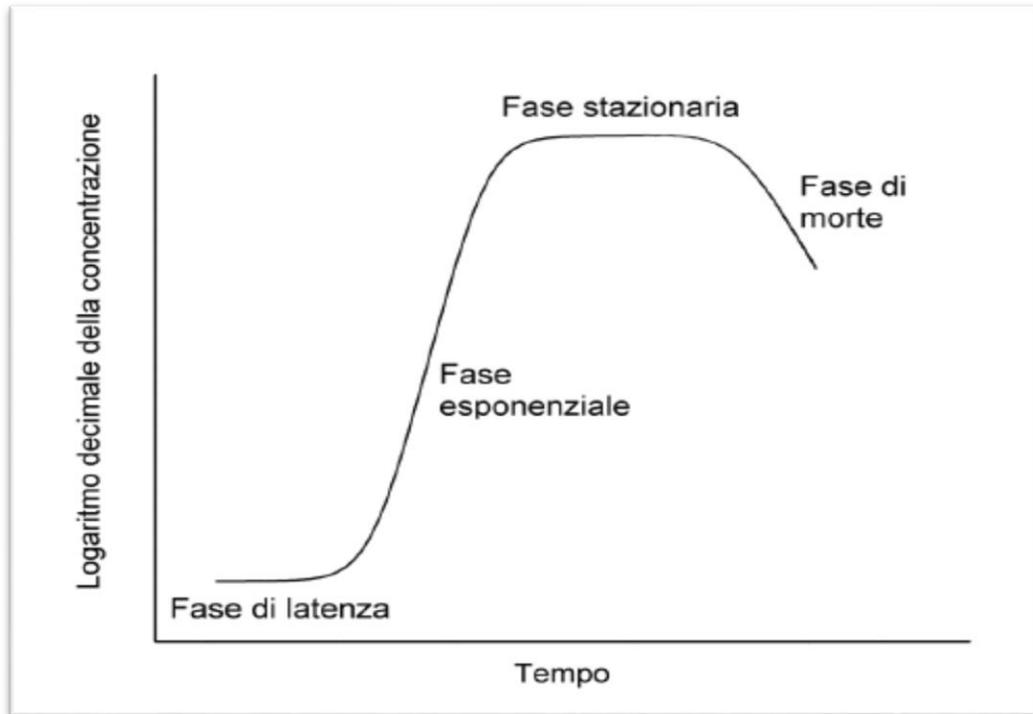


Figura 6. Curva di crescita algale in funzione del tempo

Per valutare la crescita algale si possono adottare diversi sistemi come la conta cellulare, la fluorescenza in vivo, la densità ottica e la biomassa (valutazione del peso secco). Per questo esperimento la crescita è stata valutata tramite l'analisi della torbidità.

### 3.4.1 Valutazione della crescita attraverso l'analisi della torbidità

L'analisi della torbidità è stata effettuata con uno spettrofotometro a doppio raggio Jasco modello V-650, prelevando a giorni alterni i campioni di sospensione algale e misurando la densità ottica (assorbanza) a 750 nm, a tale lunghezza d'onda le clorofille non assorbono e la densità ottica rilevata è una misura aspecifica dovuta alle particelle cellulari presenti nel cammino ottico della cuvetta. Mettendo in grafico i parametri di concentrazione cellulare (numero di cellule/ml) e assorbanza a 750 nm si ottiene una curva di correlazione lineare. Tale relazione tuttavia diviene non accurata quando la coltura si trova oltre la fase esponenziale, per l'accumulo di materiale extracellulare che potrebbe interferire nell'assorbimento, per questo è preferibile diluire il campione prima di essere letto.

$$X = (y/0,1454) * 1000000$$

Da questa relazione è possibile ricavare dal valore di torbidità il numero di cellule per ml della sospensione algale ottenendo così le curve di crescita nelle varie condizioni sperimentali; da queste curve si può ricavare la velocità di crescita ( $\mu$ ) usando la seguente formula

$$\mu = \ln N_1 - \ln N_0 / t_1 - t_0$$

Dove  $N_1$  e  $N_0$  rappresentano le abbondanze cellulari corrispondenti ai giorni  $t_1$  e  $t_0$ .

Dai valori di assorbanza a 750nm è possibile ricavare il valore di peso secco utilizzando una correlazione lineare che esiste tra questi due parametri secondo la seguente formula

$$X = (y/1,246)$$

### 3.5 Analisi dei nutrienti

La velocità di *uptake* dei nutrienti è stata calcolata usando la seguente formula

$$U = - (C_1 - C_0) / \gamma \Delta t$$

dove:

**C** = la concentrazione residua nel terreno del nutriente preso in considerazione;

**$\gamma \Delta t$**  = variazione nell'arco di tempo preso in esame ( $\Delta t$ ) nella densità algale in termini di numero di cellule

Inoltre

$$\gamma = B_1 - B_0 / \ln B_1 - \ln B_0$$

dove:

**$B_1$  e  $B_0$**  = numero di cellule al tempo 1 e al tempo 0.

#### 3.5.1 Determinazione dei nitrati

Il nitrato viene ridotto a nitrito in modo quasi quantitativo (90-95%) facendo percolare l'acqua da analizzare attraverso una colonna di cadmio metallico ramato (figura 7) ad un pH iniziale di circa 5,5. Successivamente si misura per via spettrofotometrica a 543 nm l'assorbanza del prodotto colorato che si ottiene a pH 1,5-2 dalla diazotazione con solfanilammide (SA) dell'acido nitroso formatosi e dalla successiva reazione con N-(1-naftil)-etilendiammina (NEDA).

Prima di far passare i campioni lungo la colonna, se ne verifica l'efficienza. Inizialmente viene effettuato, prima e dopo l'analisi, un lavaggio facendo percolare una soluzione di 200 ml di cloruro di ammonio diluita allo 0,625%. Successivamente si procede facendo percolare un bianco, uno standard e i campioni.

Il bianco è stato preparato usando acqua di mare sintetica in matracci di vetro da 100 ml, per lo standard inizialmente è stata preparata una soluzione concentrata di nitrato di potassio anidro ( $\text{KNO}_3$ ) precedentemente seccato in stufa ( $1,011 \text{ g/L} =$  concentrazione di  $\text{N-NO}_3$  pari a circa  $140 \text{ mg/L}$ ) diluita a 1 litro di acqua distillata, da questa si prepara la soluzione standard diluita  $\text{N-NO}_3$  (circa  $0,14 \text{ mg/L}$ ) prelevando  $0,5 \text{ ml}$  e diluendo a  $500 \text{ ml}$  con acqua di mare sintetica. I campioni sono stati diluiti con acqua di mare sintetica usando dei matracci di vetro da  $100 \text{ ml}$  (figura 8). A ciascuno di essi sono stati aggiunti  $2 \text{ ml}$  di soluzione concentrata di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 25%.



Figura 7. Colonna con cadmio ramato per la riduzione del nitrato

Successivamente il bianco, lo standard e i campioni sono stati passare attraverso la colonna, per ciascuno di essi sono stati scartati i primi  $45 \text{ ml}$  e sono stati raccolti  $50 \text{ ml}$  in cilindri di vetro graduati. Terminata la riduzione sono stati aggiunti  $2 \text{ ml}$  di soluzione di SA, si è atteso  $3 \text{ minuti}$ , è stato aggiunto  $1 \text{ ml}$  di soluzione di NEDA, si è atteso  $15 \text{ minuti}$ . Lo ione in questione è incolore, l'aggiunta delle due soluzioni

determina una reazione colorimetrica, l'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione dei nitrati presenti nel campione (figura 9). L'assorbanza è stata letta allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) di 543 nm usando cuvette di vetro con cammino ottico di 1 cm. Per la determinazione dei nitrati bisogna sottrarre ai valori di assorbanza ottenuti per i campioni il rispettivo valore del bianco e procedere alla determinazione del fattore F attraverso la seguente formula:

$$F = \frac{[N \text{ di } NO_3] * (0,14 \text{ ppm})}{\text{abs (st m)} - \text{abs (bianco)}}$$



Figura 8. Preparazione del bianco, dello standard e dei campioni

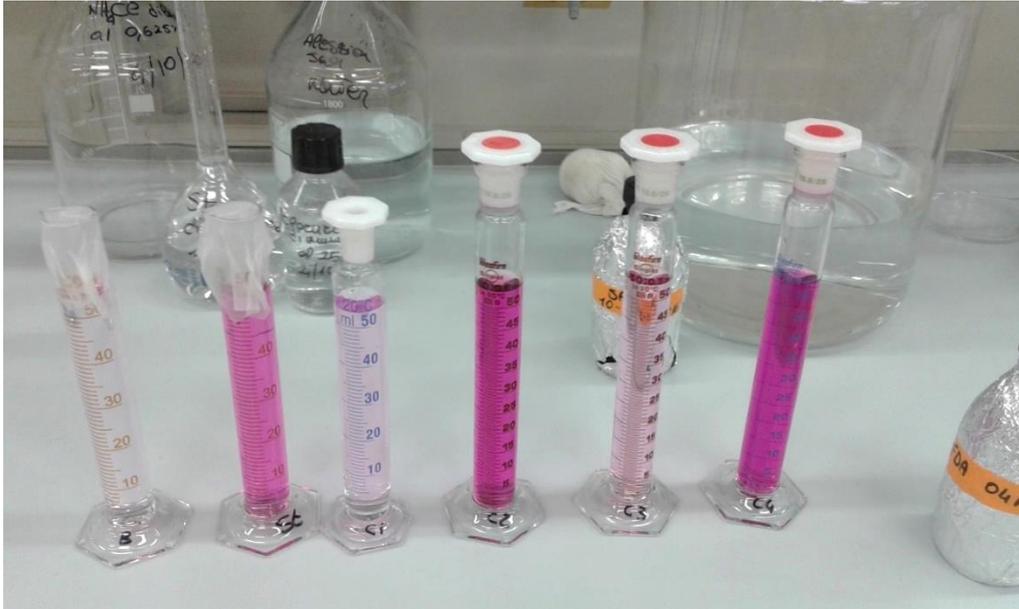


Figura 9. Reazione colorimetrica dei campioni in seguito all'aggiunta delle soluzioni di SA e di NEDA

Il fattore F deve avere un valore vicino a 0,31 per una efficienza del 100% e un valore di 0,37 per una efficienza di circa l'84%.

La concentrazione dei nitrati si ottiene nel seguente modo:

$$\text{mg/l (N di NO}_3\text{)} = \frac{F * [\text{abs (c)} - \text{abs (bianco)}] * 100}{V}$$

Dove:

**F**= fattore

**Abs (c)**= assorbanza del campione corretta per i valori del bianco e per l'assorbanza dei nitriti

**V**= volume in ml di acqua in esame prelevata per l'analisi (ICRAM, 2001; APAT 2003).

### 3.5.2 Determinazione del fosforo reattivo

La determinazione del fosforo è stata effettuata in un campione di 50 ml di filtrato algale opportunamente diluito con acqua distillata per evitare che l'elevata concentrazione iniziale di fosforo falsasse la lettura spettrofotometrica. A ciascun campione e al bianco costituito con acqua distillata sono stati aggiunti 5 ml di reattivo

misto. Il reattivo misto è costituito da: una soluzione di molibdato ammonico, una soluzione di acido solforico, una soluzione di acido ascorbico e infine una soluzione di tartrato di potassio e antimonile in proporzione rispettivamente di 2:5:2:1. Dopo aver aggiunto il reattivo misto, i campioni assumevano una colorazione blu (figura 10) che varia a seconda della quantità dei fosfati presenti in soluzione. Dopo 10 minuti di attesa è stata letta l'assorbanza dei campioni allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) di 885 nm usando cuvette di vetro con cammino ottico di 1 cm. La concentrazione di fosforo presente viene ricavata sulla base di una curva di calibrazione (figura 11) ottenuta usando un sale standard di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Da 0 a 0,500 mg/L (ICRAM, 2001; APAT 2003).

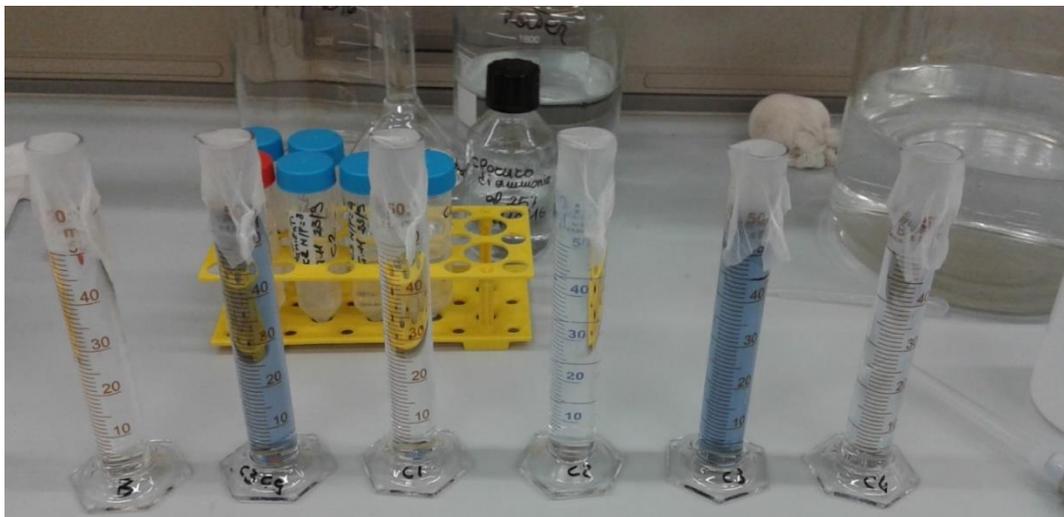


Figura 10. Reazione colorimetrica per la determinazione del fosforo reattivo

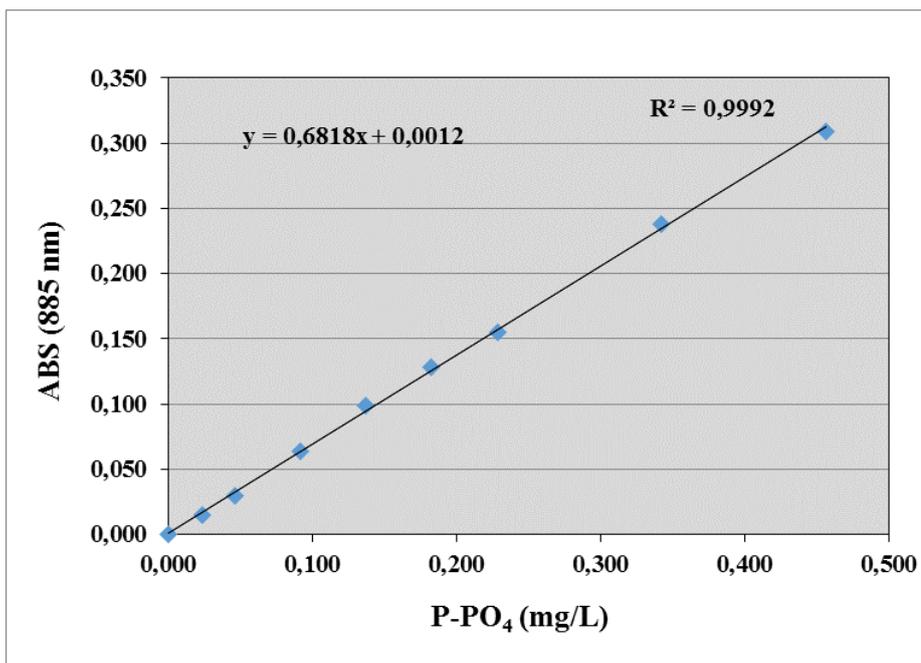


Figura 11. Curva di calibrazione per la determinazione del fosforo

### 3.5.3 Determinazione degli anioni mediante cromatografia ionica

Il metodo (APAT, 2003) si basa sulla determinazione simultanea di specie anioniche attraverso la cromatografia ionica. Questa tecnica si basa sulla distribuzione differenziale dei diversi componenti fra due fasi, una chiamata fase fissa o stazionaria e l'altra chiamata fase mobile o eluente, che fluisce in continuo attraverso la fase fissa. L'eluente, contenente gli analiti separati, passa attraverso un dispositivo di derivatizzazione chimica post-colonna detto soppressore che, scambiando protoni con la fase mobile, ha lo scopo di abbassare la conducibilità di fondo dell'eluente, per formazione dell'acido debole coniugato e di esaltare il segnale dell'analita, che viene rivelato mediante un conduttimetro in linea. Questo metodo è stato validato per gli anioni più analizzati (cloruro, nitrato e solfato). Il campione da analizzare viene introdotto nella fase mobile. Il campione, che viene opportunamente diluito, viene iniettato nel "loop", l'iniezione viene fatta usando una siringa di plastica, questa prima viene lavata per due volte con acqua deionizzata, successivamente viene iniettato il campione usando un filtro con porosità di 0,2  $\mu\text{m}$ . Una volta che viene iniettato il campione si passa alla acquisizione del cromatogramma. I campioni vengono identificati in base alla posizione dei picchi sull'asse dei tempi o tempo di ritenzione (tempo che impiega un componente del composto iniettato ad uscire dalla colonna). Completata l'identificazione qualitativa dei picchi, si procede all'analisi quantitativa

ricavando le concentrazioni degli anioni dalla curva di taratura costruita per ciascun analita.

### **3.6 Determinazione della composizione elementare di carbonio e azoto**

La determinazione del carbonio e azoto organico è stata effettuata utilizzando un analizzatore elementare CHNS-O, modello Flash 2000 della Thermo Fisher Scientifici. L'analisi elementare è la determinazione della percentuale in peso di carbonio, idrogeno, azoto e zolfo presente nel campione. Il principio di funzionamento di questo strumento prevede una combustione rapida e completa del campione all'interno di una fornace alla temperatura di 950°C, questo permette di bruciare tutta la parte organica, convertendo le molecole nei rispettivi prodotti di combustione al loro massimo stato di ossidazione.

I campioni da analizzare sono stati precedentemente filtrati su filtri in fibra di vetro (GF/C da 25 mm) e conservati in congelatore fino al momento delle analisi. Prima di effettuare l'analisi i filtri sono stati posti nella stufa a 60°C per eliminare l'eccesso di acqua; i filtri sono stati successivamente tagliati a metà, in modo da avere due repliche, chiusi in contenitori di stagno e posti nell'autocampionatore dove vengono trasportati da un flusso di elio arricchito con ossigeno puro all'interno di un tubo di quarzo verticale riempito con appositi catalizzatori e rame metallico dove avviene la combustione istantanea e la loro completa ossidazione. Tutti i gas di combustione, trasportati dal flusso costante di elio, vengono fatti passare attraverso dei catalizzatori per la loro totale ossidazione a N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, SO<sub>2</sub> e N<sub>x</sub>O<sub>y</sub> e successivamente su rame per rimuovere l'eccesso di ossigeno e ridurre gli ossidi di azoto (N<sub>x</sub>O<sub>y</sub>) ad azoto elementare (N<sub>2</sub>). La miscela di gas risultante viene sospinta dal gas carrier (elio) in una colonna cromatografica dove i singoli componenti vengono eluiti individualmente come N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e SO<sub>2</sub>, fino ad un rilevatore a conducibilità termica (TCD) (figura 12).

L'identificazione quali-quantitativa degli elementi viene effettuata tramite una retta di calibrazione di riferimento, costruita utilizzando lo standard 2,5-Bis-(5-tert-butyl-2-benzo-oxazol-2-yl) tiofene (BBOT). La formula chimica e la percentuale degli elementi sono riportati di seguito:



**C: 72,53%; H: 6,09%; N: 6,51%; O: 7,43%; S: 7,44%**

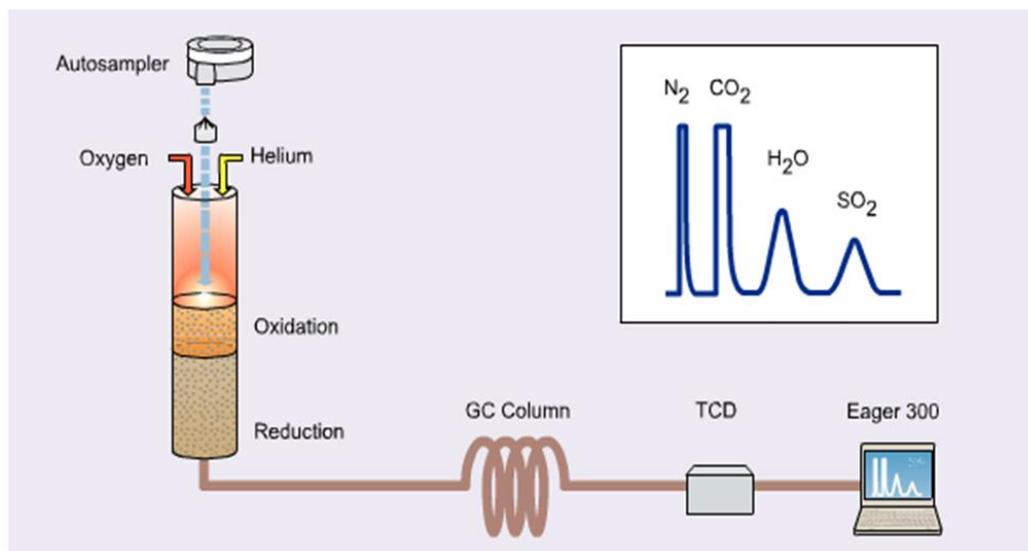


Figura 12. Schema del funzionamento di un analizzatore elementare

### 3.7 Determinazione del fosforo intracellulare

I campioni per la determinazione del fosforo intracellulare sono stati preparati in precedenza, la preparazione è analoga a quella per la determinazione del carbonio e azoto organico. Per le analisi, i filtri sono stati posti in matracci di vetro da 50 ml e chiusi con tappi a vite con l'aggiunta di 8 ml di Persolfato di potassio al 5% ( $K_2S_2O_8$ ). La soluzione serve per degradare la materia organica e permettere così il rilascio del fosforo organico intracellulare. I matracci preparati vengono avvolti in pellicola trasparente e posizionati in autoclave per 30 minuti. Trascorso il tempo necessario si passa alle analisi per la determinazione del fosforo, il procedimento è lo stesso per la determinazione del fosforo reattivo descritto nel punto 4.2. I campioni per evitare di falsare la lettura sono stati diluiti con H<sub>2</sub>O distillata usando dei cilindri da 50 ml a cui vengono aggiunti 5 ml del reattivo misto si è atteso 10 minuti, prima di leggere l'assorbanza allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) di 885 nm usando cuvette di vetro con cammino ottico di 1 cm contro acqua distillata.

### 3.8 Estrazione e determinazione dei lipidi

La fase di estrazione della frazione lipidica dei campioni algali è stata fatta applicando il metodo di Bligh et Dyer (1959). Circa 100 mg di campione liofilizzato è stato introdotto all'interno di una provetta di vetro per essere estratti con 6 ml di una miscela 2:1  $CHCl_3/MeOH$  per 1.5 h per 3 volte. Al termine della fase estrattiva la soluzione organica viene separata dalla biomassa attraverso centrifugazione per circa un minuto e il solvente recuperato sempre nella stessa vials e seccato sotto N<sub>2</sub>.

La determinazione dei lipidi estratti dai campioni è stata espressa in percentuale sulla base del peso del campione analizzato.

### **3.8.1 Determinazione degli acidi grassi totali (TFA)**

Ad un aliquota di estratto lipidico (2 mg) è stato aggiunto 0,4 ml di dimetilcarbonato (solvente di reazione), 0,1 ml di idrossido di sodio in metanolo (0,5 M) e 0,1 ml di dimetossipropano. I campioni sono stati posti in agitazione per circa 30 minuti a 70-80°C. Successivamente sono stati aggiunti 0,7 ml di MeOH-BF<sub>3</sub> e i campioni sono stati posti nuovamente in agitazione per altri 30 minuti a 70°C. Infine sono stati aggiunti 0,02 mg di uno standard per l'analisi quantitativa, 2 ml di brine e 1 ml di esano. I campioni sono stati prelevati e posti in una vial da GC. L'identificazione degli acidi grassi è stata effettuata tramite analisi GC-MS.

### **3.9 Determinazione delle proteine**

L'analisi delle proteine è stata effettuata utilizzando un'aliquota di campione liofilizzato in precedenza. L'estrazione del campione è stata effettuata ponendo una quantità di biomassa di circa 10 mg in una provetta da 15 ml a cui sono stati aggiunti 3 ml di NaOH 0,5 M, la sospensione è stata agitata vigorosamente sul vortex per facilitare la rottura delle cellule. I campioni, successivamente sono stati incubati a 90° C per 8 minuti e lasciati a raffreddare nel ghiaccio per 2 minuti, dopo il raffreddamento sono stati centrifugati a 3000xg a 4°C per 10 minuti; infine il sovrantante è stato raccolto e posto in provette da 15 ml, questa estrazione è stata ripetuta 2/3 volte. Al termine di questa operazione tutti i sovrantanti sono stati uniti e portati al volume finale di 10 ml. Su questa frazione è stata poi eseguita l'analisi delle proteine applicando il metodo di Lowry (1951). Il metodo si basa su una reazione colorimetrica (figura 13) data dal reattivo di Folin (fosfomolibdato, fosfotungstato, sali rameici) con gli amminoacidi contenenti gli anelli aromatici. La determinazione quantitativa delle proteine è stata ottenuta dopo la lettura allo spettrofotometro del campione ad una lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) di 750 nm, usando come riferimento una curva di calibrazione ottenuta da uno standard di albumina sierica bovina (BSA).



Figura 13. Reazione colorimetrica per la determinazione delle proteine

### 3.10 Determinazione dei polisaccaridi intracellulari

Per l'estrazione dei polisaccaridi cellulari è stato utilizzato il metodo di Myklestad (1972).

Un' aliquota di campione precedentemente liofilizzata di circa 10 mg è stata incubata con 1 ml di  $H_2SO_4$  12 M a  $37^\circ C$  per 1 h. Successivamente ogni campione è stato portato ad un volume totale di 11 ml con l'aggiunta di  $H_2O$  distillata, mescolato sul vortex per 30 secondi e posto a incubare in un bagno termostato a  $100^\circ C$  per 2 h; i campioni sono stati poi raffreddati in ghiaccio per 30 minuti e centrifugati a  $3000xg$  per 10 minuti a  $4^\circ C$ . Sul sovrantante così ottenuto è stata effettuata la determinazione dei polisaccaridi con il metodo di Dubois (1956): 100  $\mu l$  di campione sono stati posti in tubi di vetro, a questi sono stati aggiunti 1 ml di fenolo 2,5% e 2,5 ml di  $H_2SO_4$  95% e lasciati ad incubare per 30 minuti. Al termine dell'incubazione è stata effettuata una lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) di 490nm. La concentrazione di polisaccaridi nel campione viene ricavata sulla base di una curva di calibrazione ottenuta con il glucosio.

### 3.11 Analisi statistica

L'analisi statistica effettuata usando il programma Excel riguarda l'analisi della varianza (ANOVA) sui diversi rapporti molari considerati nei singoli esperimenti e sul contenuto cellulare al fine di valutare eventuali differenze significative tra i diversi trattamenti.

## 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 Crescita di *P. tricornutum* in colture “batch” con due diverse condizioni nutrizionali: effetto della somministrazione di CO<sub>2</sub>

#### 4.1.1 Andamento della crescita

La crescita della specie algale presa in esame è stata seguita attraverso la valutazione della torbidità grazie all'elevata correlazione che c'è tra questo parametro e il numero di cellule. La figura 14.a, mostra la variazione della torbidità in funzione del tempo di colture cresciute con un contenuto di azoto (N) e fosforo (P) tale da ottenere un rapporto molare uguale ad 8 (N/P=8); in questo esperimento inoltre, è stato effettuato un confronto fra una condizione di controllo e una condizione in cui le colture sono state insufflate giornalmente per 10 minuti con un flusso di anidride carbonica pari a 1 mg/L (+CO<sub>2</sub>). Come si può osservare dal grafico (figura 14.a), nelle due condizioni le alghe presentano una fase di crescita simile durante i primi giorni, mentre a partire dal giorno 4 la crescita si differenzia e risulta significativamente maggiore (Anova,  $p < 0,05$ ) per la coltura trattata con CO<sub>2</sub> rispetto alla coltura non trattata; dalle curve ottenute per conversione dei valori di torbidità a numero di cellule (figura 15.a), secondo l'equazione riportata in materiali e metodi, si può osservare una differenza non significativa per quanto riguarda la velocità di crescita, mentre il numero di cellule ottenuto il giorno della raccolta (g.17) è maggiore del 35% nella coltura trattata con CO<sub>2</sub>. Da questi dati emerge che la prima fase di crescita non presenta nessuna limitazione, mentre a partire dal giorno 4 si osserva l'effetto dovuto a una carenza di carbonio, pertanto la somministrazione di CO<sub>2</sub> determina un incremento significativo della crescita.

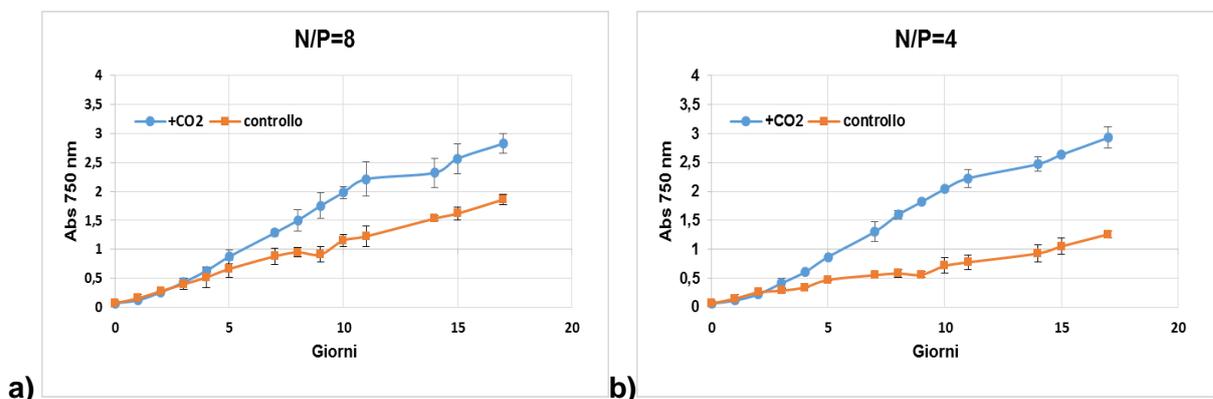


Figura 14. Variazione della torbidità in: a) N/P=8; b) N/P=4

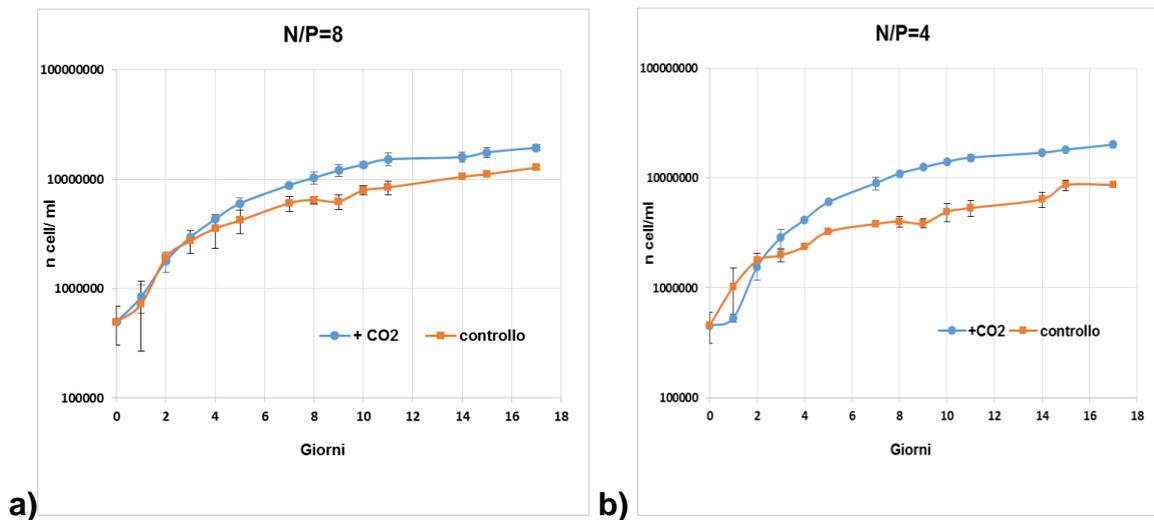


Figura 15. Curve di crescita in: a) N/P=8; b) N/P=4

Le colture cresciute con un rapporto molare uguale a 4 (N/P=4) (figura 14.b, 15.b), mostrano un andamento simile alle precedenti con una differenza nella velocità di crescita a partire dal giorno 4. In questa condizione nutrizionale però, il numero di cellule ottenuto al giorno 17 della coltura, nel controllo è più basso rispetto alle condizioni precedenti (tabella 4; figura 15.b), evidenziando che questo rapporto molare fra i due principali macronutrienti è più sfavorevole per la crescita; in questa condizione, tuttavia, la somministrazione di CO<sub>2</sub> incrementa in maniera significativa (Anova,  $p < 0,05$ ) sia la velocità di crescita che il numero di cellule ottenuto al giorno 17. L'incremento del valore di biomassa in termini di peso secco nella coltura trattata con CO<sub>2</sub> è pari al 50% rispetto alla condizione di controllo.

	N/P = 8			N/P = 4		
	$\mu$ (g <sup>-1</sup> )	yield (n cell/ml)	DW (g/L)	$\mu$ (g <sup>-1</sup> )	yield (n cell/ml)	DW (g/L)
+CO <sub>2</sub>	0,420	19447042	2,3	0,561	20145804	2,4
Controllo	0,444	12803301	1,7	0,455	8671251	1,3

Tabella 4. Valori di velocità di crescita ( $\mu$ ) e di peso secco (DW) al giorno della raccolta (g.17)

#### 4.1.2 Consumo dei nutrienti

Le curve relative al consumo dei nutrienti dal terreno di coltura, mostrano che in entrambe le condizioni trattate con CO<sub>2</sub> (figura 16.a,b) vi è un totale esaurimento di N nei primi 9 giorni della crescita. Nei controlli N viene consumato completamente al giorno 17 solo nella condizione N/P=8, mentre in N/P=4 al momento della raccolta, la

concentrazione residua di N nel terreno è pari al 25% rispetto a quella iniziale. Passando ai profili di assorbimento del fosforo (figura 17.a,b), possiamo osservare che l'utilizzo di tale nutriente da parte delle cellule avviene in maniera assolutamente diversa da quello dell'azoto: nella condizione N/P=8 in cui è presente una concentrazione iniziale di P più bassa (9 mg/L), il suo esaurimento nel terreno di coltura avviene dopo 7 giorni nel controllo e dopo 11 giorni in seguito al trattamento con CO<sub>2</sub>; in N/P=4, dove il contenuto iniziale di fosforo nel *medium* è raddoppiato (18 mg/L), il consumo totale si verifica solo nel controllo all'undicesimo giorno della crescita, mentre non si verifica nelle colture in presenza di CO<sub>2</sub>.

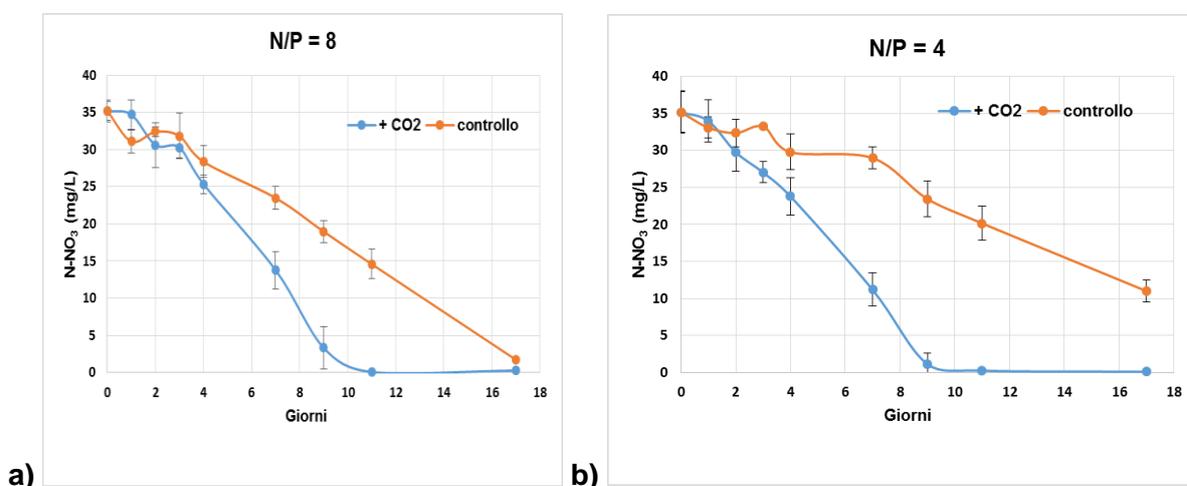


Figura 16. Variazione del contenuto di N-NO<sub>3</sub> nel terreno di coltura in: a) N/P=8; b) N/P=4

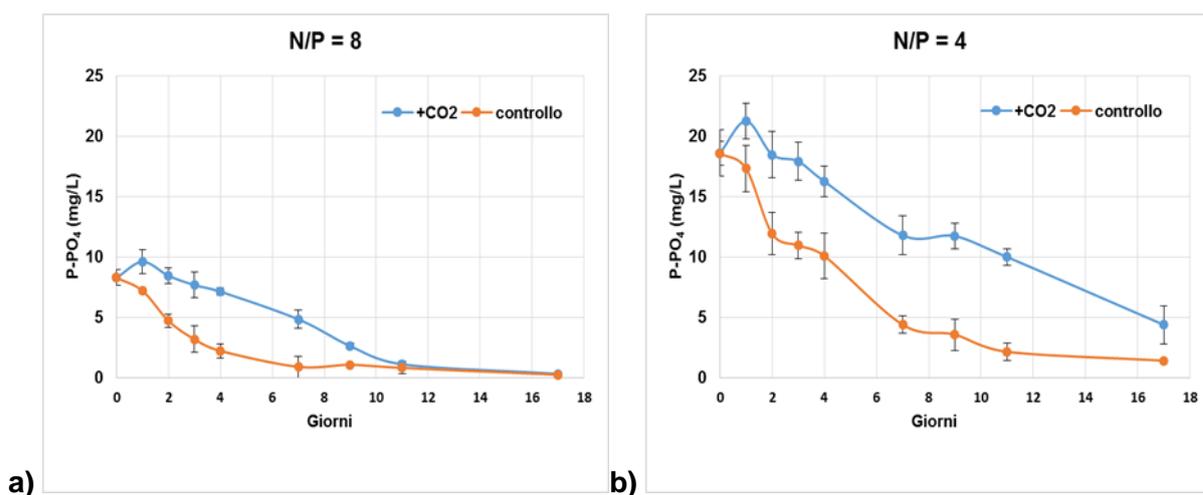


Figura 17. Variazione del contenuto di P-PO<sub>4</sub> nel terreno di coltura in: a) N/P=8; b) N/P=4

In tabella 5, sono mostrati i valori della velocità di *uptake* di N e P nelle due condizioni; si può osservare che l'*uptake* di N è uguale in tutte le condizioni e non è influenzato dal trattamento con CO<sub>2</sub> con l'eccezione di un lieve incremento non

significativo osservato in N/P=4 con CO<sub>2</sub> rispetto al controllo (Anova, p>0,05). Nelle colture N/P=8 la velocità di *uptake* (tabella 5) diminuisce di circa 7 volte passando da 4,8 a 0,7 pmol cell<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> in seguito al trattamento con CO<sub>2</sub>; nella condizione N/P=4 di controllo la velocità di assorbimento del fosforo è la più alta osservata, e si riduce di circa 5 volte da 16,5 a 3,29 pmol cell<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; per entrambe le condizioni le diminuzioni osservate sono statisticamente significative (Anova, p< 0,05).

	N/P=8		N/P=4	
	U (pmol cell <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )			
	N	P	N	P
+CO <sub>2</sub>	32,1	0,7	33,0	3,3
Controllo	31,4	4,8	37,3	16,5

Tabella 5. Velocità massima di *uptake* di N e P

Dai nostri risultati emerge che la somministrazione di CO<sub>2</sub> non influenza in maniera significativa la velocità di assorbimento dell'azoto, che viene rimosso in un intervallo di tempo più breve dal mezzo di coltura solo come conseguenza del maggiore incremento della biomassa algale, mentre fa diminuire la velocità di *uptake* del fosforo. Questo risultato viene confermato da uno studio di Beardall et al., (1997) dove si evidenzia che l'assorbimento del fosforo inorganico compete con il processo di assorbimento della CO<sub>2</sub> nel bilancio energetico della cellula, pertanto se la cellula consuma energia nei meccanismi di trasporto e concentrazione della CO<sub>2</sub> assorbe più lentamente il fosforo; quando la concentrazione di CO<sub>2</sub> è bassa nel mezzo di coltura, la cellula che si trova in una condizione di limitazione da carbonio tende ad accumulare maggiormente il fosforo sotto forma di sostanze di riserva come granuli di polifosfato (Hu, 2013).

### 4.1.3 Composizione elementare

Durante la crescita, oltre all'assorbimento dei nutrienti, sono stati analizzati i contenuti di carbonio (C), N e P cellulari. Le figure 18, 19 e 20, mostrano l'andamento degli elementi per unità di volume; il profilo del carbonio aumenta seguendo l'andamento della crescita in tutte le condizioni, il contenuto di azoto aumenta fino al giorno 9 e 10 per rimanere costante o diminuire fino al giorno della raccolta nelle condizioni con CO<sub>2</sub>, in accordo con il suo totale esaurimento nel mezzo di coltura, mentre nelle colture di controllo aumenta in maniera lineare fino al giorno della raccolta. L'andamento del fosforo in entrambe le condizioni conferma che in assenza di CO<sub>2</sub> questo nutriente viene assorbito più velocemente dalle cellule durante la prima fase della crescita (giorni 3-4). I profili del contenuto di carbonio espressi per cellula in entrambe le condizioni nutrizionali mostrano andamenti simili tra loro (figura 21.a,b) con un leggero incremento dei valori nelle colture trattate con CO<sub>2</sub>. Il contenuto di azoto per cellula (figura 22.a,b) non presenta differenze significative nelle varie fase della crescita in tutte le condizioni della coltura confermando i valori simili di *uptake* riportati in tabella 5; il contenuto di fosforo intracellulare (figura 23.a,b) invece, aumenta rapidamente in entrambe le condizioni di controllo fino ad un massimo osservato al giorno 4 in N/P=4 di 3,80 pg cell<sup>-1</sup> per poi ridistribuirsi all'interno delle cellule durante l'aumento della biomassa.

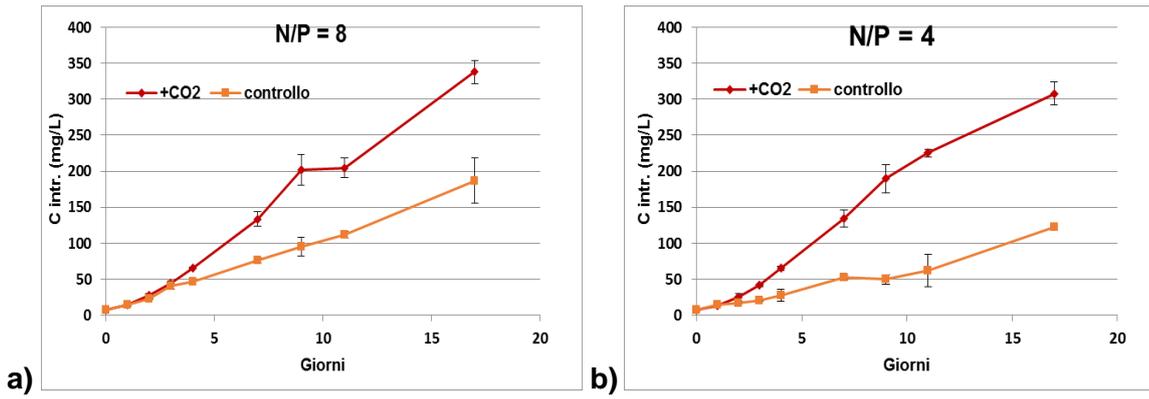


Figura 18. Variazione del carbonio intracellulare per unità di volume in: a) N/P=8; b) N/P=4

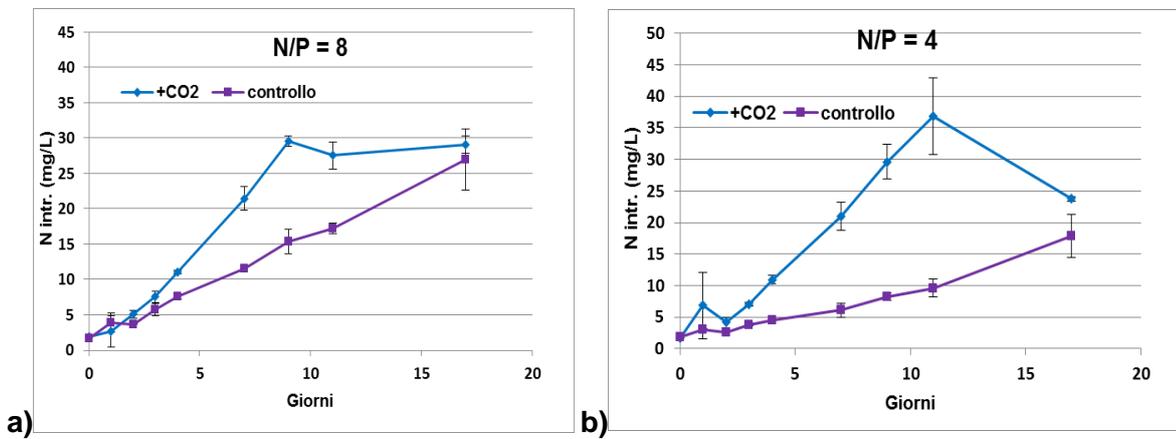


Figura 19. Variazione dell'azoto intracellulare per unità di volume in: a) N/P=8; b) N/P=4

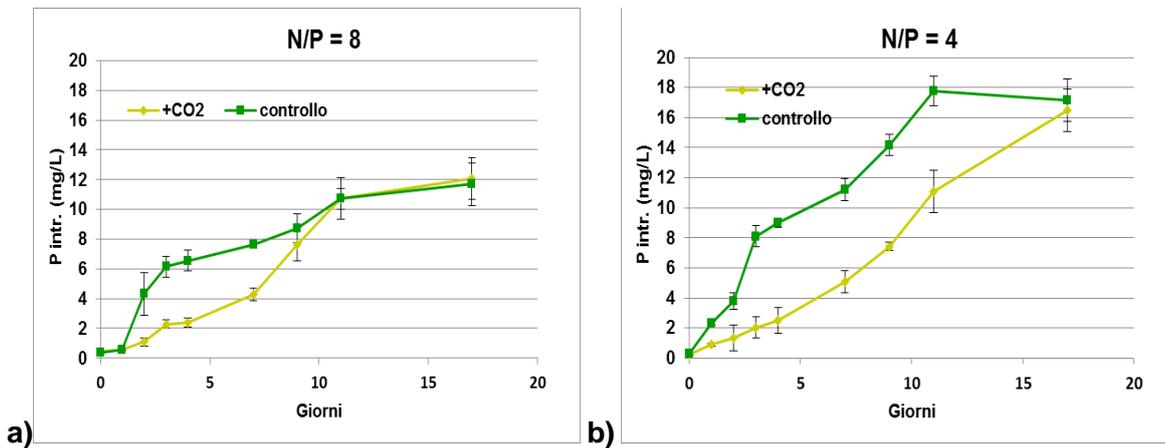


Figura 20. Variazione del fosforo intracellulare per unità di volume in: a) N/P=8; b) N/P=4

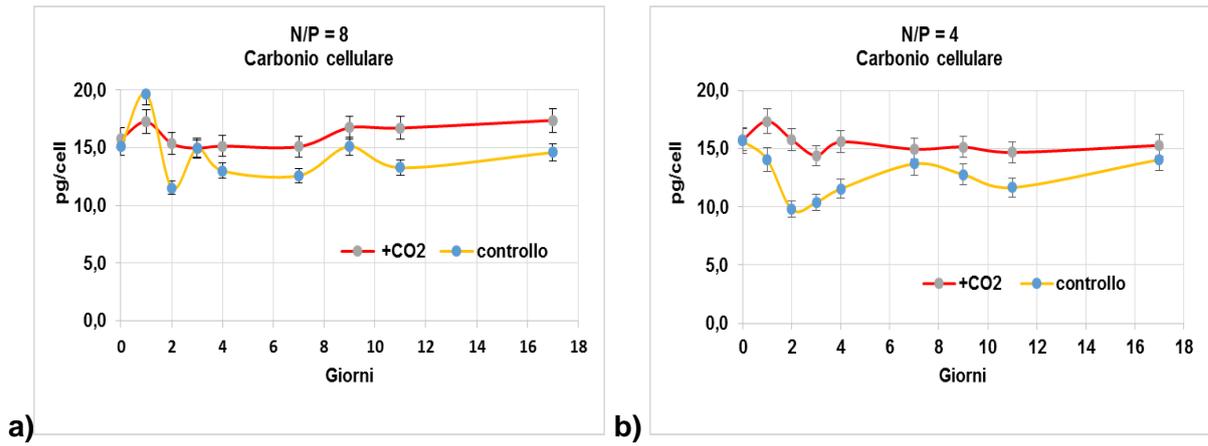


Figura 21. Contenuto di carbonio per cellula in: a) N/P=8; b) N/P=4

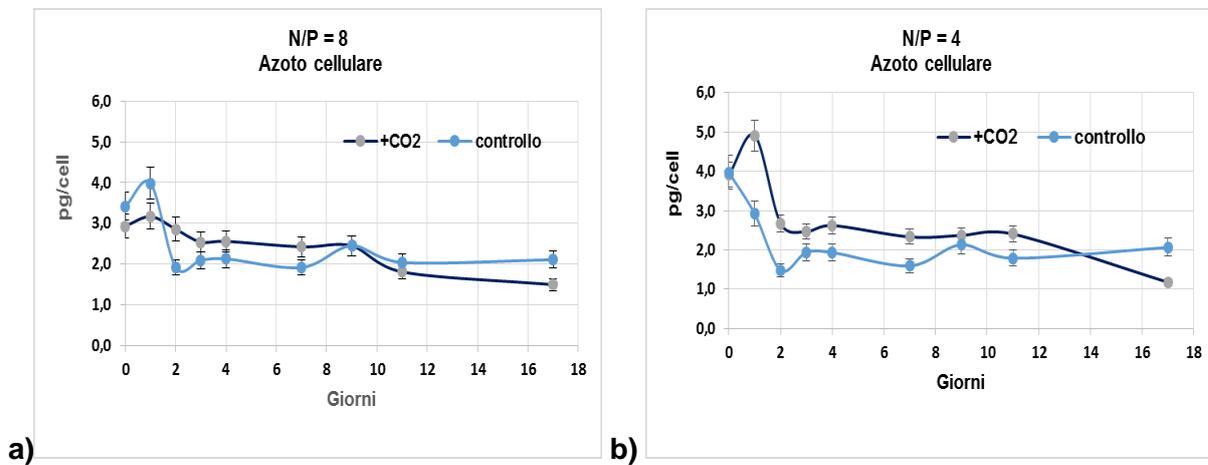


Figura 22. Contenuto di azoto per cellula in: a) N/P=8; b) N/P=4

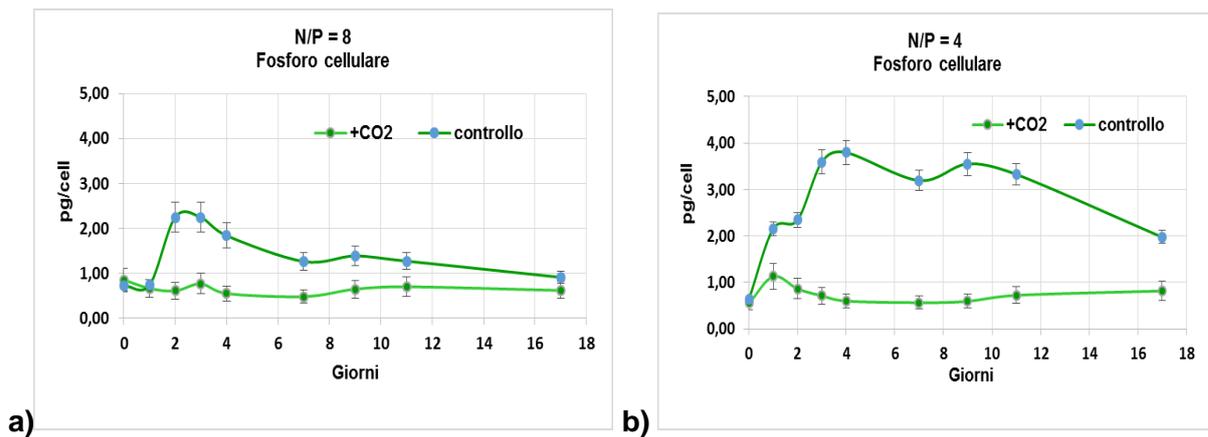


Figura 23. Contenuto del fosforo per cellula in: a) N/P=8; b) N/P=4

#### 4.1.4 Composizione cellulare

La composizione cellulare di *P. tricornutum* è stata valutata in fase stazionaria al giorno 17 dopo la raccolta della biomassa algale, in termini di contenuto di proteine, lipidi e polisaccaridi. Il profilo in figura 24 mostra che in entrambe le condizioni N/P=8 e N/P=4 di controllo, la percentuale maggiore fra i componenti cellulari è costituita dalle proteine con valori rispettivamente del 41% e 38% sul peso secco dell'alga; la componente proteica diminuisce significativamente del 20% in entrambe le condizioni in seguito a somministrazione di CO<sub>2</sub> (Anova,  $p < 0,05$ ). Dai nostri dati osserviamo una riduzione del contenuto proteico nei trattamenti dove si registra una maggiore densità cellulare (tabella 4); questo risultato è confermato anche da uno studio di Chrismadha e Borowitzka (1994) dove emerge che l'aggiunta del 5% di CO<sub>2</sub> in colture di *P. tricornutum*, incrementa inizialmente il contenuto delle proteine per cellula, ma quando l'incremento della biomassa algale è tale da indurre una limitazione da azoto, si osserva una marcata diminuzione del contenuto proteico ed un accumulo di carboidrati per cellula.

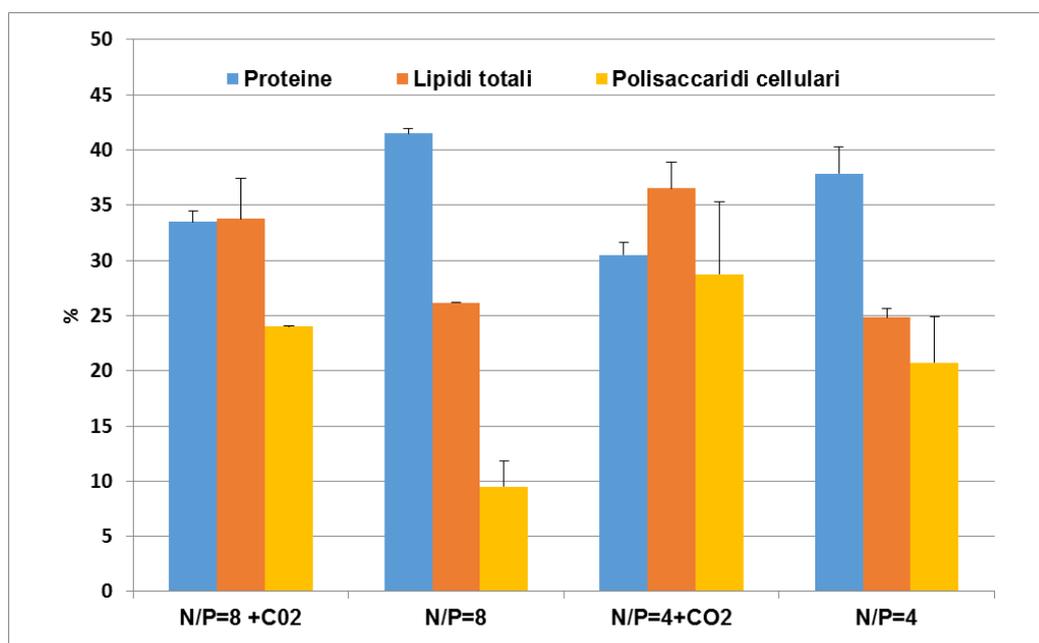


Figura 24. Composizione cellulare di *P. tricornutum* al giorno della raccolta (g.17) nelle diverse condizioni sperimentali

Per quanto riguarda la componente lipidica e polisaccaridica i risultati ottenuti mostrano un andamento opposto a quello osservato per le proteine: in particolare, la somministrazione di CO<sub>2</sub> determina un incremento significativo (Anova,  $p < 0,05$ ) dei lipidi totali che passano dal 27% al 34% in N/P=8 e dal 25% al 36% in N/P=4. La

componente dei carboidrati cellulari aumenta anch'essa in seguito al trattamento con CO<sub>2</sub>: in N/P=8 si osserva un aumento significativo (Anova, p< 0,05) dal 9,5 % al 24% (incremento del 60%), mentre in N/P=4 l'incremento osservato, dal 21% al 29% non risulta significativo (Anova, p> 0,05). In questa condizione tuttavia, otteniamo il valore più alto sia di lipidi totali che di carboidrati per cellula.

In generale la condizione N/P=4 trattata con CO<sub>2</sub> mostra valori più elevati di biomassa, sia in termini di numero di cellule che di peso secco (tabella 4), e la maggiore percentuale di lipidi totali e di polisaccaridi per cellula mentre il contenuto proteico risulta inferiore (figura 24). Possiamo confrontare questo dato con quanto osservato nello studio di Chauton et al., (2013) che evidenzia che una maggiore frazione di carbonio viene accumulata nei carboidrati e nei lipidi quando l'azoto diventa limitante per la cellula. Dai profili ottenuti del contenuto di N per cellula (figura 22.b) si osserva infatti che la condizione N/P=4 con CO<sub>2</sub> mostra il valore più basso di azoto (1,2 pg/cell) in fase stazionaria al giorno della raccolta della biomassa, rispetto a tutte le altre condizioni, oltre ad avere il più alto rapporto molare C/N e un valore relativamente basso del rapporto N/P (tabella 6). Da questi dati possiamo ipotizzare che nelle colture N/P=4 insufflate con CO<sub>2</sub>, in fase stazionaria si sia instaurata una condizione con una maggiore limitazione di azoto rispetto alle altre, che ha portato ad un maggiore accumulo di lipidi e polisaccaridi (figura 24). La totale deplezione dell'azoto in uno studio di Mus et al., (2013) evidenzia, inoltre un ulteriore spostamento della composizione cellulare verso un maggiore accumulo dei lipidi totali a discapito della componente polisaccaridica, questo dato è emerso anche in uno studio precedente (Casciaro, tesi di laurea 2015) dove si evidenzia che i carboidrati vengono accumulati maggiormente dalla cellula di *P. tricornutum* nella prima fase di crescita stazionaria, per diminuire nelle fasi successive a favore della componente lipidica quando aumenta la limitazione da azoto.

	C/N	C/P	N/P
<b>N/P=8 (+CO<sub>2</sub>)</b>	14	72	5
<b>N/P=8 (Controllo)</b>	7	41	5
<b>N/P=4 (+CO<sub>2</sub>)</b>	17	48	3
<b>N/P=4 (Controllo)</b>	7	18	2

Tabella 6. Rapporti molari fra i principali macronutrienti nelle cellule di *P.tricornutum* al giorno della raccolta (g.17)

In generale nelle condizioni in cui abbiamo una maggiore percentuale di proteine si osserva un rapporto molare C/N simile al rapporto valore teorico 6,6 di Redfield, nelle condizioni dove vengono favorite le componenti ricche di carbonio (lipidi e polisaccaridi) ritroviamo un rapporto molare C/N più alto come riportato in tabella 6.

In questo studio è stata determinata inoltre la percentuale di acidi grassi sui lipidi totali e la loro composizione quali-quantitativa nelle quattro condizioni sperimentali.

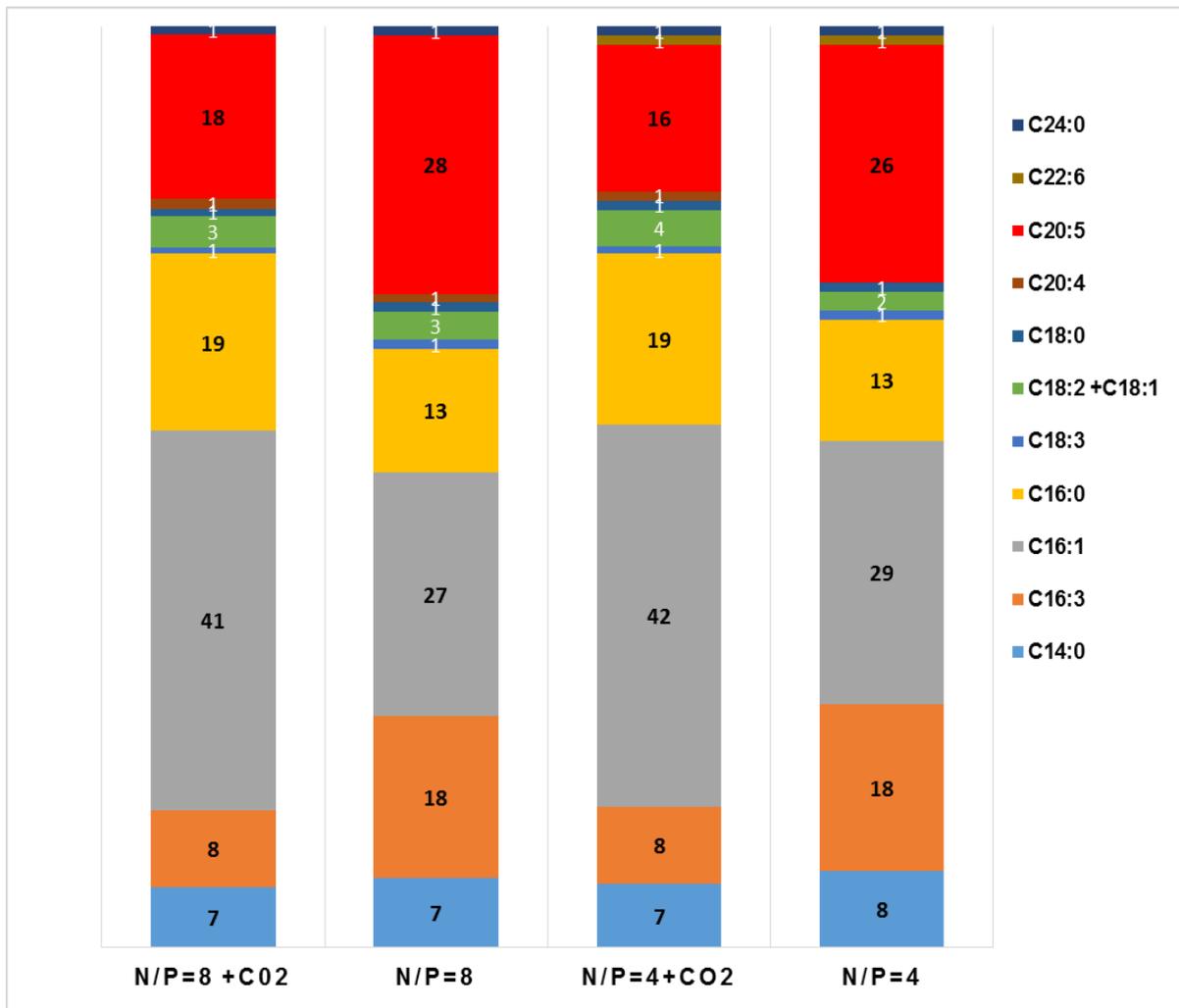


Figura 25. Acidi grassi in %: C14:0 acido miristico, C16:3 acido esadecatrienoico, C16:1 acido palmitoleico, C16:0 acido palmitico, C18:3 acido  $\alpha$ -linoleico, C18:2 acido linoleico, C18:1 acido oleico, C18:0 acido stearico, C20:4 acido arachidonico, C20:5 acido eicosapentaenoico (EPA), C22:6 acido docosaesaenoico (DHA), C24:0 acido tetracosanoico

La composizione percentuale delle frazioni più abbondanti degli acidi grassi nei diversi trattamenti sperimentali è mostrata in figura 25. Gli acidi grassi presenti in quantità maggiore risultano essere: l'acido palmitoleico (C16:1) con il valore più alto osservato, pari al 40% sul totale degli acidi grassi totali (TFA) in presenza di CO<sub>2</sub>, che si riduce al 28% nei controlli; l'acido palmitico (C16:0) con valori del 13% nei

controlli, che aumentano in seguito al trattamento di CO<sub>2</sub> fino al 19%; l'acido eicosapentaenoico EPA (C20:5) che passa da valori di circa il 27% riscontrati nei controlli al 17% in presenza di CO<sub>2</sub>; lo stesso comportamento lo osserviamo anche per quanto riguarda l'acido esadecatrienoico (C16:3) che, da valori del 18% nei controlli si riduce all'8% nelle condizioni in cui è stata somministrata la CO<sub>2</sub>. In generale possiamo osservare che la somministrazione di CO<sub>2</sub> nelle colture di *P. tricornutum* determina prevalentemente un incremento delle frazioni degli acidi grassi saturi e monoinsaturi, mentre si riducono le frazioni a lunga catena polinsaturi come l'EPA e fra le componenti a catena più corte quelle con il maggiore grado di insaturazione. L'incremento delle frazioni di C16:0 e di C16:1 e una diminuzione di C16:3 e di C20:5 (EPA) osservata in *P. tricornutum*, è riportata anche nel lavoro di Peng et al., (2014) quando l'alga viene coltivata in condizioni di CO<sub>2</sub> non limitante. Gli autori suggeriscono che questo cambiamento nella composizione degli acidi grassi derivi da uno spostamento del metabolismo lipidico nella cellula, che si verifica in condizioni di limitazione di nutrienti in presenza di CO<sub>2</sub>, determinando un accumulo di triacilglicerolo; l'instaurarsi di questa condizione consente di ottenere una biomassa algale utile per la produzione di bio-olio.

Dai nostri dati emerge che la maggiore produzione di EPA in percentuale sugli acidi grassi totali, si ottiene nelle condizioni di controllo (figura 25), mentre la somministrazione di CO<sub>2</sub> che determina un incremento degli acidi grassi totali fa diminuire la percentuale di EPA (tabella 7); questo risultato è stato ottenuto anche dalle ricerche di Chrismadha e Borowitzka (1994) e dallo studio di Yongmanitchai e Ward (1991) che evidenzia come le colture di *P. tricornutum* insufflate ad una concentrazione elevata di CO<sub>2</sub> pari a 5 mg/L accumulano la percentuale più elevata di acidi grassi sul peso secco, al contrario in assenza o con un basso flusso di CO<sub>2</sub> gli acidi grassi totali diminuiscono mentre la frazione di EPA aumenta.

	% su Lipidi totali		% su DW	
	TFA	EPA	TFA	EPA
<b>N/P=8 (+CO<sub>2</sub>)</b>	40,2	17,5	13,5	2,4
<b>N/P=8 (Controllo)</b>	33,0	28,0	8,5	2,4
<b>N/P=4 (+CO<sub>2</sub>)</b>	36,1	16,0	11,0	1,7
<b>N/P=4 (Controllo)</b>	21,2	26,1	5,5	1,4

Tabella 7. Percentuale di TFA e EPA al giorno della raccolta (g.17) sui lipidi totale e sul peso secco (DW)

Il contenuto più basso di EPA sui lipidi totali si osserva nella condizione N/P=4 in presenza di CO<sub>2</sub>, caratterizzata dalla maggiore limitazione di azoto. Questo dato è in accordo con i risultati di Qiao et al.,(2015) che mostrano come la carenza di azoto determini in generale un incremento degli acidi grassi totali e al loro interno, un incremento maggiore gli acidi grassi saturi fra i quali il C16:0 e monoinsaturi fra i quali il C16:1 e, una diminuzione degli acidi grassi polinsaturi (PUFAs) fra i quali l'EPA. In tabella 8 sono mostrati i dati del produzione totale di EPA su litro di coltura; possiamo osservare che i valori più elevati si ottengono nelle colture insufflate con CO<sub>2</sub>, in particolare nella condizione N/P=8. Questo risultato si ottiene, nonostante la somministrazione di CO<sub>2</sub> determini una diminuzione percentuale di EPA su gli acidi grassi totali, poichè il valore di biomassa algale ottenuta in questa condizione al momento della raccolta è più elevato, è tale da influire maggiormente sulla quantità totale di EPA prodotto.

	DW (g/L)	EPA (mg/L)
<b>N/P=8 (+CO<sub>2</sub>)</b>	2,3	55,2
<b>N/P=8 (Controllo)</b>	1,7	39,8
<b>N/P=4 (+CO<sub>2</sub>)</b>	2,4	40,8
<b>N/P=4 (Controllo)</b>	1,3	18,2

Tabella 8. Produzione di EPA per litro di coltura al giorno della raccolta (g.17)

## **4.2 Crescita di *Phaeodactylum tricornutum* in colture batch in un *medium* costituito da un refluo industriale (digestato)**

La seconda parte della tesi è incentrata sulla valutazione della crescita di *P. tricornutum*, utilizzando come terreno di coltura un refluo industriale ricco di sostanze azotate ma con un rapporto molare N/P pari a 47 e valori di salinità del 15‰, inferiori rispetto a quelli dei terreni precedentemente impiegati (23‰). L'esperimento è stato condotto con le stesse condizioni di illuminazione, ciclo luce-buio e temperatura delle prove precedenti, valutando la differenza fra una condizione in cui è stata insufflata solamente aria e una condizione a cui è stata somministrata per 10 minuti al giorno una concentrazione di 1mg/L di CO<sub>2</sub>. La prova è stata effettuata per verificare l'eventuale tossicità del refluo e la possibilità di poterlo utilizzare tal quale come terreno di coltura per *P. tricornutum*, senza effettuare diluizioni con acqua o aggiungere elementi nutritivi qualora fossero limitanti per la crescita dell'alga. Le alghe sono state raccolte in fase di crescita stazionaria al giorno 14 quando i valori di biomassa ottenuti erano paragonabili a quelli delle prove precedenti; la biomassa algale è stata analizzata in termini di composizione percentuale di proteine, polisaccaridi lipidi e acidi grassi per confrontarla con i dati ottenuti negli esperimenti condotti nella prima fase della tesi in condizioni nutrizionali note.

### **4.2.1 Andamento della crescita**

La crescita di *P. tricornutum*, in questa seconda fase è stata valutata, sia attraverso il conteggio delle cellule al microscopio ottico rovesciato da campioni di sospensione algale prelevati giornalmente ed opportunamente diluiti, che attraverso la valutazione della torbidità. Nei grafici in figura 26 e 27 possiamo osservare che le alghe mostrano una fase di crescita simile durante i primi giorni, mentre a partire dal giorno 4 la crescita si differenzia e risulta significativamente maggiore (Anova,  $p < 0,05$ ) per la coltura trattata con CO<sub>2</sub> rispetto al controllo. Si può osservare una minima differenza per quanto riguarda la velocità di crescita fra le due condizioni, mentre il numero di cellule ottenuto il giorno della raccolta (g.14) è maggiore nella coltura trattata con CO<sub>2</sub> di circa il 40% (tabella 9; figura 27).

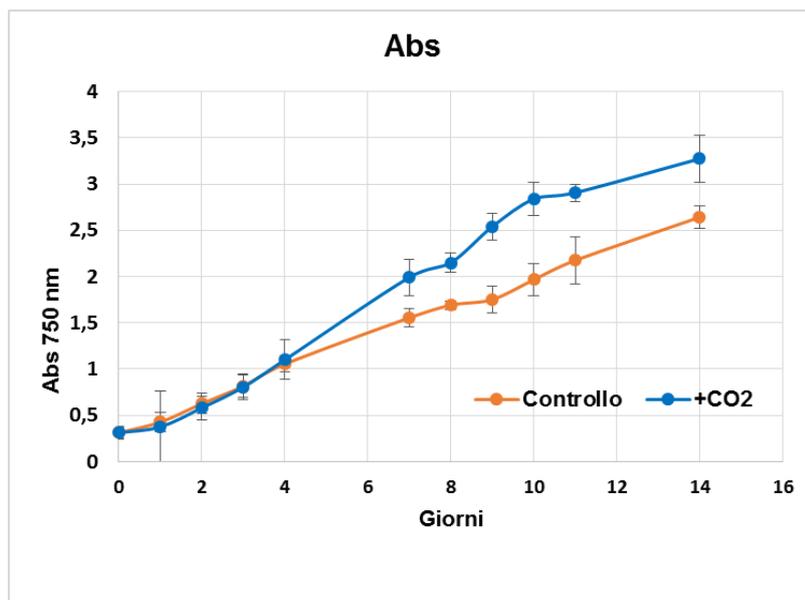


Figura 26. Variazione della torbidità in colture di *P. tricornutum* in un refluo industriale

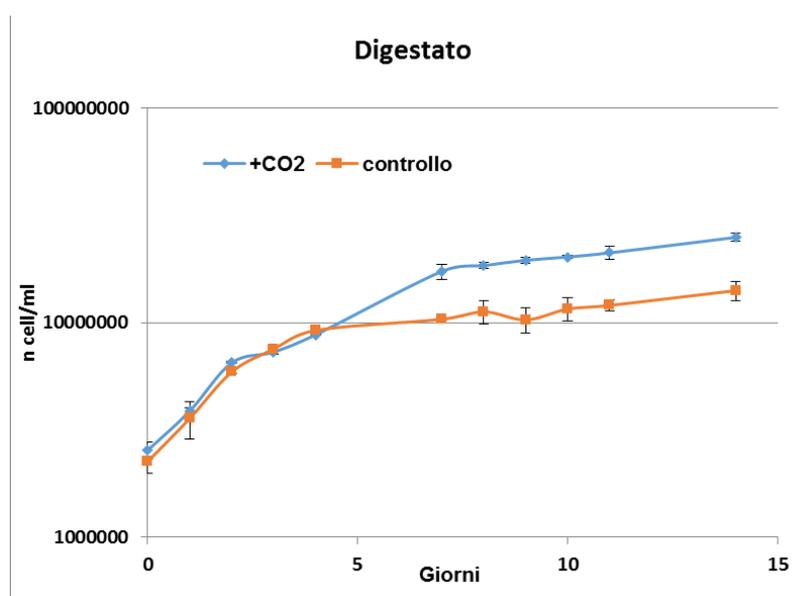


Figura 27. Curve di crescita di *P. tricornutum* in un refluo industriale

Digestato			
	$\mu$ (g <sup>-1</sup> )	yield (n cell/ml)	DW (g/L)
Digestato (+CO <sub>2</sub> )	0,470	25029840	2,7
Digestato (Controllo)	0,480	14131680	2,1

Tabella 9 Valori di velocità di crescita e di peso secco (DW) al giorno della raccolta

La crescita di *P. tricornutum* in un terreno di coltura costituito da questo tipo di refluo industriale non risulta inibita rispetto alle condizioni nutrizionali normalmente

utilizzate per la sua coltivazione, evidenziando che non solo questo liquido non è tossico per l'alga ma che ne favorisce la crescita, in quanto il valore di biomassa ottenuto nell'unità di tempo è maggiore rispetto ai valori ottenuti nelle colture effettuate nella prima fase della tesi.

#### 4.2.2 Consumo dei nutrienti

Nella composizione del digestato utilizzato per la coltivazione di *P. tricornutum*, l'azoto è presente in maggior quantità come nitrato (N-NO<sub>3</sub> 38 mg/L), e in minima parte sotto forma di N-NO<sub>2</sub> e N-NH<sub>4</sub> in concentrazioni rispettivamente di 1,2 e 0,64 mg/L. Le curve relative al consumo dei nutrienti (figura 28 a,b,c) mostrano che le alghe utilizzano più velocemente l'N-NH<sub>4</sub> in maniera simile in entrambe le condizioni mentre le altre forme azotate, in particolare il nitrato, vengono assorbite completamente solo nelle colture trattate con CO<sub>2</sub>. La concentrazione del fosforo nel digestato è molto bassa pertanto questo elemento viene assorbito completamente già dopo pochi giorni (figura 29), nel controllo dopo 3 giorni e nella condizione trattata con la CO<sub>2</sub> dopo 7 giorni.

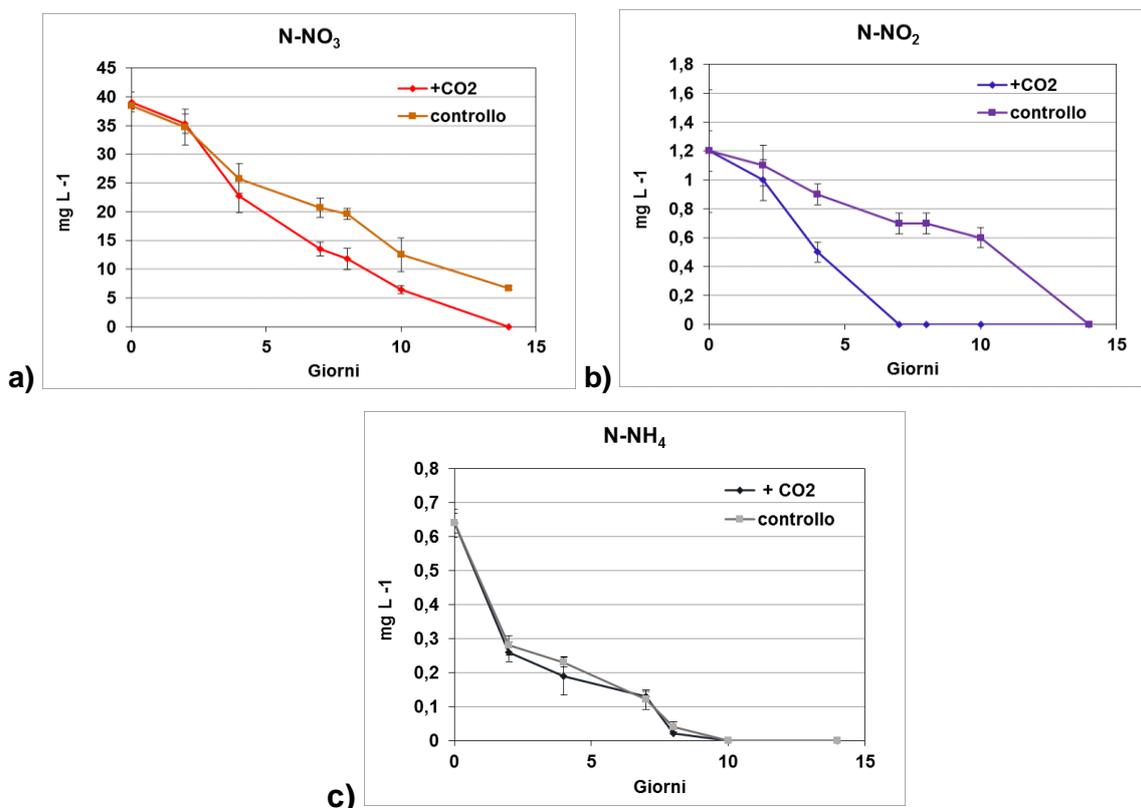


Figura 28. Variazione del contenuto di: a) N-NO<sub>3</sub>; b) N-NO<sub>2</sub>; c) N-NH<sub>4</sub> nel digestato durante la crescita di *P.tricornutum*

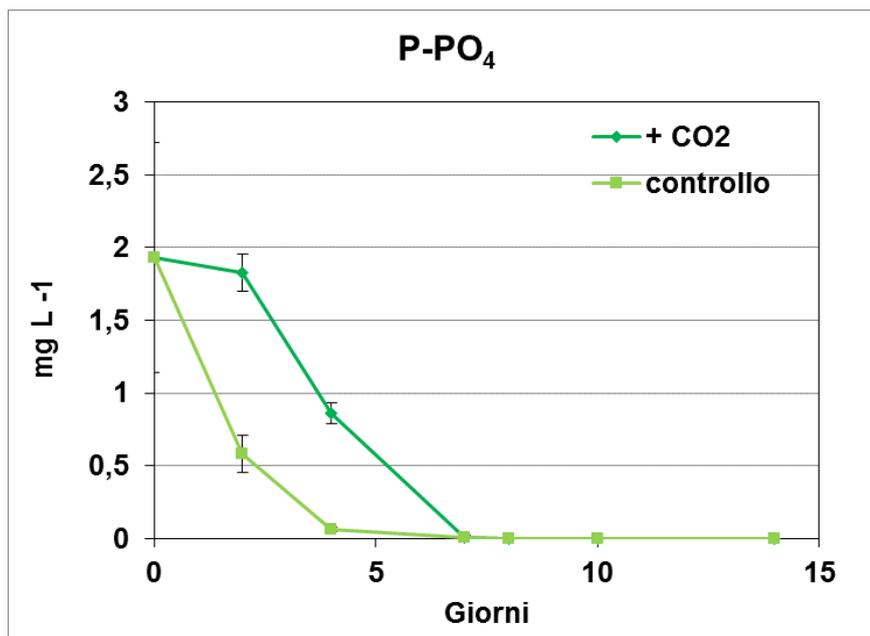


Figura 29. Variazione del contenuto di P-PO<sub>3</sub> nel digestato durante la crescita di *P.tricornutum*

In tabella 10 sono riportati i valori della velocità di *uptake* di N e P, notiamo che la somministrazione di CO<sub>2</sub> incrementa significativamente la velocità di *uptake* del nitrato (Anova,  $p < 0,05$ ), mentre fa diminuire la velocità di *uptake* del fosforo (Anova,  $p < 0,05$ ).

Da questi dati emerge che *P. tricornutum* ha una buona capacità di rimozione dei nutrienti nel refluo impiegato per la sua coltivazione, è in grado di assorbire l'azoto presente in tutte le sue forme e la velocità di *uptake* per il nitrato aumenta in seguito al trattamento con la CO<sub>2</sub>. L'elevato rapporto molare N/P che riscontriamo inizialmente nel digestato che deriva da un basso contenuto di fosforo, inoltre non determina nessuna inibizione della crescita evidenziando che questo elemento non è limitante, almeno fino al giorno in cui è stata raccolta la biomassa (giorno 14).

	U (pmol cell <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	
	N-NO <sub>3</sub>	P
Digestato (+CO <sub>2</sub> )	64,0	0,8
Digestato (Controllo)	52,0	1,5

Tabella 10. Velocità massima di *uptake* di N e P

### 4.2.3 Composizione elementare

Durante questa seconda fase dell'esperimento sono stati analizzati i contenuti di C, N e P. La figura 30 a, b e c mostra l'andamento degli elementi per unità di volume; il profilo del carbonio (figura 30.a) segue l'andamento della crescita; il profilo di azoto (figura 30.b) aumenta fino al giorno 10 della crescita per poi mantenersi costante fino al giorno della raccolta (g.14) con la somministrazione di CO<sub>2</sub>, mentre nel controllo possiamo osservare che l'andamento si mantiene lineare fino al giorno della raccolta. Il contenuto iniziale di fosforo nel digestato, è sensibilmente inferiore rispetto ai quantitativi utilizzati nelle colture effettuate nella prima fase sperimentale, questo elemento (figura 30.c) anche in questa condizione viene assorbito più velocemente nel controllo, durante i primi due giorni della crescita e la sua concentrazione per unità di volume rimane costante fino al giorno della raccolta.

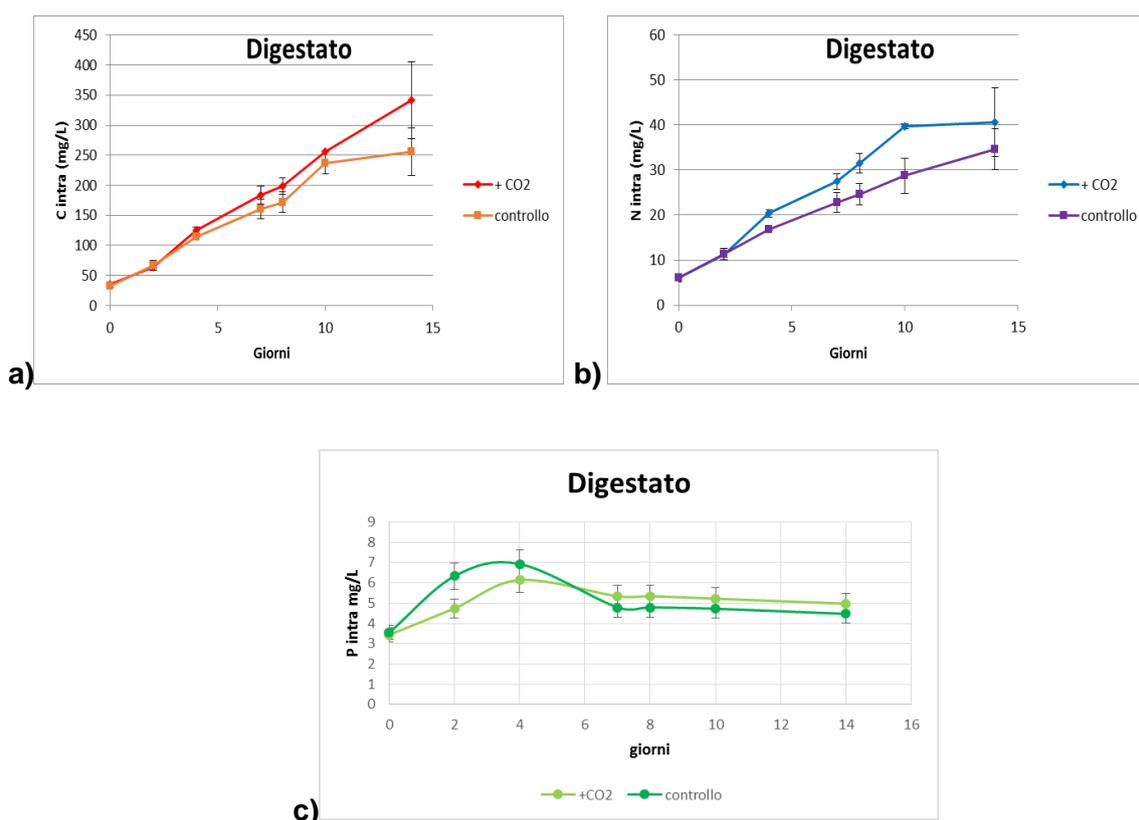


Figura 30. Contenuto intracellulare di: a) **C**; b) **N**; c) **P**, espressi per unità di volume

Dal profilo del contenuto di carbonio per cellula (figura 31.a) possiamo osservare che nella coltura trattata con CO<sub>2</sub> questo elemento aumenta nelle cellule fino al giorno 7 poi diminuisce fino al giorno 10 per rimanere costante fino al momento della raccolta; nel controllo invece, il contenuto di carbonio per cellula tende ad incrementare

moderatamente in fase stazionaria fino al giorno della raccolta. Un andamento simile si può osservare anche per quanto riguarda il contenuto di azoto per cellula (figura 31.b). Il fosforo intracellulare presenta valori più elevati nel controllo rispetto alla condizione trattata con CO<sub>2</sub> fino al giorno 4, poi il suo contenuto diminuisce progressivamente in entrambe le condizioni in fase stazionaria fino al momento della raccolta, dove i valori misurati sono vicini allo 0; entrambe le colture si trovano pertanto in una condizione di limitazione di P, come dimostrato dai valori molto più alti del rapporto C/P rispetto a quello teorico di Readfield (figura 31.c, tabella 11); la crescita di *P. tricornutum* e i valori di biomassa ottenuti al giorno della raccolta però, non sembrano essere particolarmente influenzati da questa carenza e la differenza nella velocità di crescita fra le due condizioni dipende principalmente dalla somministrazione della CO<sub>2</sub>.

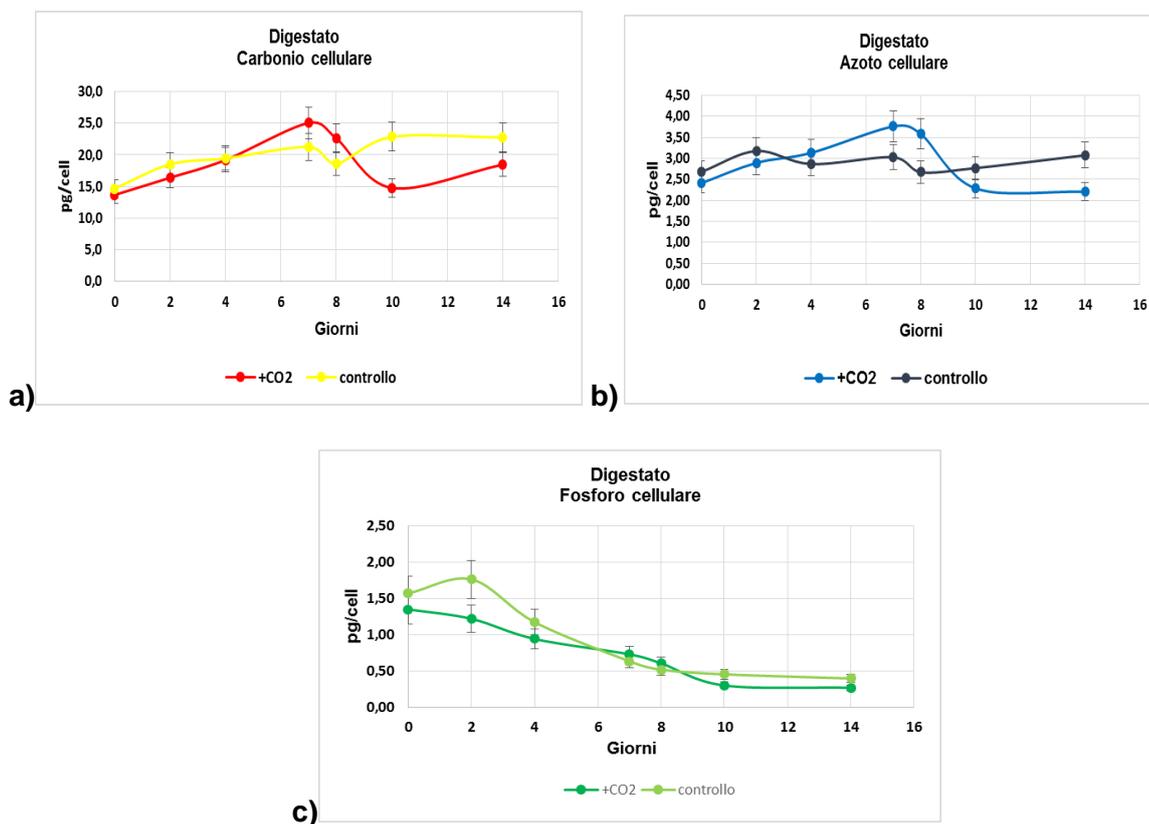


Figura 31. Contenuto cellulare di: a) C; b) N e c) P in pg\*cell<sup>-1</sup>

	C/N	C/P	N/P
<b>Digestato (+CO<sub>2</sub>)</b>	10	177	18
<b>Digestato (Controllo)</b>	9	148	17

Tabella 11. Rapporti molari fra i principali macronutrienti al giorno della raccolta (g14)

#### 4.2.4 Composizione cellulare

La composizione della biomassa algale raccolta in fase stazionaria al giorno 14, analizzata in questa seconda fase dell'esperimento risulta diversa da quella mostrata nella prima fase. Il contenuto di proteine per cellula (figura 32) presenta valori intorno al 40% ed è simile in entrambe le colture effettuate con il digestato, contrariamente a quanto osservato nelle condizioni precedenti dove si osservava una diminuzione di tale percentuale nelle colture trattate con CO<sub>2</sub>. Nelle colture effettuate con il digestato il contenuto proteico per cellula in fase stazionaria al giorno della raccolta, rimane elevato anche dopo il trattamento con CO<sub>2</sub> probabilmente a causa della maggiore concentrazione di azoto iniziale; questo dato è confermato anche dai valori più alti del contenuto di azoto per cellula (figura 31.b), rispetto ai valori riscontrati nelle prove precedenti. Il contenuto cellulare di lipidi è significativamente maggiore (Anova  $p < 0,05$ ) nelle colture trattate con la CO<sub>2</sub> rispetto ai controlli, in accordo con i dati ottenuti nelle prove precedenti e con il valore più alto del rapporto C/N riscontrato in questa condizione; per quanto riguarda la percentuale di polisaccaridi con la somministrazione di CO<sub>2</sub> si osserva un aumento che non risulta però significativo (Anova  $p > 0,05$ ) (figura 32).

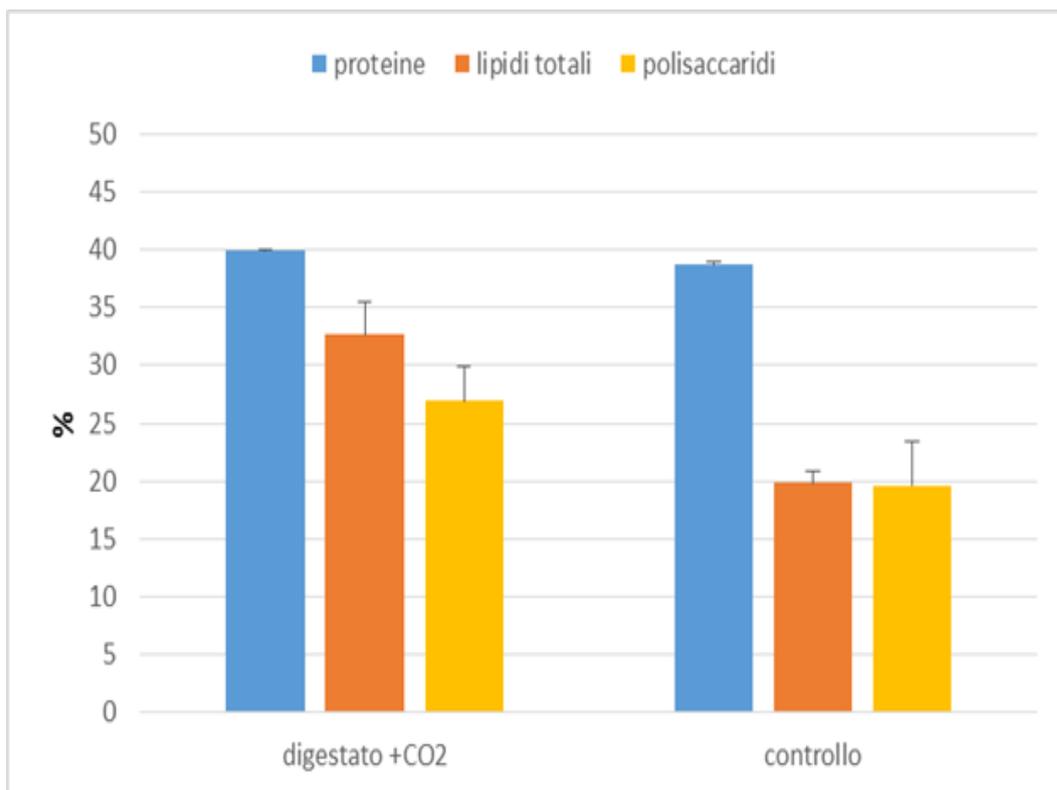


Figura 32. Composizione cellulare di *P. tricornutum* al giorno della raccolta (g.14)

La percentuale della frazione degli acidi grassi sui lipidi totali nelle prove effettuate in precedenza (tabella 7), aumentava in seguito alla somministrazione di CO<sub>2</sub>; in questa prova invece, osserviamo che i contenuti sono molto simili in entrambe le condizioni, con valori intorno al 40%, le differenze osservate mostrate in tabella 12 non sono risultate significative (Anova  $p > 0,05$ ).

	% su Lipidi totali		% su DW	
	TFA	EPA	TFA	EPA
<b>Digestato (+CO<sub>2</sub>)</b>	37,5	27,5	12,0	3,4
<b>Digestato (Controllo)</b>	42,0	24,0	8,0	1,9

Tabella 12. Percentuale di TFA e EPA al giorno della raccolta (g.14) sui lipidi totale e sul peso secco (DW)

La figura 33 mostra la composizione percentuale delle frazioni più abbondanti degli acidi grassi. Gli acidi grassi presenti in quantità maggiore risultano essere: l'acido palmitoleico (C16:1), che diminuisce in seguito alla somministrazione di CO<sub>2</sub> passando dal 28% al 16% sul totale degli acidi grassi andamento questo, che è in contrasto con quanto osservato nelle prove precedenti dove in entrambe le condizioni nutrizionali la somministrazione di CO<sub>2</sub> determina un incremento significativo di questo composto; l'acido palmitico (C16:0) è l'altra componente più abbondante e aumenta significativamente passando dal 14% al 38% (Anova p<0,05) in seguito alla somministrazione di CO<sub>2</sub>; l'EPA (C20:5) è presente con una percentuale del 24% nel controllo, valore che aumenta al 28% in presenza di CO<sub>2</sub>. Anche questo dato non è in accordo con quanto osservato nel profilo delle prove precedenti dove il trattamento con CO<sub>2</sub> faceva diminuire la % di EPA presente.

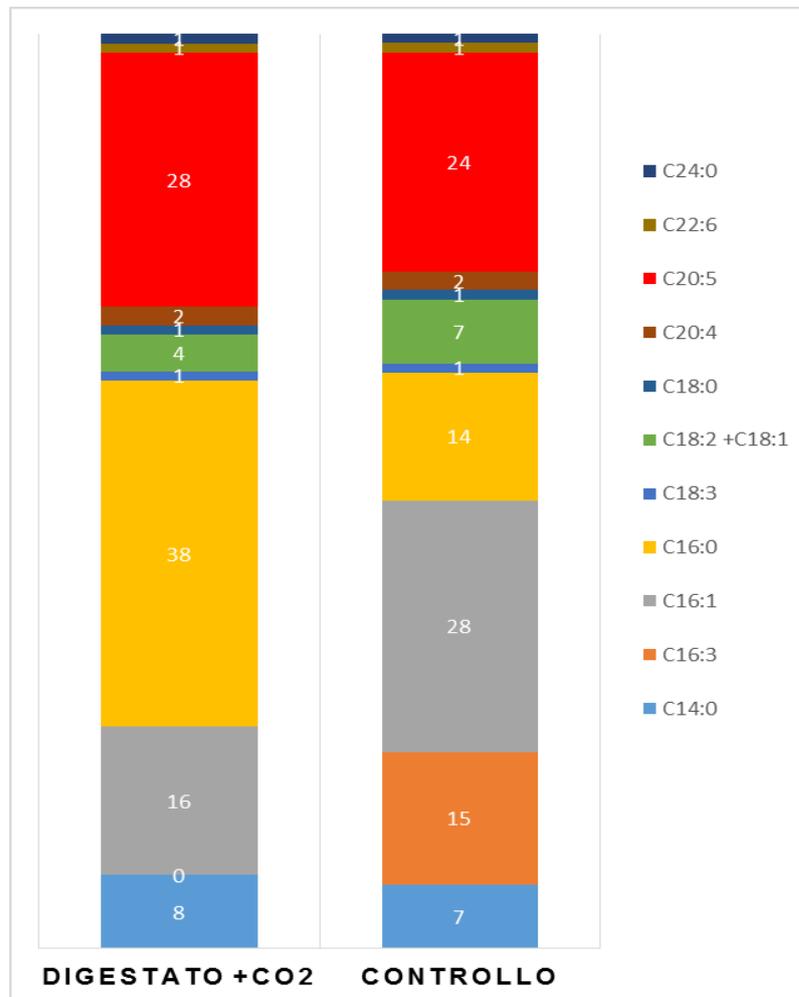


Figura 33. Acidi grassi in %: C14:0 acido miristico, C16:3 acido esadecatrienoico, C16:1 acido palmitoleico, C16:0 acido palmitico, C18:3 acido  $\alpha$ -linoleico, C18:2 acido linoleico, C18:1 acido oleico, C18:0 acido stearico, C20:4 acido arachidonico, C20:5 acido eicosapentaenoico (EPA), C22:6 acido docosaesaenoico (DHA), C24:0 acido tetracosanoico

Dal confronto di questi dati con quelli ottenuti nella prima fase sperimentale possiamo osservare che le differenze nel profilo degli acidi grassi potrebbero dipendere da alcune caratteristiche chimico fisiche del digestato. In primo luogo possiamo considerare l'effetto della minore salinità (15‰) rispetto a quella dei terreni di coltura utilizzati nelle prove precedenti (23‰), sulla produzione e composizione dei lipidi, da alcuni dati in letteratura emerge che la diminuzione della salinità in diverse microalghe determina un incremento del contenuto proteico nelle cellule algali, fa diminuire il contenuto totale di acidi grassi mentre determina un incremento percentuale di EPA sul totale degli acidi grassi (Yongmanitchai e Ward, 1991; Gu et al., 2012). Anche la carenza di fosforo che si è instaurata nelle nostre colture, in particolare nella condizione trattata con CO<sub>2</sub>, potrebbe determinare un cambiamento nel profilo degli acidi grassi rispetto alle condizioni precedenti. I dati di Valenzuela et al., 2012, mostrano che la carenza di P è il primo segnale che innesca un incremento della produzione di lipidi da parte della cellula, ma è la carenza di N che ne determina il maggiore accumulo portando però ad una minore sintesi di EPA come confermato dallo studio di Qiao et al., (2015), questa condizione non si verifica nelle colture con il digestato in quanto al momento della raccolta non si osserva alcuna limitazione da N come mostrato dai profili del contenuto di azoto cellulare (figura 31.b). Questo dato potrebbe spiegare la percentuale più elevata di EPA ottenuta nelle alghe coltivate con il digestato in presenza di CO<sub>2</sub> rispetto alle percentuali ottenute nei terreni di coltura.

	DW (g/L)	EPA (mg/L)
<b>Digestato (+CO<sub>2</sub>)</b>	2,7	90,7
<b>Digestato (Controllo)</b>	2,1	40,7

Tabella 13. Produzione di EPA per litro di coltura al giorno della raccolta (g.14)

In tabella 13 sono mostrati i dati della produzione totale di EPA su litro di coltura. Possiamo osservare che il valore più elevato (90,7 mg/L) si ottiene nelle colture insufflate con CO<sub>2</sub>. Questo dato inoltre è risultato significativamente maggiore se confrontato con il valore più alto osservato nelle prove precedenti (54,2 mg/L) indicando che la coltivazione di *P. tricornutum* utilizzando un refluo industriale con questa composizione porta ad una buona produzione di EPA.

## 5 CONCLUSIONI

La prima parte del lavoro di questa tesi è inserita all'interno di un progetto che prevede l'utilizzo della CO<sub>2</sub> recuperata dai processi di biodigestione, nella coltivazione delle microalghe. Il lavoro da me svolto nella prima fase sperimentale, ha previsto l'utilizzo di CO<sub>2</sub> commerciale nella coltivazione di *P. tricornutum* per porre le basi per un confronto futuro dei vari parametri analizzati qualora la coltivazione di tale alga venga effettuata utilizzando la CO<sub>2</sub> di recupero.

L'obiettivo del lavoro di tesi nella prima fase sperimentale, è stato quello di valutare come l'effetto della somministrazione di CO<sub>2</sub>, a basse concentrazioni, potesse influenzare la crescita e la composizione biochimica di *P. tricornutum* coltivata in diverse condizioni nutrizionali ottenute variando il rapporto fra azoto e fosforo.

Dalle analisi effettuate è emerso che la CO<sub>2</sub>, somministrata ad una concentrazioni pari a 1mg/L al giorno, è sufficiente a stimolare la crescita dell'alga in entrambe le condizioni sperimentali. La condizione nutrizionale con N/P=4 in particolare, è quella che presenta al momento della raccolta il maggiore numero di cellule e il maggiore peso secco. Questo risultato è interessante in un contesto di coltivazione di quest'alga su larga scala, al fine di ottenere un'elevata biomassa a costi inferiori.

La somministrazione di CO<sub>2</sub> influenza in maniera differente la composizione cellulare di *P. tricornutum*; in particolare, determina in concomitanza dell'instaurarsi di una limitazione di azoto, una diminuzione significativa della componente proteica, e un incremento delle componenti lipidica e polisaccaridica; al contrario il maggiore contenuto proteico si riscontra nelle condizioni non trattate con CO<sub>2</sub>.

Focalizzando l'attenzione sulla ottimizzazione della produzione di acidi grassi polinsaturi i risultati ottenuti però, mostrano che in entrambe le condizioni nutrizionali in presenza di CO<sub>2</sub> si osserva un maggiore contenuto di lipidi totali, ma la percentuale di PUFAs e in particolare di EPA diminuisce a favore delle componenti sature e monoinsature. La diminuzione di EPA osservata però, viene compensata dalla maggiore biomassa ottenuta in entrambe le condizioni che porta in termini di unità di volume, ad una maggiore produzione finale di questa molecola.

Per quanto riguarda il contenuto di polisaccaridi cellulari, l'aumento osservato in presenza di CO<sub>2</sub>, in questa fase di crescita dell'alga è inferiore rispetto all'incremento osservato per la componente lipidica in entrambe le condizioni nutrizionali. Da studi

precedenti, è noto infatti, che la componente polisaccaridica intracellulare in *P. tricornutum* aumenta nella prima fase di crescita stazionaria in colture “batch” per diminuire successivamente all’aumentare della carenza di azoto a favore della componente lipidica.

La seconda parte del lavoro di tesi si è incentrata sulla valutazione del possibile utilizzo di un digestato industriale nella coltivazione di *P. tricornutum*, in particolare si è voluta verificare la capacità dell’alga di depurare tale refluo rimuovendo le varie componenti nutrizionali in esso presenti.

I risultati ottenuti mostrano che *P. tricornutum* è in grado di rimuovere totalmente i nutrienti presenti nel digestato e che la somministrazione della CO<sub>2</sub> alla medesima concentrazione delle prove precedenti determina sia una maggiore velocità di assorbimento dell’azoto che un incremento della velocità di crescita dell’alga ottenendo così un valore più elevato di biomassa.

La composizione cellulare di *P. tricornutum* coltivata con questo refluo presenta delle differenze rispetto a quanto osservato nelle prove precedenti in particolare, il contenuto di proteine per cellula non diminuisce nella coltura trattata con CO<sub>2</sub>; questo risultato potrebbe dipendere dal contenuto ancora alto di azoto cellulare che riscontriamo in questa fase della crescita dell’alga in cui è stata effettuata la raccolta della biomassa. Il trattamento con la CO<sub>2</sub> inoltre determina un aumento dei lipidi totali, come osservato nelle condizioni della prima fase sperimentale, ma non si osserva una concomitante diminuzione della frazione degli acidi grassi polinsaturi, e in particolare di EPA; pertanto la produzione di questo composto per unità di volume nelle colture con il digestato presenta valori maggiori del 40% se confrontata con il valore più alto ottenuto nelle prove precedenti. Questo risultato potrebbe essere una conseguenza del fatto che la biomassa algale in queste prove è stata raccolta in una fase iniziale di crescita stazionaria, dove non si è ancora instaurata una condizione di limitazione di azoto. Questi risultati preliminari suggeriscono di effettuare studi più approfonditi sulla composizione cellulare di *P. tricornutum* cresciuta in questo refluo industriale effettuando la raccolta delle alghe in diversi momenti della crescita, poiché è noto che la sintesi e l’accumulo delle varie componenti cellulari avviene in maniera diversa passando dalla fase di crescita esponenziale senza limitazione di nutrienti alla fase stazionaria.

I risultati ottenuti in questa seconda fase sperimentale ci danno buone indicazioni per proporre l'utilizzo di questo tipo di refluo industriale come terreno di coltura per *P. tricornutum*, in quanto i valori di biomassa ottenuti nell'unità di tempo sono più elevati se paragonati a quelli che si ottengono da un normale terreno di coltura, inoltre la particolare composizione chimica di questo refluo permette di ottimizzare la produzione di EPA per cellula effettuando la raccolta della biomassa in un momento di crescita dell'alga in cui non si sia instaurata una condizione di limitazione di azoto.

In generale sulla base dei risultati ottenuti in questo studio possiamo concludere che nell'ottica di produrre biomassa algale a basso costo, nella coltivazione della diatomea *P. tricornutum* si potrebbe utilizzare la CO<sub>2</sub> recuperata dai processi di biodigestione, che normalmente viene immessa in atmosfera, e alcuni tipi di reflui industriali contenenti elementi nutritivi per le alghe, riducendo così i costi sull'uso dei sali normalmente impiegati nei terreni di coltura.



## 6 BIBLIOGRAFIA

- **Alekseeva S.A, Shevchenko N.M, Kusaykin M.I, Ponomorenko L.P, Isakov V.V, Zvyagintseva T.N, and Likhoshvai E.V, (2005).** Polysaccharides of diatoms occurring in Lake Baikal. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(2): 185–191
- **Amaro H.M, Barros R, Guedes C, Sousa-Pinto I, Malcata F.X, (2013).** Microalgal compounds modulate carcinogenesis in the gastrointestinal tract. *Trends in Biotechnology*, 31(2): 92–98
- **Amicarelli V, Paiano A, Lobefaro L, (2012).** Le microalghe nel settore dei biocombustibili. Sviluppo e sostenibilità: Studi & ricerca. Review & assessment papers. Università degli Studi di Bari. Dipartimento di Studi Aziendali e Giusprivatistici. Facoltà di Economia
- **APAT IRSA-CNR.** Manuali e linee guida 29/2003. Metodi analitici per le acque. Metodo 4020.
- **Atalha E, Hernandez Crus C.M, Izquierdo M.S, Rosenlund G, Caballero M.J, Valencia A, Robiana L, (2007).** Two microalgae *Cryptocodinium cohnii* and *Phaeodactylum tricornutum* as alternative source of essential fatty acids in starter feeds for seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 270 (2007) 178–185 [www.elsevier.com/locate/aqua-online](http://www.elsevier.com/locate/aqua-online)
- **Azov Y, (1982).** Effect of pH on Inorganic Carbon *Uptake* in Algal Cultures. *Applied and environmental microbiology*, June 1982, p 1300-1306
- **Barbato F, (2009).** Tecniche di Coltura di Microalghe. ENEA/TB04/01/2009 [www.enea.it](http://www.enea.it)
- **Barbato F, Campiotti C.A, Giagnacovo G, Pignatelli V, Tumminelli D, Viola C, Silva Diorato E, (2012).** Sfruttamento delle microalghe: tra realtà e prospettiva, n°26 Aprile 2012
- **Bartual A, Angel Galvez J, and Ojeda F, (2008).** Phenotypic response of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin to experimental changes in the inorganic carbon system. *Botanica Marina* 51 (2008): 350–359, 2008 by Walter de Gruyter Berlin New York. DOI 10.1515/BOT.2008.04
- **Beardall J., Johnston A. and Raven J.A. (1997).** Environmental regulation of CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism in microalgae. *Can. J. Bot.* 76: 1010–1017

- **Becker W.E, (2013).** Microalgae For Human and Animal Nutrition. Handbook of Microalga Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 461-496
- **Benavides Silva A.M, Torzillo G, Kopecky J, Masojidek J, (2013).** Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass and bioenergy* 54 (2013) 115-122
- **Bligh E.G, Dyer W.J, (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911–917.
- **Bojko M, Brzostowska K, Kuczyńska P, Latowski D, Olchawa-Pajor M, Krzeszowiec W, Waloszek A, and Strzałka K, (2013).** Temperature effect on growth, and selected parameters of *Phaeodactylum tricornutum* in batch cultures. Vol. 60, No 4/2013 861–864 on-line at: [www.actabp.pl](http://www.actabp.pl)
- **Casciaro V, (2015).** Effetto della carenza di azoto sulla crescita e composizione di *Phaeodactylum tricornutum*. Tesi di laurea in Botanica Marina Applicata. Università di Bologna
- **Chauton M.S, Olsen Y, Vadstein O, (2013).** Biomass production from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*: Nutrient stress and chemical composition in exponential fed-batch cultures. *Biomass and bioenergy* 58 (2013) 87-94
- **Chrismadha T, & Borowitzka M. A, (1994).** Effect of cell density and irradiance on growth, proximate composition and eicosapentaenoic acid production of *Phaeodactylum tricornutum* grown in a tubular photobioreactor. *Journal of Applied Phycology* 6: 67-74, 1994
- **Daboussi F, Leduc S, Marechal A, Dubois G, Guyot V, Perez-Michaut C, Amato A, Falciatore A, Juillerat A, Beurdeley M, Voytas D.F, Cavarec L, & Duchateau P, (2014).** Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology DOI: 10.1038/ncomms4831
- **Giuliano G, Demurtas O, Ferrante P, (2013).** Le microalghe come bio-fabbriche per composti ad elevato valore aggiunto. ENEA, Unità Tecnica Sviluppo Sostenibile ed Innovazione dei Sistemi Agro-Industriale. Speciale 1-2013. Biotecnologie per lo sviluppo sostenibile
- **Goossens K, (2012).** Engineering of Lipid Metabolism in the diatom *phaeodactylum tricornutum*. Master's dissertation submitted to obtain the

degree of Master of Biochemistry and Biotechnology Major Structural Biotechnology and Biochemistry Academic year 2011-2012

- **Grobbelaar J.U, (2013).** Inorganic Algal Nutrition. Handbook of Microalage Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 123-131
- **Guillard R.R.L, Ryther J.H, (1962)** Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* Cleve. *Gran. J. Microbiol* 8: 229-239
- **Gu N, Lin Q, Li G, Tan Y, Huang L, Lin J, (2012)** Effect of salinity on growth, biochemical composition, and lipid productivity of *Nannochloropsis oculata* CS 179 *Eng. Life Sci.* 12, 1–7
- **Hamilton M.L, Haslam R.P, Napier J.A, Sayanova O, (2014).** Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic Engineering* 22 (2014) 3–9. journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ymben](http://www.elsevier.com/locate/ymben)
- **Hu Qiang, (2013).** Environmental Effects on Cell Composition. Handbook of Microalage Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 114-119
- **ICRAM. 2001.** Ministero dell’Ambiente e della Tutela del Territorio. Servizio Difesa Mare. Programma di monitoraggio per il controllo dell’ambiente marino costiero (triennio 2001-2003). Metodologie analitiche di riferimento. Schede 4 (Ortofosfati), 5 (Nitriti) e 6 (Nitrati).
- **Jiang H, and Gao H, (2004).** Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*40, 651–654
- **Kim S.M, Jung Y, Kwon O., Cha K. H, Um B, Chung D, Pan C, (2012)** A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166: 1843-1855
- **Kulinsky Y, (2009).** The effects of nitrogen deprivation on the growth, oil yields and fatty acids production of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Nitzschia* sp. In laboratory cultures. [epubs@scu.edu.au](mailto:epubs@scu.edu.au).
- **Liu B.H, & Lee Y.K, (2000).** Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.* 12: 301-307.
- **Lowry O.H, Rosebrough N.J, Farr A.L, Randall R.J, (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.

- **Martino A. De, Meichenin A, Shi J, Pan KH, Bowler C, (2007).** Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) accessions. *Journal of Phycology*, 43: 992–1009
- **Molina Grima E, Garcia Camacho F, and Acien Fernandez F.G, (1999).** Production of EPA from *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Chemicals from Microalgae* (ed. Z. Cohen), pp 57-92. Taylor & Francis, London
- **Mostafa Soha S.M, (2012).** *Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications*, Plant Science, Dr. Nabin Kumar Dhal (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/53694. Available from: <http://www.intechopen.com/books/plant-science/microalgal-biotechnology-prospects-and-applications>
- **Mus F, Toussaint Jean-Paul, Cooksey K.E, Fields M.W, Gerlach R, Peyton B.M, Carlson R.P, (2013).** Physiological and molecular analysis of carbon source supplementation and pH stress-induced lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl Microbiol Biotechnol* (2013) 97:3625–3642
- **Myklestad S, Haug A, Larsen B, (1972).** Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt. II. Preliminary investigation of the Extracellular polysaccharide. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol* .9: 137–144.
- **Peng X, Shuo L, Zhang W, Zhao Y, Chen L, Wang H, Tianzhong L, (2014).** Triacylglycerol accumulation of *Phaeodactylum tricornutum* with different supply of inorganic carbon. *J Appl Phycol* (2014) 26:131–139
- **Qiao H, Cong C, Sun C, Li B, Wang J, Zhang L, (2015).** Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricornutum*. *Aquaculture* 452 (2016) 311–317
- **Radakovits R, Eduafo P.M, Posewitz M.C, (2011).** Genetic engineering of fatty acid chain length in *Phaeodactylum tricornutum*. *Metabolic Engineering* 13 (2011) 89–95
- **Thompson P.A, Guo M, & Harrison P.J, (1992).** Effects of temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 28: 481-488
- **Tomohito A, Kawaguchi A, and Yamada M, (1987).** Positional Distribution of Fatty Acids in lipids of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry*. Vol. 26, No 9 pp. 2573-2576, 1987

- **Tredici M.R (2006).** Colture massive di microalghe: calamità o risorsa? (da una lettura tenuta in occasione della giornata di studio dedicata a: “Coltura massiva delle microalghe: il contributo della scuola fiorentina” - Accademia deiGeorgofili, Firenze, 30.11.2006) [www.georgofili.it/uploaded/570.pdf](http://www.georgofili.it/uploaded/570.pdf)
- **Valenzuela J, Mazurie A, Carlson R.P, Gerlach R, Cooksey K.E, Peyton B.M, Fields M.W, (2012)** Potential role of multiple carbon fixation pathways during lipid accumulation in *Phaeodactylum tricornutum*. *Biotechnol Biofuels* 5:40
- **Volkman J.K, Brown M.R, (2013).** Nutritional value of microalgae and applications. *Handbook of Algal Cultures, Analogues of Blooms and Applications*, 407-444
- **Wu S, Huang A, Zhang B, Huan Li, Zhao P, Lin A, and Wang G, (2015).** Enzyme activity highlights the importance of the oxidative pentose phosphate pathway in lipid accumulation and growth of *Phaeodactylum tricornutum* under CO<sub>2</sub> concentration. *Biotechnology for Biofuels* (2015) 8:78
- **Yang Y, and Gao K, (2003).** Effetcs of CO<sub>2</sub> concentration on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology* 00:1–11, 2003
- **Yanqun Li, Horsman M, Nan Wu, and Christopher Q. Lan, Dubois-Calero N., (2008).** Biofuels from Microalgae. Articles: Biocatalysts and Bioreactor design. *Biotechnol. Prog.*2008, 24,815\_820
- **Yongmanitchai W and Ward O.P, (1991).** Growth of and Omega-3 Fatty Acid Production by *Phaeodactylum tricornutum* under Different Culture Conditions. *Applied and environmental microbiology*, Feb. 1991, p. 419-425
- **Zittelli G.C, Biondi N, Rodolfi L, Tredici M.R, (2013).** Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. *Handbook of Microalage Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 225-265

### Sitografia

- <http://www.arp.at.toscana.it/> Utilizzo agronomico del digestato: nuove norme n. 095 - Venerdì 13 Maggio 2016
- <https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/9780> Decreto Interministeriale n. 5046 del 25 Febbraio 2016