

**ALMA MATER STUDIORUM UNIVERSITÀ DI
BOLOGNA**

Scuola Di Scienze

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

**Crescita della diatomea *Phaeodactylum tricornutum*
in acque reflue da impianto di digestione anaerobica**

Tesi di Laurea in Botanica Marina Applicata

Relatrice

Prof.ssa Franca Guerrini

Correlatrice

Dott.ssa Matilde Mazzotti

Presentata da

Mara Simonazzi

II sessione

Anno accademico 2016/2017

Indice

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. Microalghe e loro impiego	1
1.2. Caratteristiche generali	1
1.3. Fattori ambientali che influenzano crescita e composizione biochimica delle microalghe.....	5
1.4. Implicazioni economiche nella coltivazione microalgale ed innovazioni delle tecniche di produzione	11
1.4.1. Principali sistemi di coltivazione	16
1.4.2. Composti di interesse commerciale e rispettive applicazioni	22
1.4.3. Il concetto di economia circolare: digestati come medium di coltura per le microalghe.....	25
1.4.3.1. Normativa vigente sull'impiego dei digestati.....	27
1.5. Generalità sulle diatomee (<i>Bacillariophyceae</i>)	30
1.5.1. <i>Phaeodactylum tricornutum</i> : inquadramento tassonomico ed impieghi.....	31
2. SCOPO DELLA RICERCA	35
3. MATERIALI E METODI.....	37
3.1. Disegno sperimentale e allestimento delle colture	37
3.1.1. Fase iniziale: crescita di <i>P. tricornutum</i> in colture <i>batch</i>	37
3.1.2. Fase di confronto: Crescita di <i>P. tricornutum</i> in PBR e in vasche.....	38
3.2. Terreno di coltura	41
3.2.1. Frazione di un digestato liquido (DEC)	41
3.2.2. Terreno sintetico F2 di Guillard e Ryther	41
3.3. Valutazione della crescita.....	42
3.3.1. Torbidità.....	42
3.3.2. Peso secco	43
3.3.2.1. Produttività volumetrica di biomassa	43
3.3.3. Conta cellulare.....	44
3.3.3.1. Tasso di crescita specifico	44
3.4. Misura dell'efficienza fotosintetica con fluorimetro PAM	45
3.5. Quantificazione del consumo dei nutrienti	47
3.5.1. Determinazione di anioni mediante cromatografia a scambio ionico con soppressione	47

3.5.2.	Velocità di uptake dei nutrienti	48
3.6.	Caratterizzazione della composizione cellulare	49
3.6.1.	Estrazione della frazione lipidica	49
3.6.1.1.	Determinazione degli acidi grassi totali (FAs) in GC-MS	49
3.6.2.	Estrazione della frazione polisaccaridica	50
3.6.2.1.	Determinazione dei polisaccaridi intracellulari	50
3.6.3.	Estrazione della frazione proteica	51
3.6.3.1.	Determinazione delle proteine totali.....	51
3.7.	Composizione elementare.....	52
3.7.1.	Determinazione di carbonio e azoto organici mediante analizzatore elementare CHNS-O	52
3.7.2.	Determinazione del fosforo intracellulare mediante metodo spettrofotometrico con reattivo molibdico	53
3.8.	Analisi statistiche.....	53
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE	54
4.1.	Crescita di <i>Phaeodactylum tricornutum</i> in colture <i>batch</i> con DEC sottoposte a due diversi regimi di CO ₂	54
4.1.1.	Valutazione della crescita e consumo dei nutrienti	54
4.1.2.	Valutazione dell'efficienza fotosintetica.....	58
4.1.3.	Composizione cellulare	61
4.2.	Sperimentazione su larga scala per la coltivazione di <i>P. tricornutum</i>	64
4.2.1.	Condizioni di crescita e parametri ambientali.....	64
4.2.2.	Crescita di <i>P. tricornutum</i> in PBR con terreno sintetico e con DEC	66
4.2.2.1.	Efficienza fotosintetica e consumo dei nutrienti	68
4.2.2.2.	Composizione elementare e caratterizzazione cellulare	71
4.2.3.	Crescita di <i>P. tricornutum</i> in vasche con una frazione di digestato liquido.....	74
4.2.3.1.	Efficienza fotosintetica e consumo dei nutrienti	76
4.2.3.2.	Composizione elementare e caratterizzazione cellulare	78
4.2.4.	Contaminazione delle colture nei sistemi di coltivazione su larga scala	81
5.	CONCLUSIONI.....	82
6.	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	84

1. INTRODUZIONE

1.1. Microalghe e loro impiego

Con il termine microalghe si intende un ampio raggruppamento di organismi unicellulari vegetali tipici di ambienti marini o dulciacquicoli, ma adattati anche ad habitat più estremi quali neve o sorgenti termofile. Globalmente si stima che esistano dalle 2×10^5 alle 8×10^5 specie e che solo una parte di esse sia effettivamente nota (Norton et al., 1996; Venkatesan et al., 2015b). Sebbene alcune fossero già impiegate come fonte di cibo fra le popolazioni antiche di Asia, Africa e Messico (Oncel et al., 2015), è solo con la venuta della crisi alimentare a seguito della seconda guerra mondiale che nasce un vero e proprio interesse nella loro coltivazione (Borowitzka and Moheimani, 2013). Le prime produzioni su scala industriale risalgono infatti agli anni '50 (Barros et al., 2017; Spolaore et al., 2006; Yusuf, 2007). Col progresso tecnologico e il sempre più crescente interesse nelle potenziali applicazioni di questi organismi, oggi si ricercano continuamente nuove metodiche per ottimizzare la produzione di alcune fra le specie oggetto di commercializzazione. Alcune microalghe vengono coltivate allo scopo di estrarre biomolecole ad alto valore aggiunto o HVABs, dall'inglese *High Value-Added Biomolecules*, a loro volta impiegate in diversi settori come quello farmaceutico o cosmetico (Amaro et al., 2013; Borowitzka, 2013; Chen et al., 2013; Coustets et al., 2015; De Jesus Raposo et al., 2013; Safafar et al., 2015; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2012), in altri casi la biomassa algale ottenuta viene inoltre impiegata nel settore alimentare sottoforma di integratori e *superfood*, o può essere utilizzata in altri processi industriali come la produzione di biogas (Doughman et al., 2007; John et al., 2011; Luo et al., 2015; Oncel et al., 2015; Vergara-Fernández et al., 2008).

Diversi sono i potenziali settori economici e ambientali di applicazione: nutraceutica, fitodepurazione e biocombustibili sono solo alcuni esempi della grande versatilità nell'utilizzo di questi organismi.

1.2. Caratteristiche generali

Le microalghe appartengono al gruppo polifiletico delle alghe e pertanto la loro classificazione è piuttosto complessa: si basa principalmente sullo specifico corredo dei pigmenti che, unito alle differenze ultrastrutturali di cloroplasti e cellule ed al profilo chimico dei composti, riesce a discriminare i diversi gruppi tassonomici (Singh and Saxena, 2015). Nel dettaglio, la distinzione filogenetica si effettua a partire dall'origine dei plastidi, dove la teoria più accreditata è quella delle endosimbiosi primaria e secondaria.

Rispettivamente, si tratta di una ancestrale simbiosi fra un cianobatterio procariote fotosintetico ed una cellula eucariote eterotrofa (plastidi primari a due membrane); nel secondo caso, invece, la simbiosi avviene fra una cellula eucariote eterotrofa ed una derivante dalla endosimbiosi primaria (plastidi secondari a tre o quattro membrane). Da questi eventi si sono evolute diverse discendenze, contraddistinte non solo dalla presenza di due o più membrane esterne nei cloroplasti, ma anche dalla peculiare struttura delle membrane tilacoidali e dallo sviluppo di specifici pigmenti fotosintetici. La figura 1 mostra gli eventi che hanno portato allo sviluppo dei plastidi fotosintetici in accordo con la teoria sopra spiegata.

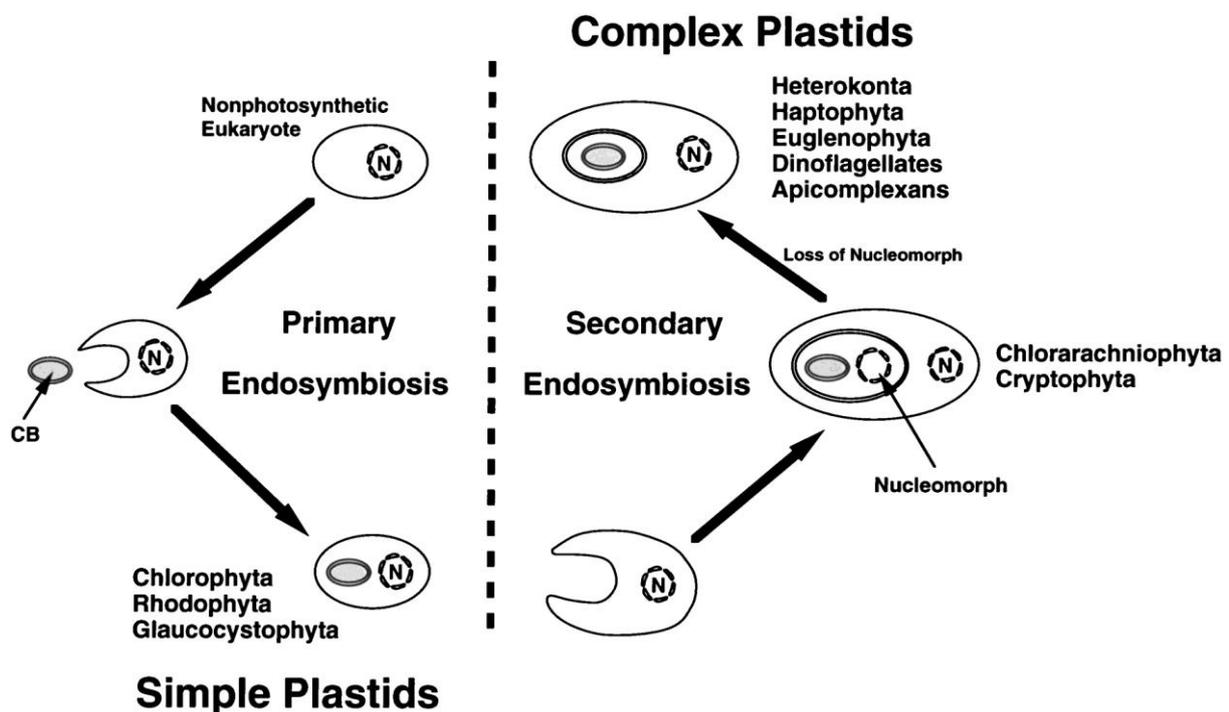


Fig. 1 – Origine endosimbiontica dei cloroplasti. N = nucleo; CB = cianobatterio (Bhattacharya and Medlin, 1998).

Molte microalghe hanno comportamento coloniale, come nel caso delle specie appartenenti al genere *Scenedesmus* (*Chlorophyceae*) che formano colonie di 4 o più cellule disposte parallelamente fra loro; altre al contrario sono solitarie, come accade per la stragrande maggioranza delle diatomee (*Bacillariophyceae*). Alcune si sono adattate alla vita fitoplanctonica propriamente detta: trascorrono cioè la maggior parte della propria esistenza in sospensione nella colonna d'acqua grazie a strutture peculiari deputate alla motilità (flagelli, ciglia) o al galleggiamento (e.g. spine). Altre invece sono fitobentoniche e/o epifite e vivono prevalentemente a contatto con il sedimento o con una superficie biotica fornita da macroalghe, gusci di molluschi e così via (e.g. dinoflagellata tossica *Ostreopsis ovata*)

(Faimali et al., 2012; Monti et al., 2007). Sempre a livello cellulare si riscontrano altre differenze importanti: si passa infatti da specie caratterizzate da cellule procariote e di diametro ridotto come per i cianobatteri (impropriamente chiamati alghe azzurre, e.g. il genere *Synechococcus* oppure *Arthrospira platensis*, meglio nota col nome commerciale di *Spirulina*) a cellule eucariote di dimensioni maggiori, nel range di decine o centinaia di micrometri, come per le già citate diatomee (Venkatesan et al., 2015b). Nel particolare caso dei dinoflagellati (*Dynophyta*), il nucleo presenta caratteristiche intermedie fra quello procariote ed eucariote ed è stato rinominato *mesocariote* (Wong and Kwok, 2005). Anche la composizione della parete cellulare differisce fra un gruppo e l'altro: nelle alghe rosse, ad esempio, si ritrovano abbondanti quantità di carragenani, dei polimeri solfati (Necas and Bartosikova, 2013), mentre nelle diatomee si riscontra la presenza di silice (Noll et al., 2002). Grazie al processo della fotosintesi le microalghe ricoprono il ruolo fondamentale di produttori primari all'interno degli ecosistemi acquatici: esse infatti fissano la CO₂ disciolta per produrre materia organica (OM, *organic matter*) rilasciando O₂. La OM prodotta contribuisce alla crescita delle singole cellule che aumentano in numero e biomassa. Quest'ultima entra direttamente nelle reti trofiche mediante la predazione (*grazing*) oppure tramite degradazione batterica e/o sedimentazione al collasso della popolazione stessa. Sulla base del contenuto medio di carbonio (c.a. 50 g ogni 100 g di peso secco di microalga), è teoricamente possibile calcolare il tasso con cui ogni grammo di biomassa algale essiccata fissa la CO₂. Come per le piante terrestri il contenuto di carbonio varia da specie a specie e dipende da fattori ambientali; approssimativamente, comunque, si ha (Mohsenpour and Willoughby, 2016):

$$\text{Tasso di fissazione della CO}_2 \cong \frac{1,83 \text{ g di CO}_2}{\text{g di biomassa algale}}$$

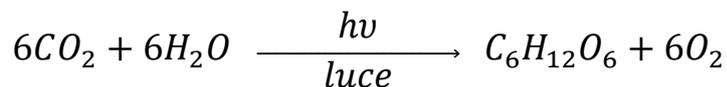
A livello globale, la biomassa del fitoplancton rappresenta solo il 1-2% del totale dei vegetali e differisce fra un gruppo e l'altro (Garcia-Pichel et al., 2003; Schlesinger, 1997); tuttavia, le piante presentano molti tessuti non fotosinteticamente attivi ed il tempo di turnover è molto più elevato (Behrenfeld et al., 2001; Falkowski and Raven, 2013) perciò, come le piante superiori anche microalghe contribuiscono significativamente alla produzione primaria globale (Field et al., 1998).

Il processo della fotosintesi è attivo nelle microalghe grazie alla presenza di uno o più cloroplasti organelli costituiti da un sistema di membrane interne impilate fra loro dette *tilacoidi* e da una sostanza acquosa ricca di enzimi e ribosomi, lo *stroma*. In alcune specie di dinoflagellati con comportamento eterotrofo obbligato tali organelli sono assenti. Esistono

inoltre specie di microalghe mixotrofe in grado sia di effettuare le fotosintesi, sia di ricavare energia direttamente da molecole organiche disciolte, come accade per molte euglenidi (*Euglenida*). I cloroplasti contengono pigmenti fotosintetici con la funzione di assorbire determinate lunghezze d'onda della luce trasferendo l'energia associata. Questi pigmenti sono racchiusi nei fotosistemi (PS), complessi enzimatici transmembrana ossido-reduttasi che, in quanto tali, catalizzano delle reazioni redox. I fotosistemi sono disposti lungo la membrana tilacoidale e se ne distinguono due:

- PSII o P680, assorbe alla lunghezza d'onda di 680 nm
- PSI o P700, con picco di assorbimento invece a 700 nm

Il ruolo dei cloroplasti è dunque quello di trasformare la luce solare in energia spendibile all'interno della cellula, poi impiegata per convertire molecole di CO₂ in sostanza organica e ossigenando l'acqua:



L'intero processo si basa, sinteticamente, su due fasi (John et al., 2011):

- dapprima, i fotoni della radiazione luminosa vengono intercettati dai PS, nell'ordine P680 e P700; in questo modo scaturisce una serie di reazioni redox e si crea un gradiente elettrochimico fra i due lati della membrana tilacoidale, che porta alla formazione di molecole di ATP e in particolare NADPH (processo fotochimico, fase 'luminosa')
- secondariamente, interviene il ciclo di Calvin-Benson-Bassham (processo di organicazione, 'fase oscura') dove la CO₂ viene fissata col ribulosio-1,5-bifosfato, un composto a 5 atomi di carbonio, dall'enzima RuBisCO. Vengono sfruttate la scissione dei legami ad alta energia dell'ATP ed il potere riducente del NADPH prodotti nella precedente fase fotochimica. Dopo una serie di reazioni catalizzate da enzimi, si ottiene in ultimo uno zucchero a 6 atomi di carbonio, il glucosio. Il ribulosio-1,5-bifosfato viene rigenerato per cominciare un nuovo ciclo.

In seguito alla fotosintesi, il glucosio entra nelle diverse vie metaboliche della cellula che andrà a produrre i principali composti biochimici. Molti di questi, come si è detto, hanno un alto valore aggiunto e la stessa biomassa può essere raccolta ed impiegata tal quale oppure lavorata in altri processi.

1.3. Fattori ambientali che influenzano crescita e composizione biochimica delle microalghe

L'attività fotosintetica e la crescita delle cellule algali sono influenzate da diversi fattori che ne condizionano il metabolismo e quindi la composizione biochimica (Hu, 2013). In linea generale, questi vengono classificati come abiotici, biotici ed operativi (Tab. 1) e dipendono dall'ambiente circostante e dalle condizioni di coltura (rielaborato da Mata et al., 2010):

Fattori abiotici	Fattori biotici	Fattori operativi
<ul style="list-style-type: none"> - <u>Luce</u> - <u>Temperatura</u> - <u>Salinità</u> - <u>pH</u> - <u>Nutrienti</u> - Scambio gassoso 	<ul style="list-style-type: none"> - Patogeni - Predatori (<i>grazing</i>) - <u>Competitors</u> (per spazio, nutrienti ecc.) 	<ul style="list-style-type: none"> - <u>Mixing</u> - Frequenza di raccolta - Tasso di diluizione - Profondità/altezza del sistema di coltura

Tab. 1 – Fattori che influenzano la crescita e la composizione delle cellule microalgali. Gli elementi sottolineati sono responsabili delle variazioni fisiologiche più importanti

In un'ottica di produzione, è possibile almeno in parte programmare la ripartizione del carbonio fotosintetico nelle cellule variando artificialmente questi parametri: in questo modo si va ad agire sulla crescita, in termini di biomassa, e sulle quantità relative di proteine, lipidi e polisaccaridi che andranno poi ad essere commercializzati (Dean et al., 2010; Wang et al., 2013). Queste variazioni tendono ad essere di facile riproducibilità in laboratorio; la questione cambia invece su larga scala, dove la densità della coltura, i volumi ed i costi rendono più complicata questa operazione. Con particolare riferimento ai sistemi di coltura aperti, anche il controllo dei fattori biotici non è semplice a causa del maggior tasso di contaminazione (De la Noüe et al., 1992). Di seguito vengono approfonditi gli effetti sulle colture algali di alcuni di questi fattori.

– Luce

La luce svolge un ruolo fondamentale nel controllo della crescita in quanto è implicata in prima battuta nel processo di fotosintesi. Tendenzialmente, un'elevata densità di coltura nei sistemi di coltivazione industriale può diminuire la resa in biomassa in quanto le cellule si schermano fra loro impedendo un accesso uniforme della luce (Jeon et al., 2005). Dal momento però che negli ambienti naturali le popolazioni microalgali sono continuamente soggette a cambiamenti di luminosità, questi organismi hanno sviluppato degli espedienti che consentono loro di adattarsi ai diversi livelli di intensità luminosa. Questo processo, che

prende il nome di fotoacclimatazione, porta in ultimo a dei cambiamenti nella composizione cellulare in risposta all'aumento o alla diminuzione di quantità di luce disponibile (Dubinsky et al., 1995). Le popolazioni microalgali possono ritrovarsi essenzialmente in due diversi regimi: alta luce (HL, *High Light*) e bassa luce (LL, *Low Light*). Queste condizioni in linea generale portano ad una serie di risposte fisiologiche comuni (schematizzate in tabella 2) salvo alcune eccezioni specie-dipendenti (Grobbelaar and Kurano, 2003; Hu, 2013).

Alta luce o HL (<i>High Light</i>)	Bassa luce o LL (<i>Low Light</i>)
– Aumento dei pigmenti accessori (carotenoidi: caroteni e xantofille)	– Diminuzione dei pigmenti accessori (carotenoidi: caroteni e xantofille)
– Diminuzione dei pigmenti fotosintetici (clorofilla <i>a</i> , clorofille accessorie e ficobiliproteine)	– Aumento dei pigmenti fotosintetici (clorofilla <i>a</i> , clorofille accessorie e ficobiliproteine)
– Aumento di polisaccaridi e lipidi	– Diminuzione di polisaccaridi e lipidi
– Predominanza acidi grassi saturi o monoinsaturi	– Predominanza di acidi grassi polinsaturi

Tab. 2 – Effetti generici della luce sulla composizione biochimica delle microalghe

L'effetto più evidente è quello osservato a livello dei pigmenti. Ciò è giustificabile dal fatto che i carotenoidi svolgono un'azione fotoprotettiva nei confronti dei pigmenti direttamente coinvolti nella fotosintesi (clorofille e ficobiliproteine): quando l'intensità luminosa aumenta, le cellule cominciano a produrre più carotenoidi, mentre i livelli di clorofilla *a* calano. Allo stesso modo l'alta luce stimola un maggiore ingresso del carbonio nel metabolismo di lipidi e polisaccaridi a discapito delle proteine, soprattutto quando le cellule si trovano in limitazione da azoto (Dean et al., 2010). La composizione in acidi grassi varia invece in maniera differente: in condizioni di alta luce la percentuale maggiore sui lipidi totali è rappresentata dagli acidi grassi saturi o monoinsaturi, i quali si accumulano sottoforma di triacilgliceroli o trigliceridi (TAGs) immagazzinati in corpi lipidici citosolici, gli acidi grassi polinsaturi o PUFAs (*Polyunsaturated Fatty Acids*), di maggiore interesse commerciale, predominano invece in condizione di bassa luce (Hu, 2013); questo, verosimilmente, accade poiché la membrana tilacoidale è prevalentemente costituita da PUFAs e il loro aumento consente di incrementare la superficie di membrana incentivando la fotosintesi quando la luce è più debole (Guedes et al., 2010). Tuttavia questi andamenti non rispecchiano lo standard per ogni specie microalgale: per esempio, nel caso della diatomea oggetto di questo elaborato *Phaeodactylum tricornutum*, si è visto che un aumento dell'irradianza media porta ad una riduzione nel contenuto di acidi grassi saturi e

monoinsaturi con un conseguente aumento di quelli polinsaturi (Fernández et al., 2000; Molina Grima et al., 1999).

– **Temperatura**

Ogni specie presenta specifici range di temperatura ottimali sulla base della propria natura, provenienza e stagionalità (Juneja et al., 2013). In letteratura sono riportate specie e/o ceppi le cui temperature ottimali variano dai 5 °C ai 30 °C con differenze significative fra un genere e l'altro, anche all'interno della stessa classe. Ad esempio, nell'ambito delle alghe verdi (*Chlorophyceae*), *Chlorella vulgaris* può crescere ad una temperatura di 25-30 °C, mentre le specie del genere *Scenedesmus* mostrano un più ampio range compreso fra i 10 °C ed i 40 °C (Singh and Singh, 2015). Alcune microalghe mal sopportano le alte temperature, come accade per *P. tricornutum* la cui crescita è fortemente inibita sopra i 25 °C (Jiang and Gao, 2004). La temperatura agisce sia sulla crescita microalgale che sulla ripartizione del carbonio fissato nella composizione biochimica della cellula (Hu, 2013). Al di sotto della temperatura ottimale, il tasso specifico di crescita tende ad aumentare con l'aumento della temperatura ed in parallelo anche il contenuto di clorofilla *a* (Thompson et al., 1992); quando però l'*optimum* viene superato, il tasso rallenta marcatamente, fino anche all'arresto della crescita stessa (Renaud et al., 2002). A livello biochimico, uno degli cambiamenti più visibili riguarda l'alterazione della composizione lipidica di membrana; temperature al di sotto dell'*optimum* di crescita provocano una riduzione della fluidità di membrana e del contenuto lipidico che la cellula cerca di compensare incrementando i livelli di insaturazione degli acidi grassi (Lynch and Thompson, 1982; Thompson, 1996; Van Wagenen et al., 2012), al contrario, l'aumento di temperatura porta ad una generica diminuzione dei livelli di PUFAs (Xin et al., 2011).

– **Salinità**

Intesa come concentrazione percentuale di NaCl per volume d'acqua, la salinità analogamente alla temperatura è un parametro specie-specifico. Le specie microalgali tipiche dei mari nordici, ad esempio, sono più adattate a situazioni di bassa salinità rispetto a quelle appartenenti al bacino del Mar Mediterraneo. L'esposizione delle microalghe a salinità più alte o più basse può portare a cambiamenti nel tasso di crescita e nella composizione cellulare (Juneja et al., 2013). Alcune specie sono in grado di sintetizzare molecole osmoregolatrici, come i polioli o polialcoli fra cui glicerolo, sorbitolo e mannitolo (Hu, 2013); in altre sono espresse diverse tipologie di canali Na⁺-ATPasi mediante i quali la cellula limita la permeabilità di membrana a questi ioni oppure li espelle attivamente fuori

dal citoplasma (Serrano et al., 1999; Shono et al., 1996; Strizh et al., 2004). Si è osservato che un aumento della salinità porta ad un leggero incremento nel contenuto lipidico totale in diverse specie microalgali (Ghezelbash et al., 2008; Renaud and Parry, 1994; Zhila et al., 2011); tuttavia in altre, come *Botryococcus braunii*, il trend è inverso (Yeesang and Cheirsilp, 2011), pertanto non è ancora noto se la sintesi dei lipidi sia in generale dipendente dalla concentrazione dei sali oppure sia piuttosto legata pathway metabolici specie-specifici (Hu, 2013).

– CO₂ e pH

In linea generale la disponibilità delle specie inorganiche del carbonio, come anche degli elementi in traccia e dei nutrienti, è fondamentalmente pH dipendente. Nello specifico, in soluzione acquosa a pH più acidi (maggiore concentrazione di H⁺), la solubilità della CO₂ aumenta come conseguenza di una maggiore dissociazione dell'acido carbonico, e diventa dunque maggiormente disponibile per le alghe. Al contrario valori di pH troppo basici spostano l'equilibrio di dissociazione del carbonio verso i carbonati limitando la disponibilità di CO₂ impiegata per la fotosintesi (Azov, 1982) inibendo così la crescita delle cellule microalgali (Juneja et al., 2013). Il pH nei sistemi di coltivazione di microalghe, sia su piccola che larga scala, può essere regolato o mediante l'aggiunta di correttori di acidità o basicità opportunamente diluiti (e.g. NaOH, HCl) oppure attraverso la somministrazione di CO₂ per aerazione (Granum, 2002). La CO₂ agisce anche come *buffer* della soluzione mantenendo un adeguato bilancio delle specie carboniose dell'ossigeno prevenendo eventuali danni da variazioni troppo elevate del pH (Gross, 2013). Nei sistemi di coltivazione chiusi la somministrazione di CO₂ può essere controllata con facilità ed accoppiata ad un monitoraggio continuo del pH stesso (Granum, 2002), al contrario nei sistemi aperti (vasche) il gas tende a disperdersi velocemente in atmosfera; ciò è verosimilmente dovuto sia al basso tempo di residenza delle bolle nel medium, insufficiente affinché la CO₂ si disciolga completamente (Richmond, 2008) che alle dimensioni stesse delle bolle; in questo caso bolle di piccole dimensioni nell'ordine del micrometro (10-50 μm) caratterizzate da un elevato rapporto superficie/volume, sono preferibili in quanto si dissolvono più velocemente e presentano una risalita alla fase gassosa più lenta (Zimmerman et al., 2011). Tuttavia in questi sistemi aperti la presenza di una superficie di scambio gas-liquido, assente nei circuiti chiusi, consente il naturale ingresso di CO₂ direttamente dall'atmosfera, il che permette di raggiungere il pH desiderato in tempi più brevi e con minor apporto operativo di CO₂. Analogamente a temperatura e salinità, anche il range di pH è un valore specie-specifico: la maggior parte delle microalghe predilige pH neutri, ma si

riscontrano in natura specie sia acidofile che basofile. Questa loro caratteristica può essere sfruttata per effettuare coltivazioni su larga scala, dove il mantenimento costante dei loro valori di pH ottimali impedisce la proliferazione di specie indesiderate: un esempio è dato da *A. platensis* che presenta un *optimum* di pH compreso fra 9,30-10,30, un valore non tollerato dalla maggior parte della altre specie microalgali (Goldman et al., 1982a, 1982b; Richmond et al., 1982; Touloupakis et al., 2016).

– **Presenza di *competitors***

In ambito industriale non sempre è facile mantenere condizioni sterili all'interno delle colture e frequentemente possono svilupparsi forme biologiche indesiderate come batteri, funghi, protisti, altre specie microalgali e microzooplancton che nell'insieme vengono definiti *competitors*. Questi organismi interagiscono con la specie microalgale coltivata e competono per spazio, luce, nutrienti e altre risorse; nel caso del microzooplancton possono anche verificarsi situazioni di vera e propria predazione nei confronti della specie originariamente coltivata (Mata et al., 2010). Con particolare riferimento ai sistemi aperti, ad influire sulla crescita di questi organismi indesiderati, sono anche le condizioni esterne quali luce, calore e impurità atmosferiche; in aggiunta a ciò l'uso di reflui e/o prodotti di scarto da lavorazione industriali nella coltivazione possono aumentare il rischio di contaminazione abbassando ulteriormente il valore economico della coltura e dei suoi prodotti (Monlau et al., 2015). Come precedentemente anticipato, è possibile monitorare queste interazioni agendo sui parametri abiotici (pH, salinità, temperatura ecc.), creando così un ambiente meno adatto ai *competitors* ma ottimale per la microalga coltivata (Mata et al., 2010).

– **Mixing**

Per consentire il passaggio di tutte le cellule dalle zone di ombra a quelle di luce, uniformando così la quantità di luce disponibile per la fotosintesi, nei sistemi industriali e non, viene attuato un mescolamento artificiale del medium di coltura noto come *mixing*. Questa operazione consente una più equa distribuzione anche di calore, metaboliti, nutrienti e gas e previene la sedimentazione gravitazionale delle cellule (Mata et al., 2010; Richmond, 2008). Un *mixing* inadeguato non permette una buona crescita dell'alga con effetti diretti sulla composizione biochimica della cellula, imputabili principalmente alla variabilità di luce e nutrienti. Le operazioni di *mixing* vengono effettuate attraverso meccanismi diversi (e.g. agitazione meccanica, impiego di pale, aerazione tramite bolle d'aria) in base alle caratteristiche del ceppo microalgale considerato. I diversi gruppi microalgali presentano una specifica *shear stress tolerance* (lett. "tolleranza allo sforzo da taglio") che consiste in una

diversa tolleranza a stress fisici e meccanici, ad esempio, le alghe verdi presentano livelli di tolleranza maggiore, seguite da cianobatteri, diatomee ed infine dinoflagellati i quali sono caratterizzati da una bassissima resistenza a condizioni di elevata turbolenza (Fon Sing, 2010). Il *mixing* diventa un parametro cruciale quindi a livello di coltivazione, con particolare riferimento ai sistemi di coltura chiusi nei quali si creano delle forze idrodinamiche che possono danneggiare anche pesantemente le cellule microalgali arrivando anche alla loro lisi (Carvalho et al., 2006; Michels et al., 2016).

– **Disponibilità di nutrienti**

Le microalghe richiedono la presenza in maggiore quantità di diversi composti inorganici per la crescita, denominati macronutrienti, che spaziano da elementi fondamentali come carbonio, idrogeno e ossigeno (C, H, O) essenziali per il processo di fotosintesi, al fosforo (P, nella forma di ortofosfati) e all'azoto (N come nitrati, nitriti, urea oppure ammonio) ma anche zolfo (S), magnesio (Mg), silicio (Si). A questi si aggiungono alcuni elementi necessari in concentrazioni minori detti micronutrienti o elementi in traccia (e.g. vitamine, Fe, Mn, Co, Zn ecc.). L'insieme di questi composti è necessario alla cellula microalgale per svolgere le normali funzioni biochimiche (Pires, 2015 e citazioni all'interno). In particolare l'azoto è fondamentale per la sintesi degli amminoacidi e di conseguenza per le proteine, ma è presente anche nella struttura molecolare di clorofilla e acidi nucleici; il fosforo trova invece allocazione nelle eliche di RNA/DNA e nei legami ad alta energia di ATP ed è un componente strutturale dei fosfolipidi di membrana; il Mg, legato e coordinato da quattro atomi di N, costituisce il centro dell'anello clorinato delle clorofille e pertanto è un elemento importante nella sintesi dei pigmenti algali. Molti elementi in traccia rappresentano degli importanti cofattori di diverse reazioni enzimatiche: ad esempio il Fe ricopre il ruolo di catalizzatore redox negli enzimi ossidoreduttasi coinvolti nella formazione di NADPH, intermedio chiave dei processi fotosintetici; il Mn è invece parte integrante del complesso evolvente ossigeno o OEC (Oxygen Evolving Complex) responsabile della fotoossidazione dell'acqua, dove il Mn infatti ossida due molecole di H₂O variando progressivamente il proprio stadio di ossidazione (S₀-S₄) e rilasciando una molecola di O₂. Nel particolare caso delle diatomee, il Si assume una certa importanza nella coltivazione poiché è necessario per la costruzione della parete silicea (Juneja et al., 2013). Tutti questi elementi vengono forniti attraverso il medium di coltura che è formulato a seconda delle esigenze dell'alga stessa. Nell'ambiente naturale le microalghe possono andare incontro a limitazione da nutrienti, in particolare azoto e fosforo che rappresentano anche nella coltivazione gli elementi chiave per la crescita microalgale (Peršić et al., 2009). In condizioni ottimali di pH, temperatura e

salinità ma in limitazione da nutrienti, si registrano delle variazioni nella composizione biochimica della cellula algale: la carenza da azoto va a promuovere la sintesi e l'accumulo di lipidi di riserva, a discapito delle proteine il cui contenuto cellulare tende a diminuire come anche quello della clorofilla (Breuer et al., 2012; Juneja et al., 2013); un'altra risposta alla carenza di azoto riscontrata in diverse specie algali è quella di deviare il carbonio fissato con la fotosintesi non solo nel metabolismo dei lipidi ma anche in quello dei carboidrati con un aumento del loro contenuto cellulare, anche se questo meccanismo non è stato ancora del tutto spiegato (Recht et al., 2012; Richmond, 2008). Una conseguenza comune nella limitazione da fosforo è invece la diminuzione dell'efficienza fotosintetica, dovuta alla riduzione del tasso di sintesi e rigenerazione dei substrati chiave del ciclo di Calvin-Benson-Bassham (Barsanti and Gualtieri, 2014). Analogamente alla limitazione da azoto, in carenza di fosforo si registra una diminuzione nel contenuto cellulare di proteine e di clorofilla e, anche in questo caso, il flusso del carbonio fotosintetico è deviato a favore dei lipidi di riserva e dei polisaccaridi, inoltre i fosfolipidi di membrana vengono degradati per recuperare il fosforo e sostituiti con glicolipidi non fosforici come i galattolipidi (Brembu et al., 2017; Guschina and Harwood, 2006); parallelamente lo stesso accade a livello delle membrane tilacoidali dove si osserva una concomitante diminuzione di fosfatidilglicerolo ipotizzando che l'alga recuperi anche da questa fonte il fosforo indirizzandolo ad altri processi per la biosintesi di composti più rilevanti per la sua sopravvivenza (Sato et al., 2000). L'assorbimento del fosforo dal mezzo di coltura da parte delle microalghe risulta inoltre interdipendente alla presenza di azoto (Beuckels et al., 2015) con la conseguenza che anche le fluttuazioni mutuali di entrambi i nutrienti influenzano notevolmente la biochimica dell'alga.

1.4. Implicazioni economiche nella coltivazione microalgale ed innovazioni delle tecniche di produzione

I campi di applicazione dell'utilizzo delle microalghe sono molteplici e negli ultimi decenni l'interesse nella produzione di biomasse algali è incrementato.

Per quale motivo, però, scegliere le microalghe? Si tratta innanzi tutto di organismi unicellulari, caratterizzati da cicli riproduttivi veloci e tendenzialmente poco complessi, con la possibilità di monitorarne più facilmente la crescita e le risposte fisiologiche. A differenza delle piante terrestri non producono lignina o simili in quanto non necessitano di protezione dall'essiccamento: in questo modo possono investire maggiore energia nella crescita o per produrre composti di struttura e/o riserva (Singh and Saxena, 2015; Vergara-

Fernández et al., 2008). Sebbene i terreni di coltura contengano in percentuale molta acqua, la richiesta è nettamente inferiore a quella necessaria per molte coltivazioni agricole (Dismukes et al., 2008) e non necessitano l'impiego di pesticidi e/o erbicidi (Rodolfi et al., 2009), anche la competizione per lo spazio, destinato in parte alle coltivazioni ed in parte agli allevamenti, si riduce considerevolmente potendo mitigare l'impatto ambientale dei terreni agricoli (Mata et al., 2010; Searchinger et al., 2008). Rispetto alla controparte terrestre le alghe presentano una maggiore efficienza di conversione fotonica, fino a 10 volte superiore a quella delle piante (Melis and Happe, 2001; Singh and Saxena, 2015) e si adattano bene a diversi contesti ambientali potendo garantire una produzione annuale continua e variegata. In aggiunta, da un punto di vista ambientale la coltivazione di microalghe sembra essere la scelta più ecologica in quanto possono infatti contribuire alla riduzione della CO₂ atmosferica (Ho et al., 2011; Kumar et al., 2010; Ono and Cuello, 2003; Sayre, 2010; Wang et al., 2008). Le microalghe vengono efficacemente impiegate nella fitodepurazione e nel trattamento delle acque reflue per la rimozione di nutrienti, accoppiando spesso anche la produzione di biomassa e/o di composti di interesse economico (Abdel-Raouf et al., 2012; Alcántara et al., 2015; Delgadillo-Mirquez et al., 2016; Prajapati et al., 2013; Safafar et al., 2015; Zhu and Hiltunen, 2016); è inoltre possibile integrare questi trattamenti delle acque reflue con l'utilizzo della CO₂ derivante da gas di scarico industriali (Razzak et al., 2013). In ultimo, la biomassa microalgale di scarto privata della componente lipidica o di altri composti di interesse può a sua volta essere reimpiegata per la produzione di biogas (digestione anaerobica della biomassa), come mangime per l'acquacoltura o convertita in fertilizzante (De Jesus Raposo et al., 2013; Sforza et al., 2017).

Tuttavia, la coltivazione di microalghe presenta dei limiti imputabili soprattutto ai costi elevati dell'intero processo produttivo. Dapprima è necessario operare una selezione di ceppi microalgali di interesse per la produzione o applicazione desiderata, effettuando studi su piccola scala che richiedono di conseguenza un importante investimento iniziale (Frigon et al., 2013; Hong et al., 2016; Rodolfi et al., 2009; Wen et al., 2016; Wolf et al., 2015); il mantenimento inoltre di tali ceppi in camere di coltura richiede un notevole consumo energetico per ricreare artificialmente i range di temperatura, pH ed illuminazione ottimali per le singole specie (Blanken et al., 2013; Juneja et al., 2013; Schulze et al., 2014). Per l'ottimizzazione della produzione su larga scala è spesso necessaria la somministrazione di CO₂ che costituisce uno dei costi più gravosi soprattutto nei sistemi di coltivazione chiusi dove lo scambio gassoso naturale con l'aria non c'è; questo fa sì che la spesa per portare tali sistemi a livelli industriali sia spesso proibitiva (Singh and Saxena, 2015; Trivedi et al.,

2015). Di contro, nei sistemi aperti bisogna affrontare la problematica della contaminazione che può ridurre notevolmente il grado di purezza e la qualità del prodotto finale (Narala et al., 2016; Zhang et al., 2016).

Complessivamente, l'allestimento ed il mantenimento delle colture concorrono approssimativamente alla metà della spesa totale di un processo produttivo di microalghe (Sayre, 2010) mentre, a causa delle caratteristiche intrinseche delle specie microalgali, circa il 20-30% dei costi totali è rappresentato dai sistemi impiegati per la raccolta della biomassa. Le dimensioni ridotte delle cellule e l'alta diluizione nei sistemi di coltura (spesso $< 1,0 \text{ g L}^{-1}$ e vicino al valore di densità dell'acqua) rendono infatti difficile questa operazione (Barros et al., 2015; Christenson and Sims, 2011; Molina Grima et al., 2003). Esistono diversi metodi di raccolta, ognuno dei quali è più indicato per determinate specie algali e per i composti che si vogliono estrarre. I metodi a basso costo vengono di norma adottati per la raccolta della biomassa grezza, per applicazioni ad esempio nel settore dell'acquacoltura; quelli più dispendiosi sono preferibilmente impiegati per l'estrazione di composti ad alto valore aggiunto che non devono essere deteriorati in quanto i costi da affrontare sono giustificabili solo dalla commercializzazione degli stessi (Wijffels and Barbosa, 2010). La centrifugazione è il metodo più usato e spesso è preceduto da una o due fasi di concentrazione della biomassa, (*thickening and dewatering*, rispettivamente addensamento e drenaggio) che viene effettuata mediante processi chimici, fisici o meccanici (Barros et al., 2015; Salim et al., 2011). La restante porzione di costi è legata all'estrazione dei composti, nonché alla lavorazione della biomassa (Sayre, 2010). In particolare, se si considera l'opzione di utilizzare le microalghe come *feedstock* per la produzione di biodiesel la spesa risulta molto elevata: seppure da un lato si riducono gli impatti ambientali causati dai biocombustibili di prima e seconda generazione (rispettivamente: fonti vegetali edibili; composti lignei non commestibili) la produzione di biodiesel da microalghe resta ancora troppo dispendiosa rispetto alle altre tipologie (Clarens et al., 2010; Lardon et al., 2009; Yang et al., 2011). Sempre nell'ambito dei metodi estrattivi, ad oggi non sono ancora state sviluppate delle efficienti tecniche di separazione che consentano di estrarre contemporaneamente un composto senza danneggiare le altre componenti cellulari (Gerardo et al., 2014; Gouveia, 2015; Vanthoor-Koopmans et al., 2013), rendendo di fatto la notevole potenzialità di sfruttamento delle microalghe meno praticabile.

Attualmente si stanno ricercando approcci sempre più innovativi nel tentativo di ridurre tutti questi costi di produzione. In particolare, le metodiche appena descritte prevedono la raccolta parziale o totale della biomassa algale e la successiva estrazione, così che per

successive applicazioni la coltura debba essere riavviata, reintroducendo da capo risorse e denaro.

Come anticipato, la raccolta implica dei costi non indifferenti e le operazioni più economiche spesso non soddisfano la richiesta del mercato. Un'interessante approccio è dato dalle così dette colture *attached* dove le microalghe vengono fatte crescere su un supporto solido (e.g. polimeri di sintesi) che ne consenta poi una facile raccolta; questo tipo di colture hanno inoltre il vantaggio di aumentare la produttività in termini di biomassa e di ridurre sia il rischio di contaminazione sia il consumo di acqua (T. Liu et al., 2013).

Per quanto concerne i metodi estrattivi, recentemente è stato testato un nuovo approccio conservativo denominato *milking the algae* (lett. “mungere” l'alga). Il concetto è quello di avviare una coltura microalgale e prelevare i diversi composti e/o parte della biomassa senza uccidere le cellule: si dà modo così alla coltura di rigenerarsi più velocemente con la possibilità di effettuare successive estrazioni (Ramachandra et al., 2009). Tra le metodologie di *milking* più studiate (Vinayak et al., 2015) si ritrovano:

- solventi organici biocompatibili, sono però poco efficaci per le microalghe con pareti più robuste come le diatomee e il loro impiego può dar luogo alla formazione di sottoprodotti tossici che li rendono non del tutto *eco-friendly* (Wijffels and Barbosa, 2010; Zhang et al., 2012)
- campo elettrico pulsato (PEF, *Pulsed Electric Field*), questa tecnica, che consiste nella perforazione della membrana cellulare attraverso degli impulsi elettrici per permettere la fuoriuscita delle componenti cellulari, è già stata saggiata su larga scala con buone rese e risulta compatibile con la vita microalgale se i parametri quali intensità e ripetizione dell'impulso siano correttamente impostati per ciascuna specie (Coustets et al., 2015, 2013)
- trasudazione spontanea, si tratta di un meccanismo tipico di alcune specie microalgali che sono in grado di secernere attivamente composti lipidici nell'ambiente esterno; il principale intralcio di questo è che si tratta di un fenomeno piuttosto lento (Vinayak et al., 2014; Zhang et al., 2013)
- pressione meccanica, esercitata a livello della membrana cellulare, che risulta però compatibile con la vita microalgale solo a deboli pressioni con valori inferiori a 750 μN (Vinayak et al., 2015).

Un'altra interessante strategia per ridurre i costi è quella di impiegare le acque di scarto industriali come terreno per la crescita: circa il 10-20% dei costi totali nella coltivazione su scala industriale è infatti dato dai media di coltura (Benemann and Oswald, 1996) ma la

spesa può raggiungere anche il 50% se si aggiunge il contributo dei fertilizzanti (Xia and Murphy, 2016).

Nello specifico caso della produzione di biodiesel, Yang e collaboratori (2011) hanno dimostrato in un'analisi LCA (*Life Cycle Assessment*) che la richiesta di acqua e nutrienti per produrre 1 Kg di biodiesel di origine microalgale è pari a 3726 kg di acqua e 1,04 Kg di nutrienti (di cui N = 0,33 Kg; P = 0,71 Kg); gli autori propongono quindi una riduzione di questa richiesta adottando due diverse strategie:

- riciclando una porzione dell'acqua proveniente dalla coltura al momento della raccolta, in quanto parte dei nutrienti non viene consumata dalle alghe e resta disciolta al suo interno: in questo modo la richiesta di acqua si riduce dell'84% mentre quella dei nutrienti del 55%
- utilizzando acque reflue con la possibilità di abbattere la domanda di acqua del 90% e quella di azoto del 100% mentre è necessario implementare il fosforo poiché è presente in minore quantità in questi scarti.

Per la produzione di biodiesel l'impiego di acque reflue rappresenta quindi un contributo sostanziale alla riduzione dei costi e assieme al miglioramento di quelle che sono tecniche di raccolta ed estrazione delle microalghe potrebbe rendere questo processo economicamente sostenibile (Canter et al., 2015; Novoveská et al., 2016).

Il processo della fotosintesi richiede disponibilità di CO₂ che, come si è detto, incrementa pesantemente i costi di produzione. Nell'ottica di un approccio più sostenibile, da diversi anni si cerca di impiegare la CO₂ di scarico da un lato per ridurre l'impatto sull'ambiente e da un altro per incrementare la produttività delle colture microalgali (Douskova et al., 2009; Jiang et al., 2011; Kao et al., 2014; Z. Liu et al., 2013). Questa applicazione, fra le tante, sta dando risultati promettenti: si è infatti dimostrato che la somministrazione diretta di gas di scarico contenenti CO₂, generalmente in percentuale attorno al 10-20% (v/v) può portare ad un aumento in biomassa anche del 30% rispetto alla somministrazione di un eguale quantitativo di CO₂ pura (Douskova et al., 2009); si pensa che tale fenomeno sia dovuto alla presenza nel gas di scarico di altre forme volatili contenenti ossidi di zolfo ed azoto, SO_x e NO_x rispettivamente che possono essere impiegate dall'alga come fonti aggiuntive di nutrienti (Kao et al., 2014; Sayre, 2010). Tuttavia la presenza di questi ossidi in concentrazioni elevate nel flusso di scarico può portare ad inibizione della crescita microalgale a causa di un'eccessivamente riduzione del pH della coltura (Pires et al., 2012); l'efficace conversione di questi gas in fonti di azoto e zolfo utili per le cellule dipende inoltre dalla concomitante presenza di O₂ nel flusso di scarico (Yen et al., 2015).

Più recentemente, si sta esaminando l'efficacia di sistemi di coltivazione che combinino fra loro l'impiego di acque reflue come mezzo di crescita e l'apporto di CO₂ proveniente da scarichi industriali, accoppiate alla produzione di biomassa e/o composti ad alto valore aggiunto (Jiang et al., 2011; Maity et al., 2014; Razzak et al., 2013).

Zhang e collaboratori (2016) hanno proposto un modello teorico integrato che vada ad unire molte delle soluzioni sopra elencate e che possa costituire un'utile base per la coltivazione su larga scala: si tratterebbe di un sistema basato su colture *attached* non-axeniche ma miste (sia fotoautotrofe che mixotrofe) alimentate con acque reflue domestiche come fonte di nutrienti. Sulla carta, tale tecnica permetterebbe di minimizzare i costi nel loro complesso, ma l'effettivo bilancio biomassa/bioenergia prodotta andrebbe indagato a fondo.

1.4.1. Principali sistemi di coltivazione

Le microalghe possono essere coltivate in locali interni (e.g. laboratori, serre, case di produzione vere e proprie ecc.) oppure in ambienti esterni dove spesso vengono ubicate su terreni agricoli dismessi e spazi inutilizzati: quando disposte esternamente, i parametri chiave come luce e temperatura non sono facilmente controllabili, sebbene la coltivazione nell'insieme risulti meno dispendiosa (Pires, 2015).

In base al tipo coltura e ai parametri seguiti dagli operatori, le alghe possono trovarsi essenzialmente in tre diversi regimi (Barros et al., 2015):

- **Batch:** si intendono quelle colture in cui il volume iniziale del medium di crescita rimane invariato nel tempo; 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 una tipica curva di crescita di una coltura *batch* possiamo osservare varie fasi: adattamento o lag, esponenziale, stazionaria e declino. Tale regime è impiegato soprattutto su piccola scala per indagini approfondite di fisiologia algale in condizioni controllate
- **Semi-continuo:** l'organismo non entra mai in fase stazionaria prolungata ma una parte della coltura viene raccolta o eliminata e sostituita da nuovo terreno di coltura.
- **Continuo:** l'aggiunta di nuovo terreno e la sostituzione della coltura avviene simultaneamente mantenendo la stessa diluizione o volume (e.g. turbidostati, chemostati)

La figura 2 mostra delle curve di crescita teoriche per le colture *batch* (Fig. 2.a) e per quelle in semi-continuo (Fig. 2.b). La crescita viene di norma monitorata valutando parametri come la torbidità (*Abs*) della sospensione algale allo spettrofotometro a 750 nm, il peso secco o DW (Dry Weight, espresso in g L^{-1}) oppure il numero di cellule per millilitro (cell ml^{-1}).

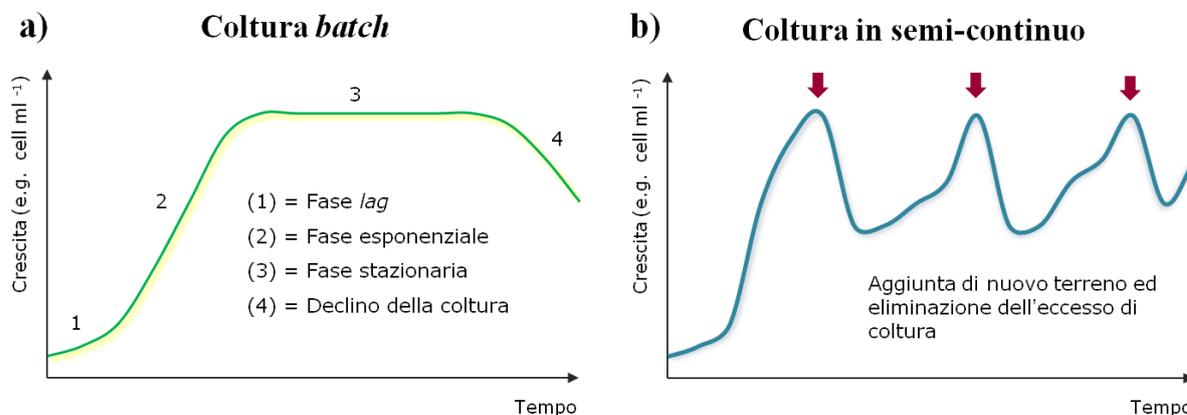


Fig. 2 – Esempi teorici di curve di crescita microalgali: colture *batch* (2.a) con il dettaglio delle diverse fasi; in semi-continuo (2.b) dove sono segnalati (frecche viola) l'immissione di nuovo terreno e la coltura in eccesso eliminata, così che di fatto non entri mai in fase stazionaria

Indipendentemente dalla loro allocazione (esterna o interna) e dal tipo di strategia adottato per la crescita, i sistemi di coltura possono essere aperti o chiusi. Nel primo caso l'impianto consente lo scambio di energia e materia con l'ambiente esterno ed è quindi fortemente soggetto alle variazioni di luce, calore e gas respiratori, di conseguenza il controllo da parte dell'operatore è solo marginale e si ha frequentemente contaminazione attraverso particelle nell'aria o agenti esterni. I sistemi chiusi al contrario permettono un controllo diretto di luce, temperatura e scambi gassosi ed è inoltre più semplice evitare l'inquinamento con altri componenti biotici e abiotici.

Per quanto concerne i sistemi aperti su piccola scala vengono adoperate delle semplici vasche nelle quali il mescolamento delle colture è attuato mediante aeratori oppure agitatori magnetici; questi vengono generalmente utilizzati o a livello di ricerca o come prototipi per lo sviluppo di sistemi produttivi su larga scala. In ambito commerciale si trovano più comunemente vasche artificiali poco profonde ma ben più grandi, denominate *open-pond*, ne esistono di diverse forme e possono raggiungere dimensioni importanti: un esempio è dato dalle coltivazioni di *Dunaliella salina* dove la superficie dell'area di coltivazione può arrivare fino a 200 ettari (Hallmann, 2015). Ogni vasca è progettata per rispondere meglio alle esigenze delle microalghe di interesse e può essere costruita sia in materiale trasparente come il Plexiglas® oppure opaco/bianco, più adatto a specie particolarmente sensibili alla

fotoinibizione. Le vasche circolari (*circular ponds* Fig. 3.a) sono in genere caratterizzate da una profondità compresa fra 30-70 cm, mentre il diametro tendenzialmente non supera i 50 metri a causa della minor efficienza di *mixing* (Shen et al., 2009). Le vasche lineari (*raceway ponds* Fig. 3.b) sono le più diffuse e hanno una profondità minore di circa 15-30 cm. Indipendentemente dalla loro conformazione, il *mixing* è portato avanti da agitatori meccanici motorizzati che consentono di spostare la massa acquosa lungo tutto il sistema e meno di frequente si ritrovano pompe o sistemi *airlift* (Hallmann, 2015). I dettagli sono riportati in Figura 2.

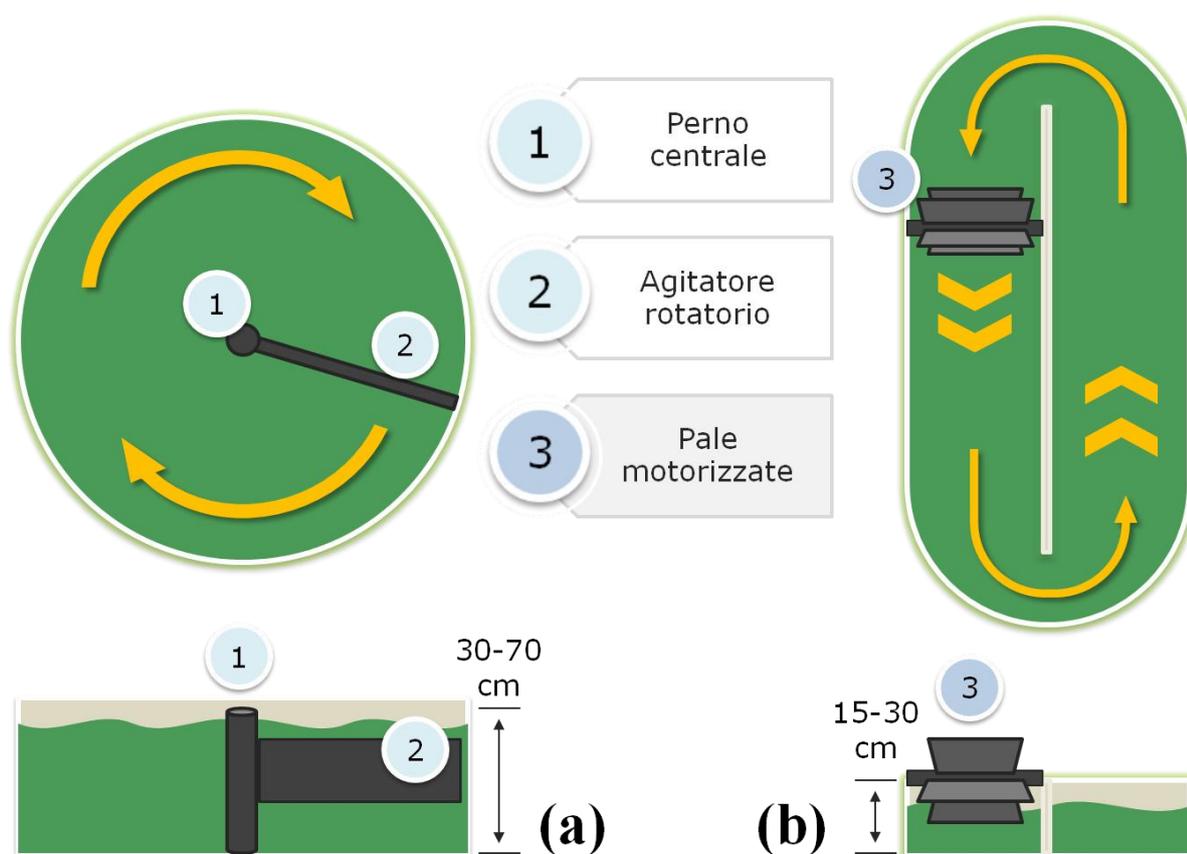


Fig. 3 – Tipologie di sistemi di coltura aperti *Circular ponds* (3.a) e *Raceway ponds* (3.b). Le frecce gialle indicano il flusso e la direzione della massa d'acqua (rielaborato da Hallmann, 2015)

I sistemi *open-pond* sono piuttosto economici e di facile allestimento: presentano infatti un basso costo sia di costruzione che di mantenimento e possono essere facilmente abbinati al trattamento di acque reflue, tuttavia, in particolar modo se disposti all'esterno, dipendono fortemente dalle condizioni ambientali e non sono in grado di garantire una produzione annuale stabile (Eriksen, 2008); le vasche inoltre hanno inoltre la tendenza a contaminarsi velocemente rendendo spesso impossibile la realizzazione di una coltivazione mono-specifica (De la Noüe et al., 1992; Hallmann, 2015; Mata et al., 2010; Monlau et al., 2015).

Allo stesso tempo, nonostante i grandi volumi, la produttività di questi sistemi non sembra essere troppo elevata per via dell'alta diluizione del mezzo: la concentrazione di alga è infatti solitamente compresa in un range di 0,6-1,0 g L⁻¹ in tali sistemi (Shen et al., 2009). Nei sistemi all'aperto non è inoltre possibile coltivare microalghe geneticamente modificate e dunque ottenere un organismo selettivo per uno specifico tratto per evitare la sua dispersione nell'ambiente, esistono al riguardo numerose regolamentazioni internazionali (Lee, 2012) ed europee (Enzing et al., 2014).

I sistemi chiusi sono strutture che nel complesso consentono di lavorare in condizioni più sterili e facilmente monitorabili, potendo così ottenere colture axeniche/mono-specifiche e caratterizzate da un'elevata produttività (Pulz, 2001). Nei laboratori sono spesso impiegate per colture di piccoli volumi delle bottiglie chiuse (non ermeticamente) provviste di insufflatori che consentono l'immissione controllata di aria eventualmente miscelata con CO₂. Per volumi maggiori esistono dei sistemi noti come fotobioreattori (PBR, Photo-Bioreactor); questi presentano forme molto variegata che hanno lo scopo di massimizzare l'ingresso di luce e/o ottimizzare il *mixing* della coltura (e.g. tubulare, a colonna) (Yen et al., 2014). Si tratta infatti di strutture chiuse costruite in questo caso di soli materiali trasparenti che consentono il passaggio diretto di luce o sono dotati di sistemi di illuminazione artificiale con neon o luci LED che consentono di monitorare al meglio questo parametro; per permettere le operazioni di *mixing*, dispositivi a pompa, *airlift* o aeratori sono installati all'interno del reattore. I PBR più impiegati sia a livello industriale che di ricerca sono quelli a colonna tra i quali i più comuni sono i *Bubble Column* PBR (BC-PBR, Fig. 4.a). Questi sistemi sono costituiti da un cilindro trasparente disposto verticalmente dove la coltura è mantenuta in sospensione grazie ad aeratori posti alla base del reattore che danno origine ad un flusso di bolle al suo interno così da creare turbolenza nel mezzo ed immettere i gas respiratori (Khoo et al., 2016). Talvolta la struttura dei BC-PBR o più in generale dei fotobioreattori a colonna può assumere una conformazione ad anello (PBR anulare, Fig. 4.b) dove la coltura prende posto lungo la circonferenza periferica del reattore ed i sistemi di illuminazione di ausilio sono inseriti nella porzione centrale cava.

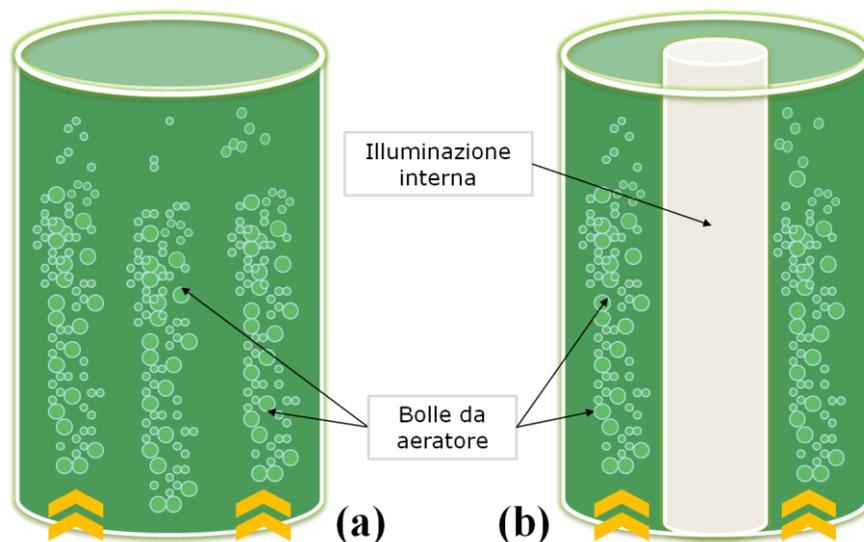


Fig. 4 – Fotobioreattore a colonna di tipo *bubble* (BC-PBR) semplice (4.a) e anulare (4.b): le bolle vengono generate da un aeratore posto alla base che consente sia l'ingresso di gas respiratori (O_2 e CO_2) sia il *mixing* della coltura

Ad oggi, fra tutti i PBR disponibili, quelli a colonna presentano sistemi di mescolamento della coltura più efficaci che favoriscono uno scambio ottimale di gas respiratori fra tutte le cellule e sono quelli in cui è possibile un miglior monitoraggio delle condizioni di crescita (Eriksen, 2008). Grazie in particolare alla loro compattezza, facilità di gestione e costo relativamente più basso rispetto ad altri design, i PBR a colonna sembrano essere i più adatti per il processo di *scale-up* ovvero per l'ampliamento delle colture a scopi produttivi (Chini Zittelli et al., 2006; Mirón et al., 1999).

Indipendentemente dal loro design, i PBR consentono una produttività molto più elevata rispetto a qualunque sistema aperto in quanto la densità algale raggiunta generalmente è intorno a $1-1,5 \text{ g L}^{-1}$ (Shen et al., 2009). Questo in parte è dovuto ad un maggiore controllo delle condizioni di crescita (Mata et al., 2010), ma anche alla minimizzazione delle perdite dei gas respiratori, in particolare CO_2 , nonché ad una minor evaporazione del medium (Carvalho et al., 2006; Yen et al., 2014); inoltre il monitoraggio costante del consumo dei nutrienti permette il loro ripristino in maniera più efficace ottimizzando la produzione. In aggiunta, questi sistemi occupano tendenzialmente meno spazio rispetto ai sistemi aperti e permettono di ridurre drasticamente il rischio di contaminazione; grazie a queste condizioni più controllate nei PBR è consentito e regolamentato l'impiego di specie geneticamente modificate (Enzing et al., 2014; Hallmann, 2015).

Tuttavia l'uso di PBR presenta numerose problematiche: in primo luogo la loro conformazione rende difficoltose le operazioni di pulizia del sistema, con conseguente

accumulo di biofouling e sporcizia; questo diventa più rilevante nei design specificatamente costruiti per rispondere meglio alle esigenze di varie specie algali (Narala et al., 2016). Nonostante gli efficaci sistemi di mescolamento, l'alta densità raggiunta dalla coltura rappresenta una limitazione a causa di fenomeni di mascheramento alla luce, perciò per mantenere costante questa elevata produttività è necessario implementare dei sistemi ausiliari di illuminazione che tuttavia gravano sui costi finali (Carvalho et al., 2006; Yen et al., 2014). Il principale svantaggio degli attuali PBR sono quindi i costi onerosi di allestimento e mantenimento, che impediscono una industrializzazione significativa ed efficace di questi sistemi così promettenti (Narala et al., 2016; Schreiber et al., 2017; Yen et al., 2014).

Nella tabella 3 sono elencati i principali vantaggi e svantaggi di *open-ponds* e dei PBR messi a confronto fra loro.

I diversi sistemi di coltura possono infine essere combinati fra loro per garantire una coltivazione su due o più fasi differenti: questo approccio consente di suddividere la crescita delle microalghe in una fase di accumulo della biomassa in condizioni ottimali e axeniche e in una successiva fase di accumulo di composti di interesse commerciale grazie all'induzione da stress, come accade per la produzione di astaxantina estratta da colture di *Haematococcus pluvialis*, (Hu, 2013). In particolare i sistemi combinati potrebbero costituire una buona strategia per la coltivazione di specie microalgali ricche in lipidi, la cui produttività non soddisfa al momento le esigenze di mercato per la produzione dei biocombustibili: tale approccio consentirebbe quindi una maggiore produttività di queste specie sia in termini di biomassa che di accumulo di lipidi, limitando anche il rischio di contaminazione (Narala et al., 2016).

Costi, parametri e applicazioni	Sistemi aperti	Sistemi chiusi	
Costi	Allestimento	Basso	Alto
	Mantenimento e raccolta	Basso	Alto
	<i>Scale-up</i>	Alto	Elevato
Parametri ambientali e biologici	Rischio contaminazione	Alto	Basso
	Dipendenza da condizioni esterne	Alta	Bassa
	Produttività biomassa	Bassa	Alta
	Densità di coltura	0,6-1,0 g L ⁻¹	1-1,5 g L ⁻¹
Parametri operativi	Controllo parametri abiotici	Difficile	Semplice
	<i>Mixing</i>	Scarso	Omogeneo
	<i>Shear stress</i>	Basso	Alto
	Specie geneticamente ingegnerizzate	Restrizioni amministrative	Possibile
	Richiesta di CO ₂	Medio-Alta	Alta
	Perdita di CO ₂	Alta	Bassa
	Richiesta di acqua ed evaporazione medium	Alta	Bassa
	Spazio richiesto	Alto	Basso
Applicazioni	Fitodepurazione	Possibile	Possibile
	Impiego scarti, digestati	Possibile	Possibile
	Impiego CO ₂ industriale	Difficile	Possibile
	Combinazione più trattamenti	Difficile	Possibile

Tab. 3 – *Open-ponds* e PBR a confronto fra loro (contenuti rielaborati da Hallmann, 2015; Pires, 2015; Shen et al., 2009 e citazioni all'interno).

1.4.2. Composti di interesse commerciale e rispettive applicazioni

Uno degli aspetti più studiati nella coltivazione di microalghe è la possibilità di estrarre vari composti cellulari fra cui lipidi, proteine, polisaccaridi, pigmenti ed altro. Ognuno di essi può essere indirizzato ad applicazioni diverse così come la biomassa di scarto che può essere reimpiegata in altri processi (Borowitzka, 2013; Hallmann, 2015; Safafar et al., 2015; Salam

et al., 2016; Trivedi et al., 2015; Yen et al., 2013). Alcune delle molecole di maggiore interesse commerciale e le rispettive applicazioni sono riportate nella tabella 4.

Fra i composti più quotati si annoverano gli acidi grassi polinsaturi o PUFAs, come l'acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5) e l'acido docosaesaenoico (DHA, 22:6) comunemente chiamati omega-3: si tratta di acidi grassi essenziali non sintetizzati dai mammiferi ed usati specialmente per ridurre il rischio di malattie cardiovascolari (Barreira et al., 2015); gli integratori di omega-3 provengono principalmente dall'olio di pesce (Cahu et al., 2004) e secondariamente da microalghe, ma esistono in commercio anche alimenti come alcuni formulati per bambini che contengono oli costituiti da DHA di derivazione microalgale (Borowitzka, 2013). Gli omega-3 microalgali sono oltre a ciò ottimi candidati nelle formulazioni di integratori specifici per le diete vegetariane e vegane poiché non sono di derivazione animale (Doughman et al., 2007).

Degni di nota sono anche i pigmenti fotosintetici (e.g. astaxantina, fucoxantina, β -carotene) largamente usati in cosmesi e nei settori nutraceutico e alimentare: particolarmente apprezzata è la loro capacità colorante affiancata a generici effetti antiossidanti e antinfiammatori; fungono inoltre da precursori di importanti vitamine come la vitamina A ed il tocoferolo (Christaki et al., 2015; De Jesus Raposo et al., 2013; Peng et al., 2011).

Moltissime microalghe sono adoperate in acquacoltura come mangime oppure in vivo (e.g. *Phaeodactylum*, *Isochrysis*, *Pavlova* ecc.) e devono rispondere a specifiche esigenze di mercato: dimensioni adeguate per l'ingestione, alta digeribilità, elevati tassi crescita e produttività, fonte di omega-3 e così via (Hallmann, 2015).

Nonostante l'ampio *reservoir* offerto dalle microalghe, la produzione della quasi totalità di tali composti non si colloca efficacemente nel mercato. Alcuni di questi prodotti non sono competitivi in termini di quantità rispetto alla controparte macroalgale, terrestre, fungina o sintetica e in altri casi l'ostacolo più grande risiede nei costi stessi di produzione. Ad oggi la commercializzazione su larga scala è trainata fondamentalmente dal settore alimentare e dagli integratori dove le specie più commercializzate sono *Chlorella sp.* e *A. platensis* (Borowitzka, 2013), anche se il settore cosmetico *eco-friendly* e con prodotti a base di microalghe sta diventando sempre più attrattivo (Pudaruth et al., 2015; Wang et al., 2015). Nel campo delle biotecnologie algali, l'interesse negli ultimi decenni si è spostato soprattutto su quelle specie ad alto contenuto di lipidi che ha promosso diverse ricerche allo scopo di produrre biocarburanti effettivamente competitivi ed economicamente sostenibili (Shen et al., 2009).

Composti estratti e molecole di interesse commerciale	Microalghe coltivate o potenziali candidate (in ordine alfabetico)	Applicazioni
Lipidi e PUFAs	<p>Trigliceridi (TAGs) come fonte di acidi grassi liberi</p> <p>Omega-3 (EPA, DHA)</p>	<p><i>Chlorella, Isochrysis, Nannochloropsis, Phaeodactylum, Porphyridium, Schizochytrium, Tetraselmis</i></p> <p>Biodiesel <i>feedstock</i> *</p> <p>* microalghe ricche in lipidi (20-50% su peso secco e produttività medio/alta)</p>
Polisaccaridi	<p>Complessi polisaccaridici</p> <p>Caroteni (β-carotene)</p>	<p>Integratori alimentari (riduzione rischio/insorgenza cardiopatologie, diabete-2 ed obesità) analgesici, stimolazione retina, latte artificiale arricchito</p> <p>Additivi alimentari con proprietà immunomodulatorici, cosmetici (e.g. agenti gelificanti), bioetanolo</p> <p><i>Ankistrodesmus, Chlorella, Porphyridium</i></p> <p><i>Desmodesmus, Dunaliella, Tetraselmis</i></p> <p>Coloranti, pro vitamina-A, antiossidanti</p>
Pigmenti	<p>Xantofille (astaxantina, luteina, violaxantina)</p> <p>Ficobiliproteine (ficoeritrina, ficocianina)</p>	<p><i>Chlorella, Haematococcus, Nannochloropsis, Diatomee</i> *</p> <p>(* diatoxantina, diadinoxantina, fucoxantina)</p> <p><i>Arthrospira, Porphyridium</i></p> <p>Antiossidanti, coloranti, nutraceutici, cosmetici, additivi alimentari e <i>pet food</i></p> <p>marker fluorescenti (e.g. citometria a flusso, ELISA)</p>
Biosilice	(SiO ₂ .nH ₂ O)	<i>Drug-delivery</i> , nanomateriali, filtri
Altri composti	Vitamine (A, B1), Tocoferolo, Polifenoli	Antiossidanti, antinfiammatori, additivi alimentari, cosmetici
Biomassa tal quale	Ricca in proteine e omega-3	Mangimi per molluschicoltura e acquacoltura (<i>dry-mass</i> e vivo)

Tab. 4 – Composti estratti da microalghe e loro applicazioni. Sono indicati i generi commercializzati per tipo di composto o quelli potenzialmente adatti. Fonti dei dati: Borowitzka, 2013; De Jesus Raposo et al., 2013; Doughman et al., 2007; Hallmann, 2015; Jensen et al., 2001; Kim, 2015; Noll et al., 2002; Olaizola, 2003; Peng et al., 2011.

1.4.3. Il concetto di economia circolare: digestati come medium di coltura per le microalghe

A causa dei troppi sprechi protratti dall'uomo nel corso dei decenni, oggi si rende imperativo il riutilizzo degli scarti, dove possibile, per dar loro 'nuova vita' e per ridurre il carico di rifiuti (Gupta et al., 2009). È all'interno di tale contesto che si inserisce il moderno concetto di *economia circolare* la quale è, così come definita da Geissdoerfer e collaboratori, (2017):

«un sistema rigenerativo nel quale ingresso di risorse, spreco di rifiuti, emissioni ed energia vengono ridotti al minimo [...] attraverso design di lunga durata, manutenzione, riparazione, riuso, rimaneggiamento, ristrutturazione e riciclo.»

Nell'ambito delle biotecnologie algali, uno dei campi di applicazione più promettenti e che bene si collima con i dettami dell'economia circolare è l'uso di digestati come terreno di coltura per la crescita di microalghe (Bjornsson et al., 2013; Buono et al., 2016; Chaiprapat et al., 2017; Hultberg et al., 2017; Massa et al., 2017; Monlau et al., 2015; Yu et al., 2017; Zuliani et al., 2016). Con digestato si intende un sottoprodotto della digestione anaerobica o AD (*Anaerobic Digestion*) di materia organica operata da popolazioni batteriche in condizioni anossiche per la produzione di biogas (Bjornsson et al., 2013). La materia organica in questione può provenire da scarti di produzione agricola e rifiuti alimentari, liquami e letami da allevamenti di suini e bovini, acque reflue, colture energetiche (i.e. produzione di biomassa a scopi energetici come il mais) o altre fonti (Fig. 5).

Il digestato così formato è composto generalmente da una frazione solida (SD, *Solid Digestate*) ed una invece liquida (LD, *Liquid Digestate*): è proprio quest'ultima a trovare un potenziale impiego come terreno di coltura per le microalghe (Massa et al., 2017). La composizione dei LD infatti, seppur varia e fortemente dipendente dalla biomassa introdotta nel digestore, è caratterizzata da un'alta percentuale di nutrienti: in particolare sono presenti nitrati e solfati ma anche diversi ioni quali K^+ , Na^+ e Cl^- . Al contrario, il contenuto di fosfati e di carbonio organico sembra essere piuttosto scarso rispetto ai normali fertilizzanti o terreni di sintesi (Uggetti et al., 2014). Oltre ai nutrienti possono essere presenti particelle in sospensione, colloidali, polveri, residui di materiale organico, zuccheri e proteine come anche componenti biologiche (Akhiar et al., 2017). Spesso il pH dei digestati risulta leggermente alcalino (c.a. > 7.5) e, poiché l'impianto di produzione si può trovare in condizioni mesofile (c.a. $35\text{ }^\circ\text{C}$) oppure termofile (c.a. $55\text{ }^\circ\text{C}$), il processo esotermico di AD va a formare calore residuo che resta nei suoi sottoprodotti (Monlau et al., 2015).

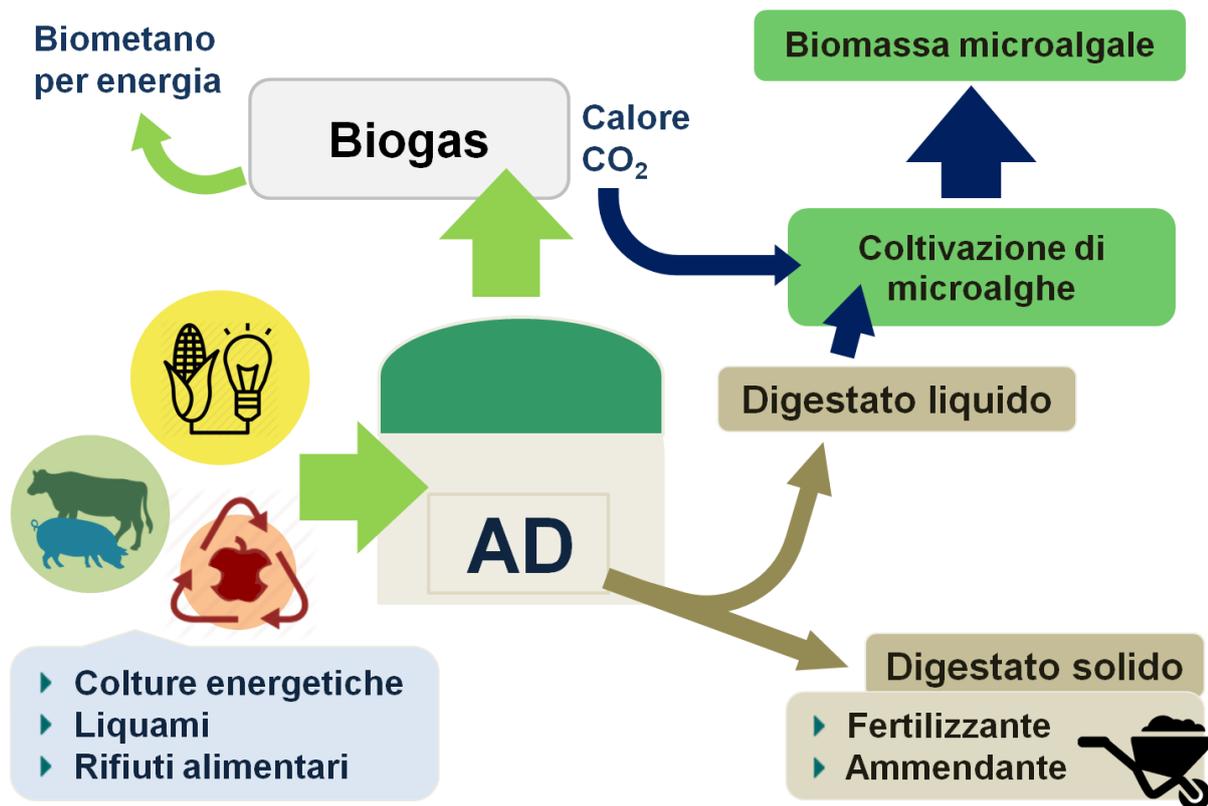


Fig. 5 – Schema generico di un impianto di produzione di biogas. Il materiale organico viene degradato dalle popolazioni batteriche che in assenza di ossigeno producono biogas. I prodotti di scarto (LD, calore, CO₂) possono essere impiegati per produrre biomassa algale.

Il biogas grezzo prodotto durante il processo di AD è composto da una miscela (v/v) costituita prevalentemente da CH₄ (40-75%) e CO₂ (15-60%), più alcuni componenti in traccia come il H₂S (0,005-2%) (Ryckebosch et al., 2011 e citazioni all'interno); per purificare il biogas ed ottenere CH₄ in percentuale al 90-95% (v/v) sono normalmente impiegati dei filtri a carboni attivi che adsorbono alcune delle componenti gassose presenti e le trattengono per una successiva ossidazione biologica tramite batteri oppure vengono aggiunti dei sali ferrosi e ossigeno; questi approcci risultano abbastanza efficaci per le componenti in traccia ma non per la CO₂ la quale viene rimossa attraverso altre procedure chimico/fisiche talvolta costose (Ryckebosch et al., 2011). L'impiego di CO₂ presente nel biogas per la coltivazione di microalghe rappresenterebbe una valida alternativa a basso costo per la sua rimozione dal biogas in quanto può essere impiegata per l'ottimizzazione delle colture microalgali e per la produzione di prodotti a base di microalghe collocabili sul mercato, riducendo così i costi di separazione della CO₂ dal CH₄ (Mann et al., 2009; Prajapati et al., 2013).

I digestati liquidi possono risultare dannosi se dispersi senza controllo nell'ambiente a causa dell'elevato contenuto di forme azotate che possono dar luogo a possibili fenomeni di

eutrofizzazione, mentre se reimpiegato per le colture microalgali può aiutare ad abbattere i già citati onerosi costi relativi dell'apporto di nutrienti (Massa et al., 2017; Zuliani et al., 2016). Inoltre, all'interno del concetto di economia circolare, lo stesso *surplus* di calore residuo originato dal digestore, potrebbe essere reimpiegato per riscaldare le serre o i locali adibiti alla coltivazione di microalghe prettamente estive o poco tolleranti al freddo nei periodi invernali (Monlau et al., 2015). In conclusione è quindi possibile produrre biomassa microalgale a partire dai diversi prodotti di scarto della AD e la biomassa, come si è visto, potrà poi essere indirizzata ad altre applicazioni.

Tuttavia esistono comunque alcune problematiche inerenti l'utilizzo di LD per la coltivazione di microalghe: alcuni studi hanno infatti mostrato che le alghe presentano tassi di crescita più bassi e che ci sono maggiori probabilità che si formino specie indesiderate nella coltura (Gao and Li, 2011; Vasseur et al., 2012). Inoltre, le caratteristiche macroscopiche dei LD (materiale particellato in sospensione, colloidali, materiale disciolto, opacità del mezzo) li rendono meno penetrabili alla luce a causa dell'alta densità ottica, con la conseguenza che è spesso necessario diluirli per poterli impiegare efficacemente (Marazzi et al., 2017; Marcilhac et al., 2014). Oltre a ciò, l'azoto nel mezzo spesso si ritrova sottoforma di ammonio ($N-NH_4^+$) che in concentrazioni troppo elevate risulta tossico per molte microalghe inibendone la crescita.

A causa di questi aspetti, il digestato spesso non può essere impiegato tal quale ma necessita di un pretrattamento prima di poter essere impiegato nella coltivazione microalgale (Monlau et al., 2015). Ad esempio per ridurre il carico iniziale di NH_4^+ il pretrattamento più impiegato finora è la diluizione del LD la quale consente anche una riduzione dell'opacità del mezzo (Chaiprapat et al., 2017; Yu et al., 2017). Possono essere utilizzati anche dei filtri in grado di limitare il passaggio nella coltura di componenti biologiche o particelle in sospensione oppure altre procedure chimico/fisiche: ad esempio Marazzi e collaboratori (2017) hanno recentemente riportato che il contenuto di NH_4^+ e l'opacità di digestato liquido pretrattato con adsorbimento su carboni attivi (AC) prodotti da biomasse lignocellulosiche a basso costo si riducesse significativamente; in particolare il digestato pretrattato è stato impiegato per la crescita di *Chlorella spp.* e *Scenedesmus spp.* ottenendo una migliore produttività in biomassa rispetto al digestato grezzo.

1.4.3.1. Normativa vigente sull'impiego dei digestati

Dato il crescente interesse nei confronti dei digestati e l'alta variabilità della loro composizione si è resa necessaria l'integrazione di alcune specifiche in materia giuridica,

che vadano a disciplinarne l'uso e a garantire la qualità dei prodotti finali. Per quanto concerne l'Europa, si parla per la prima volta di digestato con riferimento alla Direttiva 2008/98/CE sulla gestione dei rifiuti^[1] dove è però classificato come *rifiuto organico* ed il suo riutilizzo non viene pertanto contemplato. L'anno seguente, nel Regolamento n. 1069/2009 sulle norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale il digestato viene invece incluso come *sottoprodotto* della produzione di biogas e ne viene previsto l'impiego in campo agronomico, così come specificato dal Regolamento stesso:

«'Fertilizzanti organici' e 'ammendanti': materiali di origine animale utilizzati, separatamente o in combinazione, per preservare o migliorare il nutrimento dei vegetale nonché le proprietà fisiche e chimiche dei terreni e la loro attività biologica; possono includere stallatico, guano non mineralizzato, contenuto del tubo digerente, compost e residui della digestione.»^[2]

Ogni Stato Membro è tenuto a regolamentare produzione e impiego dei digestati e la normativa ne disciplina anche l'immissione nel mercato, a patto che questi:

- Derivino da materiali di categoria 2 e 3 (così come definiti dal Regolamento, materiali di origine animale che non costituiscono un rischio igienico-sanitario per la salute umana, animale o vegetale)
- Siano prodotti nel rispetto delle condizioni stabilite dalla CE in materia di prevenzione
- Provengano da stabilimenti e impianti riconosciuti o registrati

Disposizioni circa i parametri standard per la trasformazione e la qualità del digestato sono invece implementati nel successivo Regolamento (UE) n. 142/2011^[3].

^[1] Direttiva 2008/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 19 novembre 2008, relativa ai rifiuti e che abroga alcune direttive (Testo rilevante ai fini del SEE)

- <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/ALL/?uri=celex%3A32008L0098>

- Consultato il 29/09/2017

^[2] Regolamento (CE) n. 1069/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 ottobre 2009, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano e che abroga il regolamento (CE) n. 1774/2002 (regolamento sui sottoprodotti di origine animale)

- http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2009.300.01.0001.01.ITA

- Consultato il 29/09/2017

^[3] Regolamento (UE) n. 142/2011 della Commissione, del 25 febbraio 2011, recante disposizioni di applicazione del regolamento (CE) n. 1069/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano, e della direttiva 97/78/CE del Consiglio per quanto riguarda taluni campioni e articoli non sottoposti a controlli veterinari alla frontiera Testo rilevante ai fini del SEE

- <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=celex%3A32011R0142>

- Consultato il 29/09/2017

In Italia, l'attuazione più recente di tale regolamento è quella prevista dal Decreto Interministeriale n. 5046 del 25 Febbraio 2016 ^[4]. Il DM prevede che il digestato sia da considerarsi sottoprodotto della produzione di biogas se soddisfa i seguenti requisiti (art. 24):

- È prodotto in impianti aziendali ed interaziendali di AD autorizzati che sono alimentati da materie organiche specificate dalla norma (art. 22: «materiale agricolo o forestale naturale non pericoloso; materiale agricolo derivante da colture agrarie; effluenti di allevamento; acque reflue; residui dell'attività agroalimentare che non contengano sostanze pericolose; acque di vegetazione dei frantoi oleari e sanse umide anche denocciolate; sottoprodotti di origine animale; materiale agricolo e forestale non destinato al consumo»)
- È certo che il digestato sarà utilizzato a fini agronomici da parte del produttore o di terzi, utilizzato direttamente senza alcun ulteriore trattamento diverso dalla normale pratica industriale (e.g. *chiarificazione*)
- Deve avere caratteristiche di qualità che rispondano coerentemente alle vigenti norme igienico-sanitarie e di tutela ambientale previste

I Regolamenti comunitari ed il Decreto Interministeriale tuttavia regolano l'impiego di digestato come fertilizzante organico senza però specificare un suo eventuale utilizzo come terreno di coltura per la crescita di microalghe. Le uniche disposizioni in materia di coltivazione microalgale da parte della CE riguardano esclusivamente la sicurezza e l'introduzione nel mercato alimentare di prodotti a base di microalghe nonché l'uso di microalghe OGM (Enzing et al., 2014), mentre il tema della coltivazione microalgale è solo in parte approfondito nell'ambito del Regolamento di Esecuzione 2016/673 ^[5] relativo alla *produzione biologica*, dove è specificato che la regolamentazione della coltivazione (biologica) di alghe è da applicarsi anche alle microalghe, in quanto (Art. 6 bis):

«[...] il termine «alghe marine» comprende le alghe marine pluricellulari, il fitoplancton e le microalghe».

^[4] Decreto Interministeriale n. 5046 del 25 Febbraio 2016, “Criteri e norme tecniche generali per la disciplina regionale dell'utilizzazione agronomica degli effluenti di allevamento e delle acque reflue, nonché per la produzione e l'utilizzazione agronomica del digestato”, di cui all'art. 52, comma 2-bis del decreto legge 22 giugno 2012, n. 83, convertito in legge 7 agosto 2012 n. 134.

- <https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/9780>

– Consultato il 29/09/2017

^[5] Regolamento di esecuzione (UE) 2016/673 della Commissione, del 29 aprile 2016, che modifica il regolamento (CE) n. 889/2008 recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici, per quanto riguarda la produzione biologica, l'etichettatura e i controlli (Testo rilevante ai fini del SEE)

- <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=celex:32016R0673>

– Consultato il 29/09/2017

1.5. Generalità sulle diatomee (*Bacillariophyceae*)

Le *Bacillariophyceae* o diatomee (phylum: *Heterokonta*) sono un'ampia classe di microalghe unicellulari ubiquitarie largamente diffuse negli ambienti marini e dulciacquicoli. Sono organismi essenzialmente solitari ma talvolta li si possono trovare aggregati in colonie filamentose (e.g. *Skeletonema costatum*). Costituiscono un gruppo molto numero e si stimano oltre 10^5 specie con dimensioni che spaziano fra i 10 ed i 200 μm . (Kooistra et al., 2007). Come produttori primari costituiscono una componente predominante negli oceani, in particolare in primavera ed autunno, e contribuiscono inoltre significativamente al riciclo dei nutrienti e del carbonio. Essendo organismi essenzialmente non motili, le diatomee si ritrovano prevalentemente in acque turbolenti e ricche in nutrienti per il proprio sostentamento (in accordo con il Mandala di Margalef, 1978), ma anche la loro distribuzione dipende anche da altri fattori quali i pigmenti, l'adattamento all'alta o bassa luce, la temperatura e la salinità (Glibert, 2016).

A differenza di altre microalghe le diatomee presentano un involucro esterno costituito da biosilice (diossido di silicio idrato, $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) e componenti organiche denominato nel complesso *frustulo*. Il rivestimento siliceo finale è composto da due porzioni che dividono simmetricamente l'alga: la porzione superiore prende il nome di epiteca mentre quella inferiore è detta ipoteca. Epiteca ed ipoteca si combinano fra loro analogamente ad una scatola provvista di coperchio. La superficie laterale di queste porzioni è chiamata *cingolo* mentre quella basale è detta *valva*. Lungo tutte le superfici del frustulo sono presenti dei pori il cui diametro è compreso in un range di 10-1000 nm (Venkatesan et al., 2015a): questi consentono il passaggio di metaboliti e altri composti disciolti in acqua, ovviando al problema dell'impermeabilità e rigidità del frustulo (Andersen, 2013). Dal momento che le diatomee sono prive di flagelli, in valve e cingolo si ritrovano con facilità spine o altre strutture adibite al galleggiamento. Le diatomee si presentano soprattutto nelle forme centriche e pennate che sono le più diffuse. Nel primo caso, la simmetria del frustulo è raggiata e si dirama a partire da una regione più centrale mentre le diatomee pennate presentano una simmetria bilaterale che taglia la cellula per tutta la sua lunghezza. In quest'ultimo caso può anche essere presente un vero e proprio solco chiamato *rafe* che ricalca la sua simmetria; le specie provviste di rafe spesso hanno la capacità di secernere sostanze polisaccaridiche che consentono loro di spostarsi per scivolamento lungo le superfici solide, in risposta soprattutto a cambiamenti di luce o nutrienti

Le diatomee si riproducono essenzialmente per scissione cellulare, tuttavia questo processo porta ad una diminuzione progressiva delle dimensioni delle cellule: ciò accade poiché al

momento della divisione la cellula madre fornisce a ciascuna delle cellule figlie una delle due porzioni del frustulo: indipendentemente dalla porzione ricevuta, le cellule figlie costruiscono sempre e solo l'ipoteca impiegando il frammento di frustulo ereditato come stampo (i.e. epiteca). La conseguenza finale è che una delle due cellule risulterà più piccola dell'altra e questo *trend* si ripete nelle diverse generazioni figliali. Quando le dimensioni del frustulo diventano eccessivamente piccole, le diatomee ricorrono alla riproduzione sessuale. Dal punto di vista cellulare, le diatomee presentano una composizione biochimica vicina a quella di altre microalghe con 30-50% di proteine, 20-40% di lipidi e 8-15% di carboidrati espressi su peso secco (Hu, 2013). Alcune specie sono maggiormente ricche in lipidi che possono arrivare anche a costituire un 50-60% in peso secco (Ramachandra et al., 2009) rendendole ottime candidate per la produzione di biodiesel (Radakovits et al., 2010). Nelle diatomee, caratterizzate da cloroplasti a quattro membrane originati da eventi di endosimbiosi secondaria (Moustafa et al., 2009), si ritrovano clorofilla *a* e c_1+c_2 . Fra i pigmenti accessori si annoverano β -carotene e delle peculiari xantofille: diatoxantina, diadinoxantina ma soprattutto fucoxantina alla quale è attribuita la colorazione giallo-brunastra tipica delle diatomee (Peng et al., 2011). Nel complesso, questi pigmenti possono costituire fino ad un 5% sul peso secco (Lee et al., 2013). La restante frazione percentuale è rappresentata dalla biosilice e dalle ceneri.

1.5.1. *Phaeodactylum tricorutum*: inquadramento tassonomico ed impieghi

L'organismo oggetto di questo studio è la diatomea *Phaeodactylum tricorutum*. Si tratta di una microalga unicellulare collocata ad oggi nella classe delle *Bacillariophyceae* con *incertae sedis*: la sua classificazione ha subito infatti varie controversie in quanto tale organismo presenta una componente silicea piuttosto scarna rispetto a qualunque altra diatomea.

È un organismo pleioformo che si presenta quindi in diversi morfotipi: ovale, fusiforme e triradiata, da cui il nome *tricorutum* (Fig. 6). La caratteristica struttura silicea è presente solo nella conformazione ovale a livello del rafe che è oltretutto assente nelle altre due forme (Borowitzka and Volcani, 1978). Descritta per la prima volta Bohlin nel 1897 come nuovo genere di alga unicellulare, la posizione tassonomica di *P. tricorutum* è stata proposta definitivamente solo nel 1958. Come si è detto, quest'organismo presenta dei tratti attribuibili alle diatomee, tuttavia l'assenza in particolare della parete silicea nei morfotipi fusiforme e triradiato ha richiesto la creazione di un genere a parte che contiene solo questa specie (Lewin, 1958).

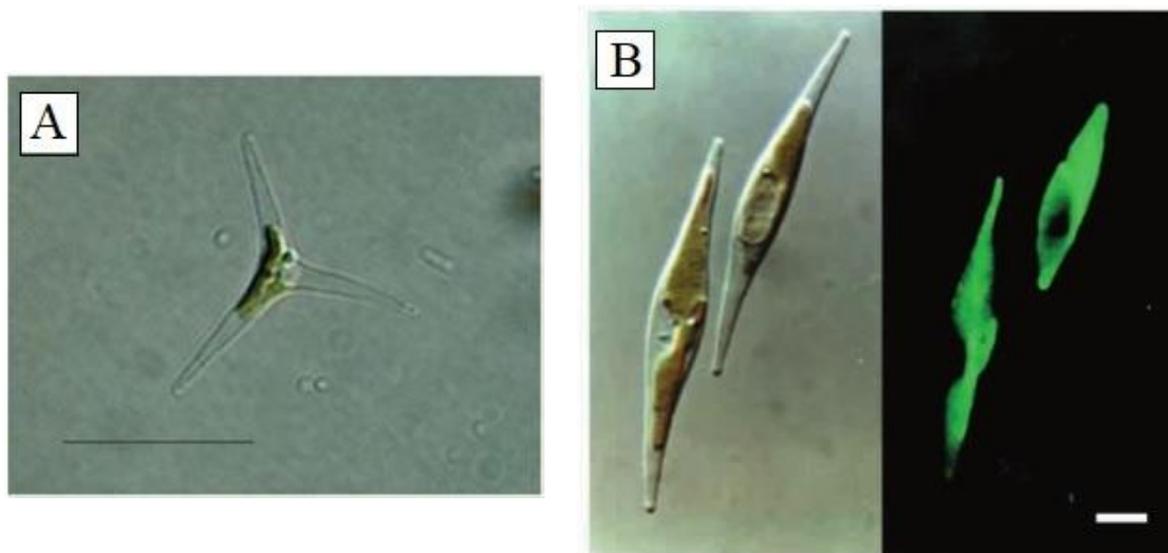


Fig. 6 – Fotografia di *P. tricornutum* al microscopio ottico in cui sono evidenziati i morfotipi triradiato (6.a) e fusiforme (6.b) (Apt, 2002; Tesson et al., 2009)

L'attuale posizione tassonomica è così riportata (Guiry and Guiry, 2017):

REGNO:	<i>Eukaryota</i>
DOMINIO:	<i>Chromista</i>
PHYLUM:	<i>Bacillariophyta</i>
CLASSE:	<i>Bacillariophyta classis incertae sedis</i>
ORDINE:	<i>Bacillariophyta ordo incertae sedis</i>
FAMIGLIA:	<i>Phaeodactylaceae</i>
GENERE:	<i>Phaeodactylum</i>
SPECIE:	<i>tricornutum</i>

Il morfotipo ovale è generalmente attribuito ad un ambiente bentonico e ha caratteristiche di motilità grazie al rilascio di sostanze polisaccaridiche dal rafe (Willis et al., 2013), mentre quelli triradiato e fusiforme si ritrovano più facilmente nella colonna d'acqua (Tesson et al., 2009). Sulla base del DNA sequenziato dal Joint Genome Institute (Nordberg et al., 2014), De Martino e collaboratori (2007) hanno caratterizzato quattro distinti genotipi di quest'organismo che potrebbero avere implicazioni proprio sui diversi morfotipi, tuttavia la morfologia di quest'alga potrebbe dipendere da condizioni di stress ambientale quali luce, temperatura e nutrienti non ottimali. *P. tricornutum* è piuttosto ubiquitaria e numerosi sono i ceppi disponibili; De Martino e collaboratori riportano 10 ceppi fra i più noti e studiati (Pt1 – Pt10) con i rispettivi luoghi di isolamento: Regno Unito (Blackpool, Plymouth); Finlandia

(isola di Segelskär, Åland); U.S.A. (dal Golfo del Maine fino alla Great South Bay di Long Island, NY); Canada (Jericho Beach a Vancouver); Stati Federati di Micronesia (arcipelago delle Marianne). È interessante notare come la maggior parte di questi ceppi sia stata isolata in zone appartenenti all'emisfero settentrionale non vicine all'equatore in acque caratterizzate da basse temperatura, suggerendo una distribuzione temperatura e luce dipendente; tuttavia *P. tricornutum* è stato isolato da campioni provenienti da zone con climi più tropicali e caldi: alcuni autori riportano la sua presenza in Mar Adriatico, Taiwan, Cina, Messico e Brasile (Eskinazi-Leça et al., 2010; Viličić et al., 2002; Xu et al., 2016).

La caratterizzazione biochimica di *P. tricornutum* effettuata da Reboloso-Fuentes e collaboratori (2001) vede una composizione media, espressa su peso secco, di (a) 36,4% di proteine, (b) 26,1% di carboidrati, (c) 18,0% di lipidi e un restante (d) 15,9% di ceneri. Tuttavia, il contenuto dei vari componenti cellulari va rapportato alla specifica fase di crescita della microalga e al sistema di coltivazione adottato ma anche alle condizioni ambientali che promuovono spesso una concentrazione maggiore di lipidi (Juneja et al., 2013; Mata et al., 2010); Rodolfi e collaboratori (2009) hanno riportato per esempio per *P. tricornutum* un contenuto lipidico del 18,7% su peso secco della biomassa, pari ad una produttività lipidica di 44.8 mg di lipidi per litro di coltura al giorno.

P. tricornutum è una diatomea caratterizzata da elevati tassi di crescita ed è in grado di produrre considerevoli quantità di lipidi di riserva nella forma di TAGs (Hamilton et al., 2016) i quali possono fungere da fonte di acidi grassi saturi e monoinsaturi; gli acidi grassi algali possono essere convertiti in biodiesel per transesterificazione, aggiungendo quindi un importante valore economico e commerciale a questa diatomea (Qiao H; Wang, 2015; Salam et al., 2016; Yusuf, 2007). In aggiunta quest'alga non presenta grosse difficoltà di coltivazione poiché non necessita di medium di coltura particolarmente arricchiti: spesso infatti sono sufficienti scarti di produzione come digestato o acque reflue (Buono et al., 2016; Massa et al., 2017; Rodolfi et al., 2009).

Negli ultimi anni l'interesse per quest'alga si è quindi mosso verso l'ottimizzazione della produzione di acidi grassi adatti alla conversione di biodiesel, anche attraverso l'ingegneria genetica sia in termini di quantità totale di lipidi che di qualità degli acidi grassi stessi, con particolare riferimento agli acidi grassi a catena corta, più resistenti all'ossidazione e maggiormente adatti ad essere convertiti in biodiesel che sono prevalentemente incorporati nei TAGs (Radakovits et al., 2011).

Nonostante le migliorie tecniche e le strategie di coltivazione, i costi di produzione del biodiesel sono ancora troppo elevati e ad oggi il principale interesse legato alla coltivazione

di *P. triornutum* è dato dalla sua capacità di produrre abbondanti quantità di PUFAs, acidi grassi polinsaturi presenti soprattutto nei lipidi strutturali (e.g. membrane tilacoidali) che trovano una buona allocazione nel mercato farmaceutico, nutraceutico e dell'acquacoltura (Fernández et al., 2000; Hamilton et al., 2014; Jiang and Gao, 2004; Radakovits et al., 2011). Fra i PUFAs di maggiore interesse commerciale si è visto che quest'alga è in grado di accumulare fino al 35% di EPA sul totale degli acidi grassi (Hamilton et al., 2014); questo composto è un importante omega-3 implicato in alcuni processi dell'accrescimento e sviluppo degli organismi e in grado di contribuire alla riduzione del rischio associato all'insorgenza di malattie cardiovascolari (Doughman et al., 2007; Santos-Sánchez et al., 2016). Oltre a questi effetti, è stata osservata un'attività antibatterica *in vitro* a carico di cellule lisate di *P. triornutum* la quale è stata attribuita proprio all'EPA assieme anche all'acido esadecatrienoico (HTA, 16:3) e all'acido palmitoleico (16:1, monoinsaturo). Questi tre acidi grassi hanno mostrato attività antibatterica anche contro batteri farmaco-resistenti (i.e. *Staphylococcus aureus*) e pertanto si è pensato ad un loro potenziale impiego in alcuni presidi topici contro le infezioni (Desbois et al., 2009, 2008).

Gli elevati tassi di crescita di *P. triornutum* ed il basso contenuto di biosilice rispetto ad altre diatomee, uniti alla frazione proteica dell'alga e all'alta percentuale di EPA prodotto coi suoi potenziali effetti antibatterici, ne fanno un organismo notevolmente adatto al settore dell'acquacoltura (Borowitzka, 2013).

2. SCOPO DELLA RICERCA

Ad oggi diverse specie microalgali vengono coltivate su larga scala e indirizzate a svariate applicazioni di impiego; tra queste, la diatomea *Phaeodactylum tricornerutum* rappresenta sicuramente una delle più versatili con elevati tassi di crescita e possibilità di utilizzo in vari ambiti economici quali quello energetico per la produzione di biodiesel, nei settori della nutraceutica e della cosmesi nonché in acquacoltura, il tutto grazie al suo interessante profilo biochimico che comprende numerosi composti bioattivi di interesse commerciale. I costi tuttavia per la produzione su larga scala risultano ancora proibitivi, limitando le potenzialità applicative per questa specie.

L'utilizzo di acque reflue per la crescita di microalghe potrebbe ridurre la spesa legata ai terreni di coltura (c.a. 20% dei costi totali) con la possibilità di abbassare ulteriormente i costi abbinando l'utilizzo di CO₂ di recupero proveniente da processi industriali. Anche in questo caso *P. tricornerutum* si è dimostrata una scelta vincente portando, oltre al beneficio della fitodepurazione, un valore aggiunto dal punto di vista economico ed un buon rendimento. Recentemente l'interesse della comunità scientifica si è spostato sulle potenzialità di impiego di digestati liquidi, prodotti di scarto ricchi di nutrienti derivanti dalla produzione industriale di biogas, come terreni di coltura per la crescita di microalghe. Nella pratica, però, si tratta di un argomento relativamente nuovo e non sottoposto a specifica regolamentazione. In effetti gli studi svolti finora hanno riguardato principalmente colture *batch* dai volumi contenuti ed in condizioni controllate, mentre prove su larga scala in regime continuo o semi-continuo sono pressoché inesistenti. Proprio la mancanza di tali studi rende necessaria un'approfondita indagine su come le diverse condizioni di coltura, a partire dal tipo di sistema adoperato in combinazione con i digestati ed eventualmente CO₂ di scarto, influenzino la resa e l'accumulo dei composti in questi organismi.

L'elaborato di tesi si inserisce quindi in quest'ottica, ponendosi come obiettivo quello di valutare la crescita e la composizione di *P. tricornerutum* su una frazione di digestato liquido (DEC) studiando le migliori condizioni ambientali e operative di crescita, valutando la produttività della diatomea in due diversi sistemi di coltivazione su larga scala (300-1000 L) a confronto fra loro, PBR e vasche. In particolare sono state enfatizzate le variazioni dei principali componenti della biomassa algale ed il profilo degli acidi grassi, valutando i composti di maggiore interesse commerciale e le eventuali applicazioni.

Il lavoro si è sviluppato in due fasi principali così schematizzate:

i. Fase iniziale in *batch* – crescita su DEC sotto due diversi regimi di CO₂

Una prima parte del lavoro è stata effettuata in colture *batch* in condizioni di luce e temperatura costanti, allo scopo di valutare la quantità di CO₂ utile all'ottimizzazione della crescita di *P. tricornutum* su una frazione di digestato liquido. In questo senso sono state valutate la crescita dell'alga, il consumo dei nutrienti e la composizione biochimica, nonché l'efficienza fotosintetica per studiare eventuali situazioni di stress e relative cause.

ii. Fase di confronto PBR e vasche – crescita su DEC in prototipi per la coltivazione su larga scala

P. tricornutum è stato fatto crescere dapprima su un terreno sintetico standard in un PBR ed una volta raggiunto un'adeguata concentrazione della biomassa, le alghe sono state inoculate con il DEC nello stesso PBR e in un due vasche (VA e VB) poste in serre sperimentali. In tutti i sistemi è stata somministrata la CO₂ a concentrazioni ottimali per la crescita, sulla base dei risultati ottenuti nella precedente fase in *batch*, e sono state effettuate valutazioni sulla efficienza di rimozione dei nutrienti, sulla produttività e sulla composizione biochimica delle alghe; questi dati sono stati posti in relazione alle variazioni dei parametri ambientali come luce e temperatura. I risultati sono stati quindi confrontati fra loro per capire quali fossero i sistemi di coltivazione su larga scala che consentivano la migliore performance in termini di produttività e di composizione cellulare.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Disegno sperimentale e allestimento delle colture

L'intera sperimentazione si è svolta da fine Novembre 2016 a metà Marzo 2017, in parte presso il laboratorio di Biologia delle Alghe dell'Università di Bologna presente nel Campus di Ravenna (RA) ed in parte presso l'azienda Micoperi Blue Growth s.r.l. (MBG, <http://www.micoperibg.eu/>) sita anch'essa a Ravenna (RA): quest'azienda si occupa di ricerca e sviluppo per la commercializzazione di estratti di microalghe e per loro potenziali applicazioni nei settori farmaceutico, alimentare ed agricolo.

3.1.1. Fase iniziale: crescita di *P. tricornutum* in colture batch

Le prove di crescita di *P. tricornutum* sulla frazione di digestato liquido sono state effettuate partendo da una coltura mono-specifica mantenuta in terreno standard F2 modificato; inizialmente è stata effettuata una fase di adattamento dell'alga al medium costituito da una frazione di un digestato liquido (DEC) allestendo una coltura con una diluzione 1:2 (v/v) del terreno sintetico F2 con DEC. Dopo alcuni giorni di adattamento sono state allestite colture batch di *P. tricornutum* sottoposte a due diverse condizioni di somministrazione di CO₂; le prove sono state effettuate in triplicato ($n = 3$), in bottiglie da 1 L contenenti ciascuna 150 ml di coltura dalla beuta madre e 850 ml di DEC non diluito.

Ciascuna coltura veniva agitata attraverso l'uso di un agitatore magnetico ed insufflata con aria in maniera continua. Durante la sperimentazione, ad ogni replica veniva somministrata giornalmente CO₂ pura con un flusso costante di 0,067 L min⁻¹; le due diverse condizioni sperimentali differivano per la durata del tempo di la somministrazione di CO₂ pura che nel primo caso era di 10 minuti (PT.10) e nel secondo di 20 minuti (PT.20). Per rendere più omogeneo l'esperimento ed evitare errori sistematici, gli insufflatori delle singole repliche sono stati collegati all'impianto di aerazione in maniera casuale ogni giorno ed il rifornimento di CO₂ è stato effettuato preferenzialmente durante la mattinata per incentivare i processi di fotosintesi luce-dipendenti.

La tabella 5 riporta le condizioni generali delle colture e le analisi effettuate.

<i>Batch</i> (DEC)		
Periodo e durata	30/11/2016 – 16/12/2016 ($t = 16$ giorni).	
Temperatura	$17,1 \pm 1,1$ °C	
Analisi svolte		
Analisi giornaliere	pH	ogni giorno prima e dopo la somministrazione di CO ₂
	T° ambiente	min e max del locale interno
Analisi settimanali (a giorni alterni)	Valutazione della crescita	Torbidità, peso secco, conta cellulare
	Consumo dei nutrienti	Cromatografia ionica
	Efficienza fotosintetica	Analisi PAM (<i>yield</i> effettivo e <i>induction curve</i>)
Raccolta della biomassa a fine coltura (in fase stazionaria avanzata)	Caratterizzazione cellulare su biomassa liofilizzata	Lipidi e FAs, proteine, polisaccaridi, pigmenti e composizione elementare (CHN e P intracellulare)

Tab. 5 – Condizioni e analisi svolte durante la fase di sperimentazione in *batch* con DEC

3.1.2. Fase di confronto: Crescita di *P. tricornutum* in PBR e in vasche

In questa fase sperimentale è stato effettuato un confronto della crescita di *P. tricornutum* in PBR posti in una serra sperimentale sia con terreno sintetico (F2, modificato aumentando la concentrazione dei macronutrienti) che utilizzando come medium di coltura una frazione di un digestato liquido (DEC); il PBR impiegato per queste prove è un sistema a colonna anulare da 270 L posto in una serra sperimentale di MBG dove la coltura veniva insufflata con CO₂ pura ad un flusso costante di 1 L min⁻¹ per circa 2 h ogni 2 o 3 giorni per un totale di 640 L di CO₂ durante l'intero monitoraggio. Attraverso la somministrazione di CO₂ il pH è stato portato alle condizioni ottimali di crescita per *P. tricornutum* come precedentemente osservato nella fase in *batch* ($\text{pH} \cong 7,0 \pm 0,5$). Durata e periodo della sperimentazione, parametri ambientali e analisi eseguite sono riportati nella tabella 6. Una volta raggiunto il regime ottimale di crescita, parte della coltura di *P. tricornutum* è stata impiegata per reinoculare il PBR stesso con DEC e per fare partire le prove in vasca. Analogamente all'esperimento con terreno sintetico, il pH del PBR con DEC è stato monitorato mediante la somministrazione di CO₂ pura con un flusso costante di 1 L/min a giorni alterni per un totale di 980 L. Per questa fase sperimentale sono state allestite due vasche (VA e VB) in

vetroresina dalla capacità di 1000 L ciascuna poste in una serra sperimentale. VA è stata inoculata inizialmente con 200 L di coltura ottenuta dal PBR e 300 L di DEC per un volume iniziale di 500 L; tale volume è stato progressivamente aumentato fino al raggiungimento di 1000 L con l'aggiunta di DEC; VB è stata allestita solo successivamente, a partire dalla coltura di VA. In entrambe le vasche, una volta raggiunto il massimo volume consentito, le colture sono state seguite fino al loro decadimento e l'aggiunta di DEC è stata effettuata solamente per compensare l'evaporazione del mezzo in questi sistemi all'aperto. Nelle vasche è stato predisposto un sistema di 3 aeratori per acquari collegati con cavi in PVC alla bombola di CO₂ che consentivano di eseguire la somministrazione del gas mediante microbolle in dissoluzione. In particolare le due vasche non sono state considerate due repliche ai fini del lavoro ma sono state sottoposte a due diverse condizioni: VA è stata insufflata regolarmente con CO₂ pura analogamente a quanto eseguito per il PBR monitorando che il valore del pH arrivasse alle condizioni ottimali ($\text{pH} \cong 7,0 \pm 0,5$). Per stimare il ruolo dello scambio liquido-superficie della CO₂, VB è stata saltuariamente sottoposta a trattamento con CO₂ solamente quando il valore del pH saliva eccessivamente ($\text{pH} > 9,0$). A differenza delle prove in *batch* e nei PBR, tutte le analisi nelle vasche sono state eseguite a cadenza settimanale, inoltre è stato difficile stimare la quantità totale di CO₂ utilizzata a causa della dispersione atmosferica dal mezzo.

Le condizioni generali e le analisi svolte in questa fase sono riportati nelle tabelle 7.a e 7.b.

PBR (F2 modificato)		
Periodo e durata	12/01/2017 – 02/02/2017 ($t = 21$ giorni)	
Temperatura °C	4,8 – 16,1	
Luminosità media	10452,50 ± 6714,29 lux	
Analisi svolte		
Analisi giornaliere	pH	ogni giorno prima e dopo la somministrazione di CO ₂
	Valutazione della crescita	Torbidità, peso secco, conta cellulare
Analisi settimanali (a giorni alterni)	Efficienza fotosintetica	Analisi PAM (<i>yield</i> massimo/effettivo)
	Caratterizzazione cellulare su biomassa liofilizzata	Lipidi e FAs, proteine, polisaccaridi, pigmenti e composizione elementare (CHN e P intracellulare).

Tab. 6 – Condizioni e analisi svolte durante la fase di sperimentazione in PBR con F2

PBR (DEC)			
	Periodo e durata	Temperatura °C	Luminosità media
PBR + DEC	03/02/2017 – 09/03/2017 (<i>t</i> = 34 giorni)	9,6 – 25,6	27302,00 ± 16421,45 lux
Analisi svolte			
Analisi giornaliere	pH	ogni giorno prima e dopo la somministrazione di CO ₂	
	Valutazione della crescita	Torbidità, peso secco, conta cellulare	
Analisi settimanali (a giorni alterni)	Consumo dei nutrienti	Cromatografia ionica	
	Efficienza fotosintetica	Analisi PAM (<i>yield</i> massimo/effettivo)	
	Caratterizzazione cellulare su biomassa liofilizzata	Lipidi e FAs, proteine, polisaccaridi, pigmenti e composizione elementare (CHN e P intracellulare).	
Vasche (DEC)			
	Periodo e durata	Temperatura °C	Luminosità media
VA + DEC	03/02/2017 – 14/03/2017 (<i>t</i> = 39 giorni)	9,6 – 26	29747,27 ± 17883,13 lux
VB + DEC	15/02/2017 – 14/03/2017 (<i>t</i> = 27 giorni)	12,4 – 26	31112,00 ± 17378,10
Analisi svolte			
Analisi giornaliere	pH	ogni giorno prima e dopo la somministrazione di CO ₂	
	Valutazione della crescita	Torbidità, peso secco, conta cellulare	
Analisi settimanali (1 volta a settimana)	Consumo dei nutrienti	Cromatografia ionica	
	Efficienza fotosintetica	Analisi PAM (<i>yield</i> massimo/effettivo)	
	Caratterizzazione cellulare su biomassa liofilizzata	Lipidi e FAs, proteine, polisaccaridi, pigmenti e composizione elementare (CHN e P intracellulare).	

Tab. 7 – Condizioni e analisi svolte in PBR con DEC (a.) e nelle vasche con DEC (b.)

3.2. Terreno di coltura

3.2.1. Frazione di un digestato liquido (DEC)

La crescita dell'alga è stata seguita utilizzando come terreno di coltura una parte della frazione liquida (DEC) ottenuta da processi industriali di digestione anaerobica. La frazione liquida del digestato è stata trattata con diverse processi (e.g. decantazione, centrifugazione, filtrazione) ottenendo vari sottoprodotti; dopo diversi test in colture algali eseguiti con alcuni di essi è stato scelto per le prove successive quello con la maggior trasparenza, il più basso contenuto di B.O.D. e di NH_4 e con una concentrazione media di NO_3 e PO_4 paragonabile a quella di un terreno standard di sintesi. Poiché questo digestato partiva da un valore di salinità relativamente basso ($3 \pm 1,5$ ‰) si è reso necessario effettuare un breve periodo iniziale di crescita della coltura in un terreno misto, per permettere all'alga, normalmente mantenuta a salinità più elevate (20-25 ‰), di adattarsi gradualmente ai valori più bassi. Il DEC utilizzato nella fase *batch* e nella fase di confronto fra PBR e vasche proviene dalla stessa lavorazione industriale ma la sua composizione è leggermente variabile nel tempo. Nella tabella 8 sono riportate le concentrazioni di N e di P nel DEC impiegato nella fase *batch*, nel PBR e nelle vasche.

	N- NO_2 (mg L^{-1})	N- NO_3 (mg L^{-1})	N tot. (mg L^{-1})	P- PO_4 (mg L^{-1})	[N] M	[P] M	N/P
<i>batch</i>	6,57	29,02	35,58	6,78	$2,54 \cdot 10^{-3}$	$2,19 \cdot 10^{-4}$	11,61
PBR e vasche	1,13	35,60	36,73	7,71	$2,62 \cdot 10^{-3}$	$2,49 \cdot 10^{-4}$	10,54
Media	$3,85 \pm 3,8$	$32,31 \pm 4,7$	$36,16 \pm 0,8$	$7,24 \pm 0,6$	$2,58 \cdot 10^{-3}$	$2,34 \cdot 10^{-4}$	11,04

Tab. 8 – Contenuto dei macronutrienti azotati e fosfati analizzati nel digestato DEC e loro rapporti molari

3.2.2. Terreno sintetico F2 di Guillard e Ryther

Nella fase precedente al confronto fra vasche e PBR, *P. tricornutum* è stato fatto crescere nel PBR con terreno sintetico F2 di Guillard e Ryther (1962), un medium di coltura standard ampiamente impiegato per la crescita di diverse microalghe e diatomee, modificato aumentando la concentrazione dei macronutrienti azotati e fosfati di 8 volte; la composizione del terreno F2 è riportata nella tabella 9.

Macronutrienti	[M]
NaNO ₃	8,82 x 10 ⁻⁴
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	3,62 x 10 ⁻⁵
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	1,06 x 10 ⁻⁴
Metalli in traccia	[M]
FeCl ₃ · 6H ₂ O	1,17 x 10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	1,17 x 10 ⁻⁵
MnCl ₂ · 4H ₂ O	9,10 x 10 ⁻⁷
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	7,65 x 10 ⁻⁸
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	4,20 x 10 ⁻⁸
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	3,93 x 10 ⁻⁸
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	2,60 x 10 ⁻⁸
Vitamine	[M]
Tiamina · HCl (vitamina B1)	2,96 x 10 ⁻⁷
Biotina (vitamina H)	2,05 x 10 ⁻⁹
Cianocobalammina (vitamina B12)	3,69 x 10 ⁻¹⁰

Tab. 9 – Composizione del terreno di coltura sintetico F2 di Guillard e Ryther (1962)

3.3. Valutazione della crescita

La crescita di *P. tricornutum* è stata valutata durante l'intera sperimentazione mediante tre metodi: torbidità o assorbanza a 750 nm, determinazione del peso secco (DW) e conta cellulare.

3.3.1. Torbidità

L'analisi della torbidità (*Abs* a 750 nm) è stata eseguita attraverso la misurazione spettrofotometrica con lettura della sospensione algale alla lunghezza d'onda (λ) di 750 nm: a questa lunghezza d'onda i pigmenti fotosintetici non assorbono e la quantità di luce assorbita dalla sospensione algale è correlata in maniera aspecifica alla biomassa algale e al numero di cellule presenti. Al momento dell'analisi i campioni sono stati opportunamente diluiti con acqua distillata per poter svolgere la lettura di *Abs* sotto il limite di linearità della curva di calibrazione (fattore di diluizione di 1:4 oppure 1:5 a seconda della densità ottica della sospensione algale di partenza). Da ogni campione è stato prelevato un volume compreso fra 3-5 ml e posto in una cuvetta di quarzo dal cammino ottico di 1 cm, poi

analizzati con lo strumento. Ad eccezione dei campioni del PBR con terreno sintetico standard, il valore di Abs è stato corretto con il valore di Abs del DEC opportunamente diluito con acqua distillata ($Abs_{finale} = Abs_{campione} - Abs_{DEC}$). L'analisi è stata effettuata con uno spettrofotometro a doppio raggio (Jasco, V-650) a giorni alterni per le colture *batch*, giornalmente per il PBR oppure al momento del campionamento per le vasche prima e dopo l'aggiunta di nuovo terreno DEC.

3.3.2. Peso secco

Per la valutazione del peso secco ($g L^{-1}$) è stata prelevata un'aliquota di 20 ml dalle colture microalgali e filtrata su filtri in microfibra di vetro (GF/C Whatman, $\varnothing = 47$ mm). Prima di procedere alla filtrazione, i filtri sono stati lasciati in stufa a $80\text{ }^{\circ}C$ per almeno 24 h e successivamente posti in essiccatore per 20 minuti per eliminare l'umidità, poi pesati con bilancia di precisione per valutare la tara. Per eliminare il contributo dei sali sul peso finale, i filtri contenenti l'alga sono stati lavati con 40 ml acqua distillata e successivamente posti in stufa a $80\text{ }^{\circ}C$ per 1 h e mezzo; dopo essere stati posti nell'essiccatore per 20 minuti sono stati pesati anch'essi su bilancia di precisione. La stessa procedura è stata eseguita anche per il DEC filtrando però un volume di 40 ml. La misura finale di DW è stata calcolata sottraendo il peso della tara al peso del filtrato algale e correggendo per il peso del DEC, in rapporto al volume filtrato e ottenendo così un risultato espresso in $g L^{-1}$. L'analisi del DW è stata eseguita in parallelo a quella dell'assorbanza in tutti gli esperimenti.

3.3.2.1. Produttività volumetrica di biomassa

Nel confrontare i diversi sistemi è stata valutata la produttività in biomassa giornaliera (P_b), ovvero la quantità di biomassa prodotta da un litro di coltura algale in un giorno, la quale è stata calcolata secondo la seguente equazione (Hempel et al., 2012):

$$P_b = \frac{(DW_2 - DW_1)}{(t_2 - t_1)}$$

$(DW_2 - DW_1)$ = variazione del peso secco fra il tempo t_2 ed il tempo t_1 (espresso in $g L^{-1}$)

$(t_2 - t_1)$ = intervallo di tempo considerato (espresso in giorni)

In particolare sono stati utilizzati come riferimento intervalli di tempo corrispondenti alla massima fase esponenziale e lineare di crescita. Il valore di P_b è espresso in $g L^{-1} day^{-1}$.

3.3.3. Conta cellulare

Per valutare l'accrescimento in termini di numero di cellule è stato effettuato un conteggio delle alghe in rapporto ad uno specifico volume di campione (cell ml^{-1}). Da ogni campione sono stati prelevati 5 ml di sospensione algale, trasferiti in provette di plastica e fissati con 3 gocce di reattivo di Lugol (soluzione fissativa iodio-iodurata). Di questi 5 ml di campione fissato, una parte è stata conservata per future osservazioni oppure in caso di errori, mentre per la conta è stata prelevata un'aliquota di 1 ml e diluita con acqua distillata in rapporto 1:200 (v/v). Da questo campione diluito è stata prelevata un'ulteriore aliquota di 1 ml e posta in camera di sedimentazione per 30 minuti prima dell'osservazione al microscopio.

Vista l'alta densità di coltura, si è deciso di procedere con il metodo della conta per campi osservando il numero di cellule presenti in circa 20 campi scelti casualmente dall'operatore. Il conteggio è stato effettuato utilizzando un microscopio ottico invertito (Zeiss Axiover S 100) con obiettivo 32x.

La stima del numero di cellule nel campione è stata calcolata come prodotto fra la media del numero di cellule osservate in ogni campo e il fattore F pari a 1497 (ottenuto dal rapporto fra l'area del pozzetto e l'area dell'oculare utilizzato) e moltiplicando per il corretto fattore di diluizione; il risultato finale è espresso in cell ml^{-1} .

La conta cellulare è stata svolta in tutti gli esperimenti ed analogamente ad assorbanza e peso secco.

3.3.3.1 Tasso di crescita specifico

Dai dati di conta cellulare è possibile ricavare il tasso di crescita specifica o *specific growth rate* (μ), ovvero la produzione di biomassa in termini di numero di cellule su millilitro di coltura e per giorno di coltura, così come descritto dall'equazione (Li et al., 2017):

$$\mu = \frac{\ln(N_1) - \ln(N_0)}{(t_1 - t_0)}$$

N_0 ; N_1 = numero di cellule rispettivamente al tempo t_0 e al tempo t_1

$(t_1 - t_0)$ = intervallo di tempo considerato (espresso in giorni)

Il tasso di crescita specifico è stato calcolato considerando il lasso di tempo, lungo la curva di crescita dell'alga, corrispondente alla fase esponenziale. Il valore di μ è espresso in day^{-1} .

3.4. Misura dell'efficienza fotosintetica con fluorimetro PAM

L'efficienza fotosintetica è stata misurata per valutare lo stato di salute dell'alga; in una cellula algale provvista di cloroplasti, i fotoni della sorgente luminosa raggiungono dapprima i complessi antenna o LHC (*Light-Harvesting Complex*) situati nella periferia dei fotosistemi: i LHC sono complessi pigmento-proteine che assorbono l'energia associata ai fotoni eccitandosi e diventando elettronicamente instabili. L'energia in eccesso viene trasferita dai LHC ai centri di reazione e in particolare al primo accettore della catena di trasporto degli elettroni, il plastochinone Q_A che avvia le reazioni fotochimiche passando dalla forma ossidata a quella ridotta. Questa energia in eccesso non viene però trasferita del tutto ai centri di reazione e viene dissipata in parte sotto forma di calore e in parte è emessa come fluorescenza; proprio le variazioni di fluorescenza, a carico soprattutto del PSII, possono essere rilevate nell'analisi PAM (*Pulse Amplitude Modulation*) e danno un'indicazione dell'efficienza fotosintetica, con la possibilità di valutare indirettamente quanta energia viene effettivamente impiegata nel processo fotochimico e quanta invece è dissipata (Maxwell and Johnson, 2000; Schreiber, 2004).

L'analisi è stata svolta con fluorimetro PAM ad impulsi di ampiezza modulata (101 con PDA-100, Walz, software WinControl): questo strumento consente di valutare nel complesso il processo di fotosintesi inviando impulsi luminosi alle cellule algali e, sulla base della risposta ottenuta, il metodo fornisce informazioni sul loro stato di salute. I campioni sono stati opportunamente diluiti col terreno di coltura per consentire un efficiente passaggio della luce al momento dell'analisi e sono stati posti al buio per 20 minuti; in questo modo i centri di reazione dei cloroplasti, coinvolti in prima battuta nelle reazioni fotochimiche, si rendono il più possibile disponibili alla luce nel tentativo di acquisire i pochi fotoni presenti, un fenomeno conosciuto come *effetto Kautsky* (Kautsky and Hirsch, 1931). Successivamente sono stati prelevati 3 ml di sospensione algale adattata al buio e posti in una cuvetta in quarzo con cammino ottico di 1 cm, evitando il più possibile l'ingresso di luce, poi analizzati col fluorimetro PAM.

In particolare nell'analisi fluorimetrica vengono impiegati due tipi di segnali luminosi, una luce di misura e una luce saturante, la loro intensità viene determinata attraverso una sonda a fibre ottiche che viene immersa nella cuvetta contenente il campione. Dapprima, lo strumento produce una luce di misura o BM (*Measuring Beam*) in grado di indurre una variazione della fluorescenza senza innescare il processo di fotosintesi; si tratta di una luce modulata, cioè viene accesa e spenta ad intermittenza ed essa permette di individuare il livello minimo di fluorescenza costante emesso dalle alghe chiamato F_0 indicando che in

questa fase i centri di reazione risultano “aperti” e pronti per la fotosintesi. Successivamente lo strumento produce una luce saturante o SAT *pulse*, caratterizzata un’elevata intensità pari circa a $3000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di brevissima durata ($< 1 \text{ s}$) in grado di saturare tutti i centri di reazione, in modo che questi risultino “chiusi” cioè incapaci di accettare altri elettroni da indirizzare alle reazioni fotochimiche. In risposta alla SAT *pulse* le cellule emettono la fluorescenza massima chiamata F_m e la differenza fra F_m e F_0 fornisce il valore F_v di fluorescenza variabile.

L’analisi fluorimetrica prosegue dopo il SAT *pulse* con l’accensione di luce attinica la quale è caratterizzata da uno spettro di lunghezze d’onda utili ad indurre la fotosintesi (PAR, *Photosynthetically Active Radiation*) e con un’intensità costante simile a quella alla quale erano sottoposte le cellule algali nella coltura. Nei primi secondi immediatamente successivi all’impulso saturante si registra però un aumento transitorio della fluorescenza, dovuto a una fase di latenza prima dell’inizio della fissazione del carbonio, in quanto una parte dei centri di reazione (in particolare Q_A) risulta ancora ridotta e in queste condizioni la luce attinica non è in grado di promuovere completamente il processo fotosintetico. La fluorescenza cala però nel tempo, fino al raggiungimento di un valore costante di fluorescenza definito F_t grazie alla progressiva ossidazione dei centri di reazione rendendo possibile l’attivazione dei processi fotochimici da parte della luce attinica. Fornendo un secondo SAT *pulse* si instaura nuovamente un altro meccanismo di saturazione dei centri di reazione ottenendo un nuovo valore di fluorescenza massima, generalmente più basso di quello di partenza del campione adattato dal buio e definito F'_m riferito all’adattamento alla luce attinica. I valori di fluorescenza ottenuti dall’analisi (F_0 ; F_m ; F_t ; F_v ; F'_m) vengono utilizzati per calcolare svariati parametri e fra questi, ai fini dell’elaborato sono stati considerati il rendimento quantico massimo (*yield* massimo o *dark yield*) ed il rendimento quantico effettivo (*yield* effettivo): per rendimento quantico massimo si intende la massima resa potenziale che si ha quando tutti i centri di reazione sono disponibili alla fotosintesi dopo l’adattamento al buio e viene calcolato dal rapporto:

$$(F_m - F_t)/F_m = F_v/F_m$$

Lo *yield* effettivo invece quantifica la reale porzione di energia associata ai fotoni della radiazione luminosa impiegata dai centri di reazione del PSII nel processo fotochimico

rispetto alla quantità totale di luce assorbita dal LHC, dando quindi una stima generica delle cellule attive fotosinteticamente e quindi in buono stato di salute e si ottiene dal rapporto:

$$(F'_m - F_t)/F'_m = F'_v / F'_m$$

In particolare per ottenere una misura più accurata di quest'ultimo parametro è stato eseguito il test di induzione o *Induction curve* (IC): dopo l'acquisizione dello rendimento quantico massimo il campione è stato sottoposto a SAT *pulse* continui a distanza di un minuto l'uno dall'altro e in presenza di luce attinica costante; l'analisi impiega 15 minuti per un totale di 14 flash saturanti e fornisce diversi valori di fluorescenza F'_m che danno un'indicazione più accurata dello *yield* effettivo e quindi dell'efficienza fotosintetica dell'organismo.

3.5. Quantificazione del consumo dei nutrienti

3.5.1. Determinazione di anioni mediante cromatografia a scambio ionico con soppressione

La quantificazione dei macronutrienti azotati e fosfati disciolti nel terreno in forma anionica (nitriti, nitrati ed ortofosfati) è stata effettuata mediante analisi cromatografica a scambio ionico con soppressione o IC (883 Basic IC plus). Il metodo impiegato (APAT, 2003) è stato validato per gli anioni più ricercati nell'analisi delle acque ed è stato possibile adottarlo anche per il digestato dove la bassa concentrazione dei cloruri non dà interferenza nella rilevazione degli anioni. Durante la valutazione del peso secco il terreno delle colture è stato separato dalla biomassa algale per filtrazione ed è stato conservato in congelatore per le successive analisi dei nutrienti; al momento delle analisi, i campioni sono stati trasferiti in frigorifero a 4 °C e successivamente portati a temperatura ambiente in bagno termostatico. Per rientrare nei limiti di rivelabilità e di linearità del metodo di analisi IC, i campioni sono stati diluiti in rapporto 1:20 con acqua distillata precedentemente filtrata con filtri 0,22 µm; dal momento che la filtrazione della coltura è stata eseguita con filtri GF/C Whatman con porosità di 1,2 µm ($\emptyset = 0,47 \mu\text{m}$), i campioni sono stati iniettati nello strumento con una siringa sterile dotata di filtro con porosità di 0,22 µm per evitare l'ingresso di impurità, particelle o residui biologici nel macchinario. Analogamente ad altri metodi cromatografici, la IC utilizza un meccanismo di separazione mediato dalla diversa affinità e distribuzione

delle specie oggetto dell'analisi fra due fasi: per la determinazione di anioni si utilizza una fase stazionaria composta da una resina polimerica arricchita di gruppi funzionali carichi positivamente (gruppi ammoniaci quaternari, R_4N^+) che rappresentano l'unità funzionale dello scambiatore ionico ed una fase mobile costituita invece dall'eluente in cui fluisce il campione e quindi gli analiti. Quando la fase mobile passa attraverso la fase stazionaria, gli anioni disciolti nel campione saranno più o meno attratti dai siti cationici della resina e pertanto andranno ad eluire in tempi differenti definiti tempi di ritenzione che sono specifici per l'analita ricercato; nel complesso questo passaggio dell'eluente nella fase stazionaria è definito corsa cromatografica. Prima di procedere alla determinazione degli anioni, la conducibilità di fondo dell'eluente viene abbassata da un soppressore allo scopo di aumentare il segnale elettrico degli analiti che possono così essere determinati con più facilità. Al termine della corsa cromatografica è presente un rivelatore a conducibilità elettrica che identifica gli analiti in base alla conducibilità associata ad ogni singolo anione ed elabora il cromatogramma; il riconoscimento finale viene effettuato tramite un confronto fra i tempi di ritenzione degli analiti del campione ed i tempi di ritenzione ricavati dalle soluzioni di riferimento (curva di calibrazione). La concentrazione degli anioni viene anch'essa calcolata con un confronto fra l'area del picco dell'analita nel campione con l'area del picco dell'analita a concentrazione nota utilizzato per la calibrazione del metodo: i dati acquisiti con IC sono espressi in mg/L.

3.5.2. Velocità di uptake dei nutrienti

Nelle colture *batch* è stata calcolata la velocità con cui le cellule di *P. tricornutum* sono in grado di rimuovere i nutrienti del DEC attraverso l'equazione (Fiori et al., 2013; Lim et al., 2006):

$U = - \frac{[C]_1 - [C]_0}{\gamma \cdot \Delta t}$ <p>dove: $\gamma = \frac{N_1 - N_0}{\ln(N_1) - \ln(N_0)}$</p>	<p>$[C]_0 ; [C]_1$ = concentrazioni del nutriente considerato espresse in μM nei giorni t_0 e t_1 rispettivamente</p> <p>$N_0 ; N_1$ = valore di conta cellulare (in cell ml^{-1}) stimato rispettivamente in t_0 e t_1</p> <p>Δt = intervallo di tempo $t_1 - t_0$ (espresso in day^{-1})</p>
--	--

U è espressa in $pmol \text{ cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ e il suo calcolo si basa sull'assunzione che il progressivo calo di macronutrienti nel mezzo sia dovuto esclusivamente all'*uptake* cellulare da parte dell'alga: a causa della contaminazione e del regime adottato (semi-continuo) questo parametro non è stato preso in considerazione per i sistemi di coltivazione di larga scala

(PBR e vasche). Come per il tasso specifico di crescita, la velocità di *uptake* è calcolata nei punti lineari della curva di crescita cellulare e della curva di consumo dei nutrienti nel terreno.

3.6. Caratterizzazione della composizione cellulare

Durante la fase in *batch* sono stati prelevati 120 ml di coltura dalle repliche provenienti dalle due diverse condizioni, poi centrifugati, congelati e liofilizzati per le successive analisi sulla composizione biochimica cellulare.

Per quanto concerne i sistemi di coltivazione di larga scala, sono stati prelevati circa 800 ml di coltura due volte a settimana per il PBR e una volta a settimana per le vasche prima e dopo la diluizione con nuovo terreno DEC; i campioni prelevati sono stati anch'essi centrifugati ed il pellet è stato congelato e liofilizzato per effettuare successivamente la caratterizzazione biochimica.

3.6.1. Estrazione della frazione lipidica

L'estrazione della frazione lipidica è stata svolta attraverso il metodo Bligh e Dyer (1959) modificato: circa 80-100 mg di campione liofilizzato sono stati pesati in vials di vetro pyrex e trattati con 6 ml di miscela (1:2, v/v) contenente (a) metanolo (MeOH) e (b) diclorometano (DCM), successivamente i campioni sono stati posti in bagno termostatico regolato ad una temperatura compresa fra 50-60 °C per 1 h e mezzo; una volta raffreddati, i campioni sono stati centrifugati a 1100 g per 1 minuto per separare la frazione lipidica dalla biomassa algale ed il sovrantante ottenuto è stato prelevato e trasferito in vials di vetro e seccato sotto flusso di N₂. L'intera operazione è stata ripetuta da 2 a 3 volte per ottenere la quantità massima di lipidi. In seguito, la determinazione dell'estratto lipidico viene espressa in rapporto percentuale al peso secco del campione preso in analisi.

3.6.1.1. Determinazione degli acidi grassi totali (FAs) in GC-MS

Dai campioni estratti e seccati sotto N₂ è stata prelevata un'aliquota di circa 2-4 mg e addizionata con (a) 0,4 ml di dimetil carbonato (DMC), (b) 0,1 di 2,2-dimetossipropopano e (c) 0,1 ml di metossido di sodio, poi agitati alla temperatura di 70 °C per 30 minuti.

Terminata questa fase sono stati aggiunti ai campioni nell'ordine: (a) 0,7 ml di boro trifluoruro-metanolo (MeOH-BF₃), (b) 20 µL di un standard interno (metil nonadecanoato), (c) 1 mL di esano e (d) 2 mL di una soluzione satura di NaCl (definita *brine*); a seguito di queste aggiunte i campioni sono stati posti nuovamente in agitazione a 70 °C per 30 minuti.

Una volta raffreddato si ottiene una separazione liquido/liquido dove la frazione lipidica estratta in solvente organico è presente nella porzione superiore della vials (a minor densità) e può essere facilmente prelevata ed analizzata, in particolare in questo lavoro la fase organica è stata analizzata con gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS). Il cromatogramma ottenuto presenta le concentrazioni di FAs calcolate in relazione all'area del picco dello standard interno inserito a concentrazione nota nei campioni ed il valore finale è stato convertito ed espresso in percentuale su peso secco dell'estratto lipidico.

3.6.2. Estrazione della frazione polisaccaridica

I polisaccaridi cellulari sono stati estratti seguendo il metodo riportato da Mykelstad e collaboratori (1972): circa 10-20 mg di campione liofilizzato sono stati posti in provette di vetro provviste di tappo ed incubati con 1 ml di H₂SO₄ (12 M) a 37 °C per 1 h. Successivamente ad ogni campione sono stati aggiunti 11 ml di acqua distillata poi questi sono stati mescolati su vortex per 30 s e successivamente incubati in bagno termostatico a 100 °C per 2 h. Per completare l'estrazione, i campioni sono stati posti in ghiaccio per 30 minuti e successivamente centrifugati a 3000 g per 10 minuti a 4° C per separare il sovranatante che contiene i polisaccaridi estratti dai residui cellulari che rimangono nel pellet.

3.6.2.1. Determinazione dei polisaccaridi intracellulari

Dal sovrinatante ottenuto sono state determinate le concentrazioni dei polisaccaridi intracellulari con il metodo descritto da DuBois e collaboratori (1956), il quale si basa su una reazione colorimetrica data da fenolo e acido solforico che crea una caratteristica colorazione gialla la cui intensità può essere messa in relazione lineare con la quantità di polisaccaridi mediante analisi spettrofotometrica. Sono quindi stati prelevati 100 µL di sovrinatante e posti in tubi di vetro con (a) 1 ml di soluzione di fenolo al 2,5% e (b) 2,5 mL di H₂SO₄ al 95%. L'operazione è stata svolta sotto cappa ed i campioni sono stati incubati per 30 minuti prima di procedere alla determinazione. Al momento dell'analisi spettrofotometrica (Jasco, V-650) la lettura dell'assorbanza è stata eseguita alla lunghezza d'onda di 490 nm, utilizzando come bianco l'acido solforico, mentre la concentrazione dei polisaccaridi è stata determinata mediante una curva di calibrazione precedentemente costruita su standard di glucosio. Tutte le analisi sono state svolte in triplicato.

3.6.3. Estrazione della frazione proteica

La frazione proteica è stata estratta basandosi sul metodo di estrazione descritto da Rausch e adattato a *P. tricornutum* (1981): un aliquota di biomassa algale liofilizzata di circa 10-20 mg è stata posta in provette da 15 ml e risospesa agitando su vortex con 3 ml di NaOH (0,5 M). In seguito i campioni sono stati incubati a 90 °C per 15 min e trasferiti in ghiaccio per 2 minuti: questo procedimento causa shock termico che permette la rottura delle cellule ed il conseguente ingresso di NaOH quale solvente per l'estrazione della frazione proteica. Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 1100 g per 5 minuti a 4 °C; il sovrantante formatosi è stato prelevato e posto in provette sterili a loro volta trasferite al buio a 4 °C per evitare la degradazione della componente proteica. L'intera procedura descritta è stata ripetuta dalle 3 alle 6 volte per consentire l'estrazione completa delle proteine dalle cellule algali e terminate le operazioni estrattive ogni campione è stato portato allo stesso volume mediante aggiunta di NaOH (0,5 M).

3.6.3.1. Determinazione delle proteine totali

I campioni di sovrantante sono stati analizzati per la quantificazione di proteine applicando il metodo di Lowry (1951) che si basa su una reazione colorimetrica fra gli aminoacidi contenenti gruppi aromatici (fenilalanina, triptofano e in particolare tirosina) ed il reattivo di Folin (fosfomolibdato, fosfotungstato e sali rameici); in presenza di aminoacidi aromatici la soluzione assume una colorazione blu e la determinazione quantitativa si esegue spettrofotometricamente impostando la lettura alla lunghezza d'onda di 750 nm in rapporto ad una curva di calibrazione precedentemente preparata con standard a concentrazione nota di albumina sierica bovina o BSA.

Prima di procedere alla determinazione sono stati preparati i seguenti reagenti (quantità ottimale per 20 campioni):

<i>Reagente 1</i>	<i>Reagente 2</i>	<i>Reagente 3</i>	<i>Reagente 4</i>
NaOH (0,5 M)	Na ₂ CO ₃ (10 g) in NaOH 0,5 M (100 ml)	Na / K tartrato (0,5 g) in H ₂ O distillata (50 ml)	CuSO ₄ ·5H ₂ O (0,25 g) in <i>soluzione 3</i> (50 ml)

Da questi reagenti sono state preparate al momento dell'analisi due soluzioni impiegate nell'immediato per la determinazione della frazione proteica:

<i>Soluzione A</i>	<i>Soluzione B</i>
<i>Reagente 2</i> (10 ml) + <i>Reagente 4</i> (1 ml)	Reattivo di Folin (4 ml) in acqua distillata (32 ml)

Dai campioni estratti è stato prelevato un volume noto di sovrantante e diluito in rapporto 1:10 (v/v) con NaOH (0,5 M) ottenendo un volume finale di 1 ml. In seguito è stato aggiunto 1 ml di *soluzione A* e i campioni sono stati agitati e posti al buio per 10 minuti. Successivamente sono stati aggiunti 3 ml di *soluzione B* ed i campioni sono stati nuovamente agitati e posti al buio per 30 minuti. Infine le soluzioni così ottenute sono state analizzate allo spettrofotometro a 750 nm utilizzando come bianco NaOH.

3.7. Composizione elementare

3.7.1. Determinazione di carbonio e azoto organici mediante analizzatore elementare CHNS-O

Circa 3-5 mg di biomassa algale liofilizzata sono stati accuratamente pesati e racchiusi in contenitori di stagno per effettuare la determinazione di carbonio (C), idrogeno (H), azoto (N), e zolfo (S) organici con un analizzatore elementare CHNS-O (Flash 2000, Thermo Fisher Scientific): lo strumento adotta una tecnica basata sulla combustione istantanea (*dynamic flash combustion*) la quale in presenza di ossigeno è in grado di scindere e trasformare i costituenti macroscopici della sostanza organica nei suoi componenti elementari al massimo stadio di ossidazione sottoforma di gas.

La combustione avviene nel reattore di combustione, una colonna verticale in quarzo contenente catalizzatori di ossidi di rame (porzione superiore ossidante) e fili di rame elettrolitico (porzione inferiore riducente) mantenuta ad una temperatura di 950 °C dentro la quale fluisce un flusso costante e continuo di elio che funge da gas *carrier*. I campioni vengono trasportati attraverso il gas *carrier* da un auto-campionatore al reattore di combustione dove l'elio viene arricchito con ossigeno consentendo sia la fusione dei contenitori di stagno che la combustione istantanea dei campioni; i gas di combustione che si formano vengono portati al massimo stadio di ossidazione grazie al passaggio sui catalizzatori della colonna e alla contemporanea presenza di ossigeno: ad esempio l'N organico viene ossidato a N₂, il C organico a CO₂ e così via. Si crea in questo modo una miscela di gas di combustione che viene sospinta dal gas *carrier* verso una colonna cromatografica dotata di rilevatore a conducibilità termica o TCD il quale consente l'identificazione dei singoli gas di combustione mettendo in relazione la loro conducibilità termica ed i tempi di eluizione con quelli di una curva di calibrazione costruita con uno standard chiamato BBOT (2,5-Bis-(5-tert-butyl-2-benzo-oxazol-2-yl) tiofene) la cui composizione percentuale è nota (C: 72,53% | H: 6,09% | N: 6,51% | O: 7,43% | S: 7,44%).

Le analisi in CHNS-O sono state svolte in duplicato per tutte le condizioni di sperimentazione.

3.7.2. Determinazione del fosforo intracellulare mediante metodo spettrofotometrico con reattivo molibdico

Un'aliquota di circa 10-15 mg di biomassa algale liofilizzata è stata posta in matracci da 50 ml chiusi con tappo di vetro e risospesa con i 8 ml di persolfato di potassio ($K_2S_2O_8$) al 5% così come descritto da Menzel e Corwin (1965); successivamente i matracci sono stati avvolti in pellicola trasparente e posti in autoclave a 120 °C per 30 minuti. Questa metodica consente di degradare la materia organica dei campioni liofilizzati estraendo il fosforo organico cellulare nel solvente.

Il fosforo organico presente nei campioni è quindi stato quantificato mediante il metodo descritto da Strickland e Parsons (1972) che si basa su una reazione colorimetrica fra il fosforo organico sottoforma di ortofosfato e un reattivo misto composto 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 rapporto rispettivamente 2:5:2:1); si forma in questo modo un complesso fosfomolibdico poi ridotto dall'acido ascorbico presente nel reattivo a blu di molibdeno che presenta un picco di assorbimento alla lunghezza d'onda di 885 nm la cui colorazione è più intensa quanti fosfati sono presenti nel campione analizzato. Ai campioni precedentemente estratti sono stati aggiunti 5 ml di reattivo misto e mescolati, attendendo successivamente 10 minuti; prima della lettura i campioni sono stati diluiti con acqua distillata in rapporto 1:50 (v/v) per rientrare nei limiti di linearità del metodo ed evitare che l'elevato contenuto di fosforo organico inficiasse l'analisi spettrofotometrica. L'analisi allo spettrofotometro è stata dunque eseguita alla lunghezza d'onda di 885 nm utilizzando come bianco acqua distillata; la concentrazione finale di P- PO_4 è stata determinata mediante una curva di calibrazione precedentemente costruita utilizzando soluzioni standard di KH_2PO_4 a concentrazioni note.

3.8. Analisi statistiche

Per valutare le differenze di crescita, composizione cellulare e altri parametri presi in esame nei diversi sistemi e alle diverse condizioni è stata applicata l'analisi della varianza ANOVA con un livello di confidenza del 95% ($p < 0,05$). Tutte le analisi sono state svolte mediante il software PAST 3.0 (Hammer et al., 2001), mentre i grafici sono stati realizzati con il software Microsoft Office Excel ©.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Crescita di *Phaeodactylum tricornutum* in colture *batch* con DEC sottoposte a due diversi regimi di CO₂

4.1.1. Valutazione della crescita e consumo dei nutrienti

La crescita di *P. tricornutum* sulla frazione di digestato liquido (DEC) è stata valutata in termini di torbidità, peso secco e conta cellulare mettendo a confronto due regimi di somministrazione giornaliera di CO₂ pura ad un flusso costante di 0,067 L al minuto rispettivamente per 10 minuti (PT.10) e per 20 minuti (PT.20); nella prima condizione sono stati somministrati in totale nei 16 giorni di durata dell'esperimento 10,7 L e nella seconda 21,4 L di CO₂.

Le curve di crescita derivanti da tutti e tre i parametri d'analisi sono mostrate in figura 7; dai grafici si osserva un andamento della crescita del tutto simile nelle colture trattate con un differente quantitativo di CO₂ senza che sussistano differenze significative fra le due condizioni PT.10 e PT.20 (ANOVA, $p > 0,05$) e dove solamente i valori del peso secco mostrano una lieve differenza comunque non significativa.

Il tasso specifico di crescita o *growth rate* calcolato per entrambe le serie è risultato rispettivamente $0,152 \pm 0,007 \text{ day}^{-1}$ per PT.10 e $0,165 \pm 0,008$ per PT.20 e la differenza fra le due condizioni non risulta significativa (ANOVA, $p > 0,05$) rispecchiando l'andamento globale della crescita. Questi dati rappresentano un ulteriore indice del fatto che nell'arco del periodo di sperimentazione l'alga è cresciuta allo stesso ritmo sotto i due diversi regimi di CO₂ ed il trattamento non ha portato delle conseguenze visibili in termini di crescita.

Nella tabella 10 sono riportati i massimi valori di crescita riferiti alla fase stazionaria per le due condizioni ed il relativo *growth rate* calcolato in fase esponenziale.

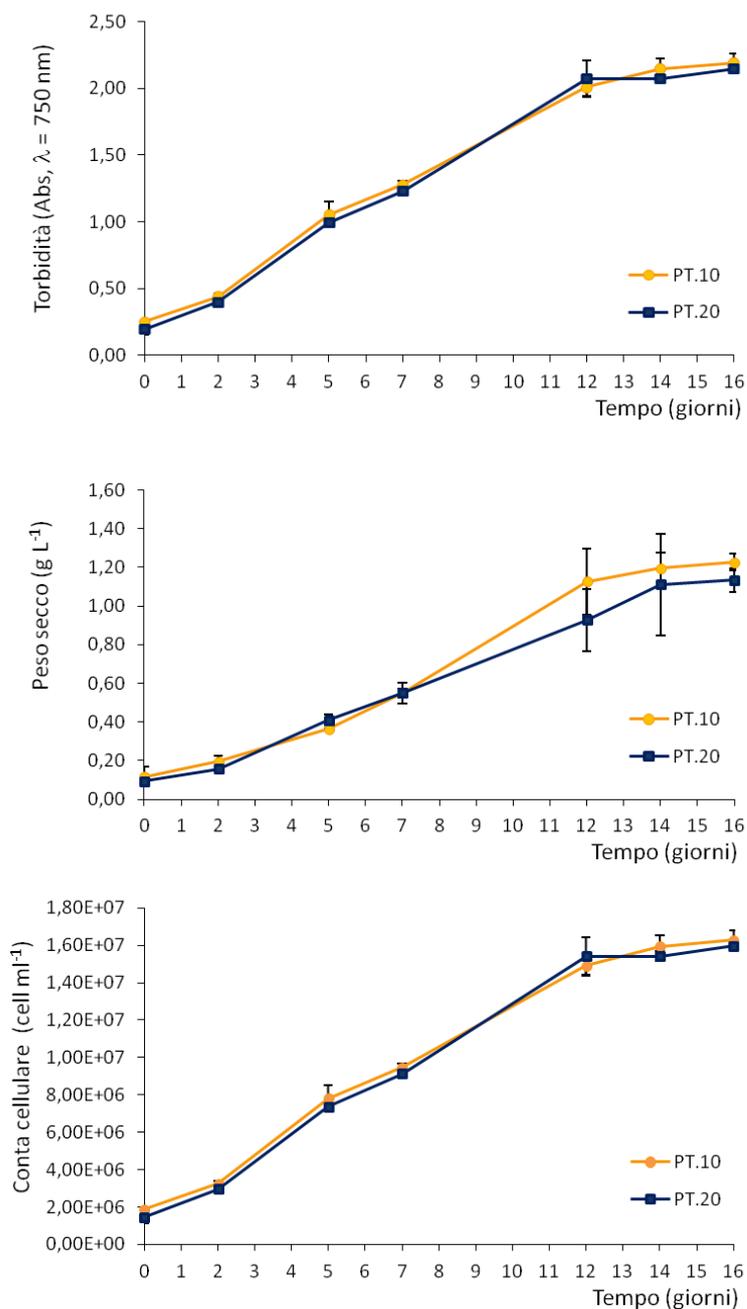


Fig. 7 – Curve di crescita di *P. tricornutum* in colture *batch* con DEC nelle condizioni PT.10 e PT.20

	Abs _{MAX}	DW _{MAX} (g L ⁻¹)	Conta _{MAX} (cell ml ⁻¹)	μ (day ⁻¹)
PT.10	2,1895 ± 0,07	1,2263 ± 0,04	1,63 · 10 ⁷ ± 5,39 · 10 ⁵	0,152 ± 0,007
PT.20	2,1482 ± 0,04	1,1329 ± 0,06	1,60 · 10 ⁷ ± 2,65 · 10 ⁵	0,165 ± 0,008

Tab. 10 – Valori massimi dei parametri di crescita e del *growth rate* di *P. tricornutum* in colture *batch* con DEC

In un precedente lavoro di tesi era stato osservato che la biomassa di *P. tricornutum* in un digestato liquido in fase stazionaria era incrementata di circa il 40% dalla somministrazione di CO₂ pura ad un flusso di 0,06 L min⁻¹ per 10 minuti al giorno (TOT. 8,4 L) rispetto alla coltura insufflata solamente con aria (Garofalo, tesi di laurea 2016). Su questa base, nelle prove preliminari di questo lavoro di tesi si è valutato se un quantitativo maggiore di CO₂ potesse influire ulteriormente sulla crescita della diatomea; nonostante il volume di CO₂ pura insufflata alle colture nel corso di tutto l'esperimento sia stato raddoppiato in PT.20, non si sono osservate differenze significative in termini di crescita fra le due condizioni. Si può ipotizzare che tale modalità discontinua di insufflazione di CO₂ pura per brevi periodi, dettata da motivi tecnici, fa sì che il gas si saturi velocemente nel mezzo di coltura e tenda a disperdersi in atmosfera con la conseguenza che la maggiore quantità di carbonio fornita non sia realmente disponibile per le alghe; in aggiunta, questa tipologia di somministrazione porta ad un abbassamento molto repentino dei valori di pH che passano da circa 8,5 a 6 determinando una situazione di stress per le alghe. In prove analoghe presenti in letteratura, la CO₂ generalmente non è somministrata pura e le colture sono prevalentemente insufflate con aria arricchita che consente un approvvigionamento del gas più graduale nel tempo; questo sistema inoltre permette di mantenere valori di pH piuttosto stabili, vicini a 7,8, per l'intera durata della sperimentazione, senza grosse alterazioni del sistema dei carbonati nel mezzo di coltura (Wu et al., 2010). Per quanto concerne i tassi di crescita, i valori di *growth rate* ottenuti nelle nostre prove (Tab. 10) sono in linea con quanto riportato da Massa e collaboratori (2017) che hanno testato la crescita di *P. tricornutum* in colture *batch* allestite con tre diversi digestati liquidi precedentemente diluiti, ottenendo in particolare un valore medio di *growth rate* pari a $0,15 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$ con un digestato di origine vegetale.

L'analisi in cromatografia ionica ha permesso di valutare l'efficacia di rimozione dei nutrienti presenti nel DEC per *P. tricornutum* nelle due condizioni PT.10 e PT.20; dai grafici (Fig. 8) si osserva in linea generale che il contenuto dei nutrienti azotati (N-NO₂ + N-NO₃) e fosfati (P-PO₄) nel terreno di coltura è simile in entrambe le condizioni, in particolare i fosfati sono stati consumati dopo pochi giorni dalle cellule, probabilmente a causa della loro bassa concentrazione iniziale nel DEC, mentre il consumo dell'azoto è avvenuto in maniera più graduale e la sua completa rimozione si è ottenuta solo verso la fine della coltura al giorno 14. Questo dato è supportato dalla velocità di *uptake* riportata nella tabella 11, in cui si osservano valori maggiori per il PO₄ in entrambe le condizioni; dall'analisi statistica le due condizioni di sperimentazione non hanno portato a differenze significative nei valori di *uptake* dei macronutrienti (ANOVA, $p > 0,05$).

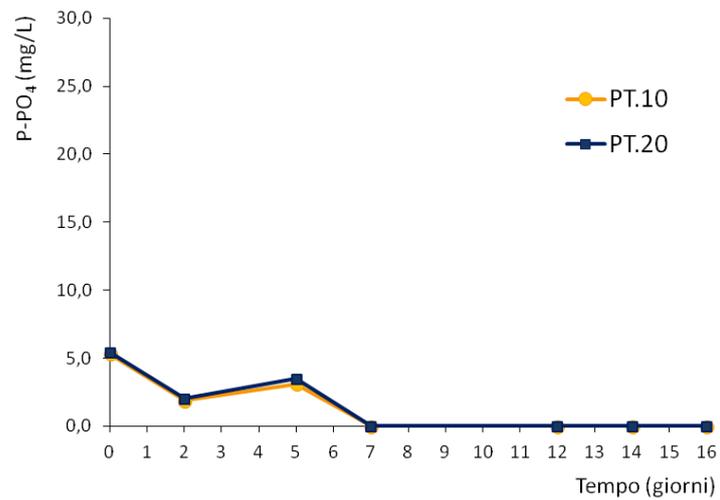
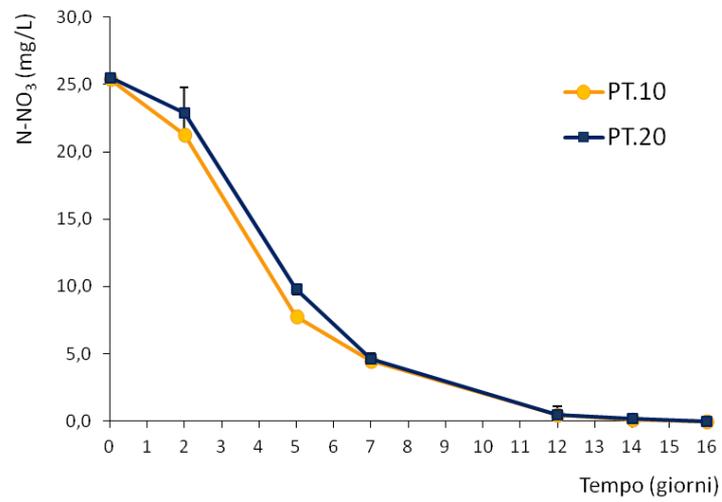
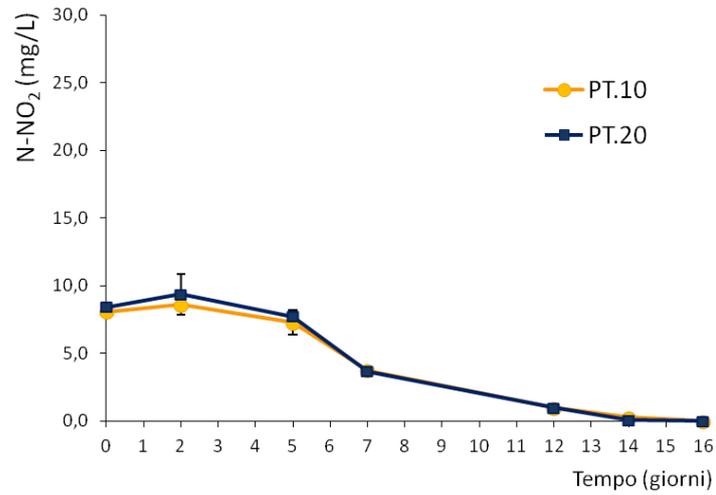


Fig. 8 – Curve di consumo dei macronutrienti. Dall'alto al basso: N-NO₂, N-NO₃ e P-PO₄

U (pmol cell ⁻¹ day ⁻¹)		
	N-NO ₂ + N-NO ₃	P-PO ₄
PT.10	$2,65 \cdot 10^{-2} \pm 8,22 \cdot 10^{-4}$	$5,41 \cdot 10^{-3} \pm 2,27 \cdot 10^{-4}$
PT.20	$2,92 \cdot 10^{-2} \pm 3,65 \cdot 10^{-3}$	$6,21 \cdot 10^{-3} \pm 4,59 \cdot 10^{-4}$

Tab. 11 – Velocità di uptake (U) dei macronutrienti azotati e fosfati

Dai dati raccolti è emerso che sia i nutrienti azotati che fosfati sono stati efficacemente rimossi dall'alga e al termine della fase stazionaria non sono più presenti nel terreno di coltura; la completa rimozione di queste specie chimiche ci suggerisce che *P. tricorutum* possa essere un buon candidato per la fitodepurazione di acque di scarto e reflue, nonché di digestati liquidi prima della loro immissione in mare. In aggiunta, a differenza dei digestati finora testati dalla comunità scientifica per la crescita di *P. tricorutum* che hanno richiesto una generale alta diluizione a causa dell'elevato contenuto di azoto sottoforma di NH₄ (Massa et al., 2017; Veronesi et al., 2015; Veronesi et al., 2017), in questo lavoro è stato possibile utilizzare una frazione di digestato liquido, il DEC, come terreno di coltura tal quale, grazie in particolare alle sue caratteristiche di buona trasparenza e al basso contenuto di NH₄. In un'ottica di riduzione dei costi il DEC può risultare una valida alternativa sia ai terreni sintetici che in particolare ai digestati liquidi non trattati, con la possibilità di ridurre la richiesta di acqua per la loro diluizione.

4.1.2. Valutazione dell'efficienza fotosintetica

Per valutare il livello di stress fisiologico delle cellule sottoposte a diversa somministrazione di CO₂ è stata effettuata un'analisi al fluorimetro PAM eseguendo delle *induction curve* (IC) su campioni prelevati durante la fase esponenziale di crescita dell'alga (al giorno 6, Fig. 7) non in limitazione da nutrienti (Fig. 8), rispettivamente prima e dopo la somministrazione di CO₂. In entrambe le condizioni PT.10 e PT.20 si osserva che i picchi di fluorescenza delle curve IC (Fig. 9) sono più bassi nei campioni prelevati dopo la somministrazione del gas, indicando una diminuzione dell'efficienza fotosintetica di *P. tricorutum*, intesa come la capacità del PSII di assorbire i fotoni della radiazione luminosa e impiegarli nella fotochimica cellulare; tale differenza risulta inoltre molto più marcata nella condizione PT.20 sottoposta ad una somministrazione più prolungata di CO₂.

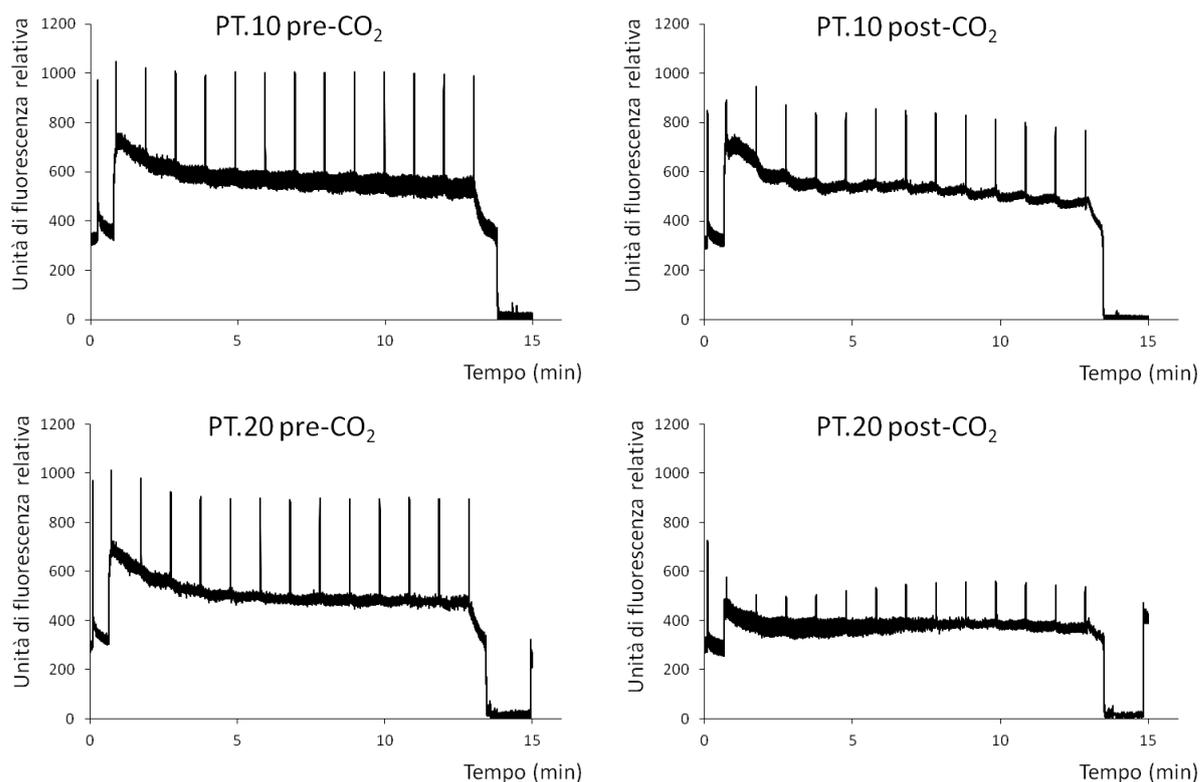


Fig. 9 – Curve di induzione (IC) ottenute con fluorimetro PAM: confronto fra le condizioni PT.10 e PT.20 prima e dopo la somministrazione di CO₂

Eseguendo un confronto statistico dei valori di *yield* ottenuti dalle curve IC (Fig. 10.a) non risultano differenze significative fra i campioni PT.10 e PT.20 prima della somministrazione di CO₂ (ANOVA, $p > 0,05$), mentre una diminuzione statisticamente significativa si osserva dopo tale somministrazione con *p-value* molto basso rispetto alla soglia di probabilità impostata $\alpha = 0,05$ (ANOVA, $p = 1,21 \cdot 10^{-8}$); in particolare, il valore di *yield* effettivo più basso si riscontra nella condizione PT.20 (Tab. 12).

La modalità discontinua di somministrazione di CO₂ pura ha determinato nell’arco di pochi minuti in entrambe le condizioni una forte diminuzione del pH nelle colture algali che passa da valori di 9,0-8,5 a circa 6,5-6,0; questa diminuzione del pH potrebbe essere la causa della minor efficienza fotosintetica osservata in particolare in PT.20 dove i valori di pH misurati dopo la somministrazione di CO₂ (Fig. 10.b) sono risultati significativamente più bassi rispetto alla condizione PT.10 (ANOVA, $p < 0,05$).

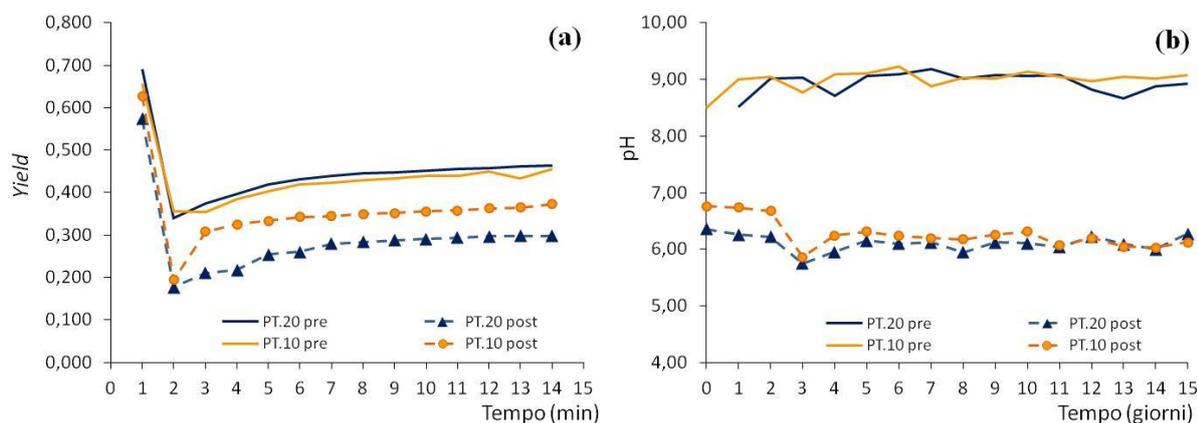


Fig. 10 – Valori di *yield* misurati in fase esponenziale di crescita (10.a) e valori di pH giornalieri (10.b) nelle condizioni PT.10 e PT.20 prima e dopo la somministrazione di CO₂

	<i>Yield</i> effettivo _{MAX} pre-CO ₂	<i>Yield</i> effettivo _{MAX} post-CO ₂
PT.10	0,466 ± 0,014	0,393 ± 0,028
PT.20	0,473 ± 0,013	0,276 ± 0,031

Tab. 12 – Massimi valori di *yield* effettivo nelle condizioni PT.10 e PT.20 prima e dopo la somministrazione di CO₂

Recentemente, Li e collaboratori (2017) hanno osservato un abbassamento dei valori di *yield* effettivo in colture di *P. tricornutum* sottoposte ad elevata concentrazione di CO₂ miscelata con aria, tuttavia il loro risultato si riferisce ad un effetto marcato sul lungo periodo, dopo che la coltura è stata sottoposta ad elevati livelli di CO₂ per molte generazioni, mentre altri autori (Wu et al., 2010) hanno riportato che la somministrazione del gas ad alte concentrazioni ma per un breve periodo ha portato ad un generale significativo incremento dello *yield* e del *growth rate*. In questi studi, tuttavia, i valori di pH restano stabili a circa 7,8 e le variazioni di *yield* effettivo riscontrate dagli autori potrebbero essere in relazione essenzialmente alla maggiore quantità di carbonio fornita dalla CO₂ piuttosto che allo stress fisiologico di acidificazione della coltura. Questi dati non sono paragonabili a quanto osservato nel nostro lavoro dove la modalità di somministrazione della CO₂ ha portato ad una variazione repentina del pH in breve tempo, nell'ordine di 2-3 unità (pH post-CO₂ ≅ 6,00-6,5). In letteratura informazioni dettagliate sulla relazione fra la variazione dello *yield* effettivo e l'eccessivo abbassamento del pH sono poche, tuttavia Krause e Weis (1991) suggeriscono che la rapida inibizione della fotosintesi in microalghe sottoposte ad alte

concentrazioni di CO₂ sia legata all'inattivazione di enzimi chiave del ciclo di Calvin, determinata a sua volta da un'eccessiva acidificazione dello stroma dei cloroplasti. L'elevata concentrazione di CO₂ nel mezzo di coltura consente alle diatomee come *P. tricornutum* di ridurre l'energia associata al meccanismo di concentrazione della CO₂ (CCM) che permette a questi organismi di immagazzinare la CO₂ e concentrarla in compartimenti cellulari vicini agli enzimi RubisCO tramite un trasporto attivo; tuttavia l'eccessiva riduzione del pH deve essere compensata dall'alga con dispendio energetico, per riportare le condizioni intracellulari a quelle fisiologiche ottimali. In questo modo si crea un bilancio di effetti positivi e negativi che andranno ad influire sull'efficienza fotosintetica e sulla produttività dell'alga (Li et al., 2012; Wu et al., 2010).

In queste prove si può concludere che questa modalità di somministrazione diretta di CO₂ pura non è ottimale per fisiologia di quest'alga, in quanto è maggiore il dispendio energetico necessario per contrastare il repentino abbassamento del pH rispetto al vantaggio ottenuto dall'aumento della concentrazione di CO₂ nel mezzo, che consentirebbe la riduzione dell'energia associata al CCM.

4.1.3. Composizione cellulare

Nella tabella 13 è riportata la composizione cellulare di *P. tricornutum* nelle due condizioni, valutata in termini di quantità percentuale su peso secco dell'alga per le frazioni polisaccaridiche, proteiche e lipidiche; in percentuale è riportata anche una stima delle altre componenti quali ceneri e silice ottenuta sottraendo il valore degli altri costituenti cellulari al totale. La caratterizzazione della biomassa è stata effettuata da un campione di alghe raccolte a fine coltura (giorno 16, Fig. 7) quando le cellule di *P. tricornutum* erano già in limitazione da nutrienti ed in fase stazionaria avanzata (Fig. 7).

Condizione	% Polisaccaridi	% Proteine	% Lipidi	% Altro (Si, Ash, OM)
PT.10	24,93 ± 2,04	24,40 ± 3,14	36,87 ± 3,81	13,80 ± 2,70
PT.20	21,80 ± 1,06	8,43 ± 3,84	26,79 ± 4,05	42,98 ± 8,95
(Rebollosa-Fuentes et al., 2001)	26,1 ± 4,17	36,4 ± 2,48	18,0 ± 2,98	15,9 ± 4,95

Tab. 13 – Caratterizzazione cellulare (wt%) di *P. tricornutum* nelle due condizioni PT.10 e PT.20 confrontata con i dati riportati da Rebollosa-Fuentes e collaboratori (2001)

Tutte le componenti esaminate sembrano essere presenti in percentuali inferiori nella condizione PT.20, tuttavia solo per la frazione proteica i valori risultano significativamente più bassi ($p < 0,05$) e il detrito cellulare di conseguenza è più alto in tale condizione.

La composizione biochimica di *P. tricornutum* ritrovata in questa fase di crescita non rispecchia quella riportata da Reboloso-Fuentes e collaboratori (2001), riferita a campioni raccolti in fase esponenziale e tale divergenza si osserva soprattutto nella condizione PT.20 (Tab. 13). È evidente che la composizione dei nostri campioni riflette in particolare la carenza di N (Fig. 8) la quale, come riportato anche da altri autori, inibisce la sintesi proteica e di altri composti azotati promuovendo un maggiore accumulo della porzione lipidica e polisaccaridica (Alipanah et al., 2015; Li et al., 2012; Mus et al., 2013); tali autori suggeriscono infatti che, dal momento che l'allocazione del carbonio nelle proteine richiede un minor dispendio energetico (circa il 50% in meno) rispetto alla biosintesi in particolare dei lipidi, quando l'azoto è disponibile la cellula dirige il suo metabolismo verso la sintesi proteica, mentre in condizioni di carenza di tale nutriente si instaurano obbligatoriamente dei *pathway* metabolici legati alla sintesi delle altre componenti lipidiche e polisaccaridiche.

Tuttavia nelle nostre prove la carenza di N è stata osservata in entrambe le condizioni PT.10 e PT.20 e pertanto lo stato nutrizionale della coltura non è sufficiente da solo per spiegare i valori così bassi di proteine ottenute in PT.20. Mus e collaboratori (2013) hanno osservato una significativa riduzione del contenuto proteico in cellule di *P. tricornutum* cresciute ad un valore di pH pari a circa 7 rispetto ad una condizione di controllo con pH di circa 7,8 e tale riduzione si è verificata sia in carenza che in presenza di azoto; Li e collaboratori (2012), inoltre osservano che, in carenza di azoto, il rapporto C:N passa dal 21% al 45% in colture sottoposte ad un'alta concentrazione di CO₂ rispetto all'aria ambiente, determinando una riduzione nel contenuto proteico. Nel nostro caso si può ipotizzare un effetto sinergico di diversi fattori: in particolare l'eccessivo quantitativo di CO₂ somministrata nella condizione PT.20, probabilmente a causa della contemporanea soppressione del CCM, della carenza di N e dello stress fisiologico (esposizione a basso pH), ha portato ad una simultanea riduzione dell'efficienza fotosintetica algale e della sintesi proteica.

Per quanto concerne la caratterizzazione quantitativa degli acidi grassi, i rapporti percentuali sul peso dell'estratto lipidico e sul peso secco della biomassa sono riportati nella tabella 14: confrontando le condizioni PT.10 e PT.20 non sussistono differenze significative (ANOVA, $p > 0,05$) seguendo i trend della frazione lipidica totale.

	% FAs sull'estratto lipidico	% FAs sulla biomassa algale
PT.10	58,70 ± 13,63	21,38 ± 2,79
PT.20	76,20 ± 29,02	19,83 ± 4,69

Tab. 14 – Percentuali (wt%) di acidi grassi (FAs) nelle due condizioni PT.10 e PT.20 espresse su peso dell'estratto lipidico e sul peso secco

Nella figura 11 sono invece riportate in dettaglio le quantità relative di acidi grassi (FAs) ritrovati nei campioni microalgali delle colture *batch* con le rispettive percentuali espresse su peso dell'estratto lipidico. I FAs più abbondanti sono i C16 insaturi (C16:1, palmitoleico; C16:3 esadecatrienoico) che costituiscono quasi il 50% degli acidi grassi totali, seguiti dall'acido palmitico (C16:0) che rappresenta circa il 30%; solo secondariamente troviamo l'EPA (C20:5, circa 6-9%) e gli acidi grassi C18 insaturi (circa 6-7% di cui C18:1, oleico e C18:2, linoleico), mentre l'acido miristico (C14:0) è l'ultimo fra gli acidi grassi più abbondanti con una percentuale di poco superiore al 5%. Altri FAs sono presenti in concentrazioni < 1% e fra questi si ritrova il DHA (C22:6). I FAs più abbondanti presenti nei campioni (C16:1+C16:3; C16:0; C18:1+C18:2; C20:5; C14:0) sono stati testati con ANOVA per valutare eventuali divergenze nelle due condizioni PT.10 e PT.20, tuttavia non si riscontrano differenze significative per nessuno di essi (ANOVA, $p > 0,05$): in conclusione, la somministrazione differenziale di CO₂ alle colture non ha inciso sul profilo qualitativo finale degli acidi grassi.

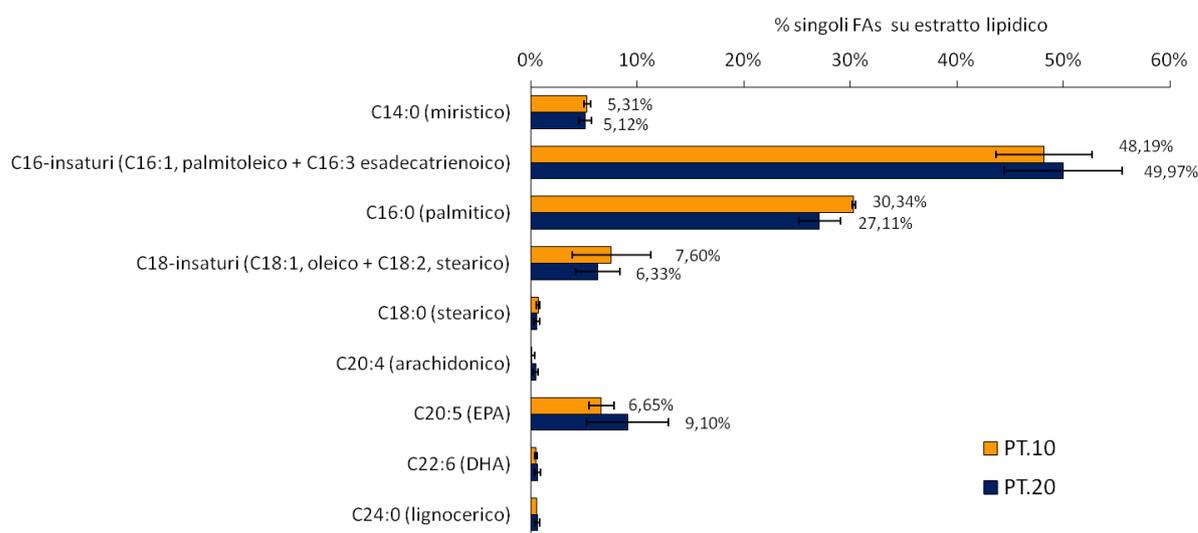


Fig. 11 – Dettaglio dei FAs nelle due condizioni PT.10 e PT.20 espressi in percentuale sul peso dell'estratto lipidico (wt%). Nel grafico sono indicate numericamente le percentuali dei FAs più abbondanti

La quantità relativa degli acidi grassi in *P. tricornutum* dipende dalla fase di crescita e dalle condizioni di coltura in cui è stato effettuato il prelievo per l'analisi della biomassa; generalmente EPA ed altri PUFAs raggiungono la loro massima concentrazione nella fase esponenziale, quando ancora i nutrienti sono presenti nel terreno, mentre i C16 insaturi dominano la fase stazionaria (Prestegard et al., 2016; Siron et al., 1989). In particolare Qiao e collaboratori (2016) hanno riportato che in limitazione da N ($< 2 \text{ mg L}^{-1}$) in colture *batch* allestite con un terreno sintetico si osserva un contemporaneo aumento della concentrazione dei C16 insaturi ($\text{wt\%} = 44,41 \pm 0,38$) e una riduzione di EPA ($\text{wt\%} = 7,98 \pm 0,18$) rispetto alla condizione con maggior quantità di N pari a circa 50 mg L^{-1} ($\text{wt\% C16-insaturi} = 26,55 \pm 1,22$ | $\text{wt\% EPA} = 31,52 \pm 0,30$); gli autori riportano inoltre che la distribuzione divergente dei due acidi grassi (C16-insaturi ed EPA) è determinata dal diverso impiego cellulare in quanto i C16 insaturi vengono utilizzati dall'alga per immagazzinare energia in fase stazionaria, mentre l'EPA è normalmente correlato all'attività fotosintetica come acido grasso costituente delle membrane tilacoidali durante la fase esponenziale. L'andamento da noi riscontrato è dunque in linea con questi dati e conferma l'utilizzo del DEC come un buon terreno di coltura per la produzione di acidi grassi dall'alto valore commerciale. In particolare, seppur in fase stazionaria *P. tricornutum* presenta un basso contenuto di EPA, altri acidi grassi come l'acido palmitoleico (C16:1) e l'acido esadecatrienoico o HTA (C16:3), presenti nei nostri campioni in alta concentrazione (Fig. 7), possono essere di interesse economico trovando applicazione nel settore farmaceutico come antibatterici topici o sistemici (Desbois et al., 2008).

4.2. Sperimentazione su larga scala per la coltivazione di *P. tricornutum*

4.2.1. Condizioni di crescita e parametri ambientali

Nei mesi fra gennaio e marzo 2017 sono stati allestiti i prototipi per studiare la coltivazione su larga scala impiegando sia terreno sintetico che DEC. Dapprima la crescita di *P. tricornutum* è stata seguita in fotobioreattori dalla capacità di 270 L posti in una serra sperimentale soggetta alle fluttuazioni dei parametri ambientali esterni (temperatura, luce). Successivamente è stato effettuato uno *scaling-up* della coltura con DEC in un sistema di coltivazione aperto in vasche di maggiori volumi fino a 1000 L anch'esse poste in serra. I diversi sistemi di coltivazione sono stati allestiti in successione nell'arco di tre mesi (Fig. 12) e questo ha reso indispensabile il monitoraggio dei parametri ambientali di luce e

temperatura, che come possiamo notare sono aumentati progressivamente durante l'intera sperimentazione, influenzando di conseguenza la fisiologia dell'alga.

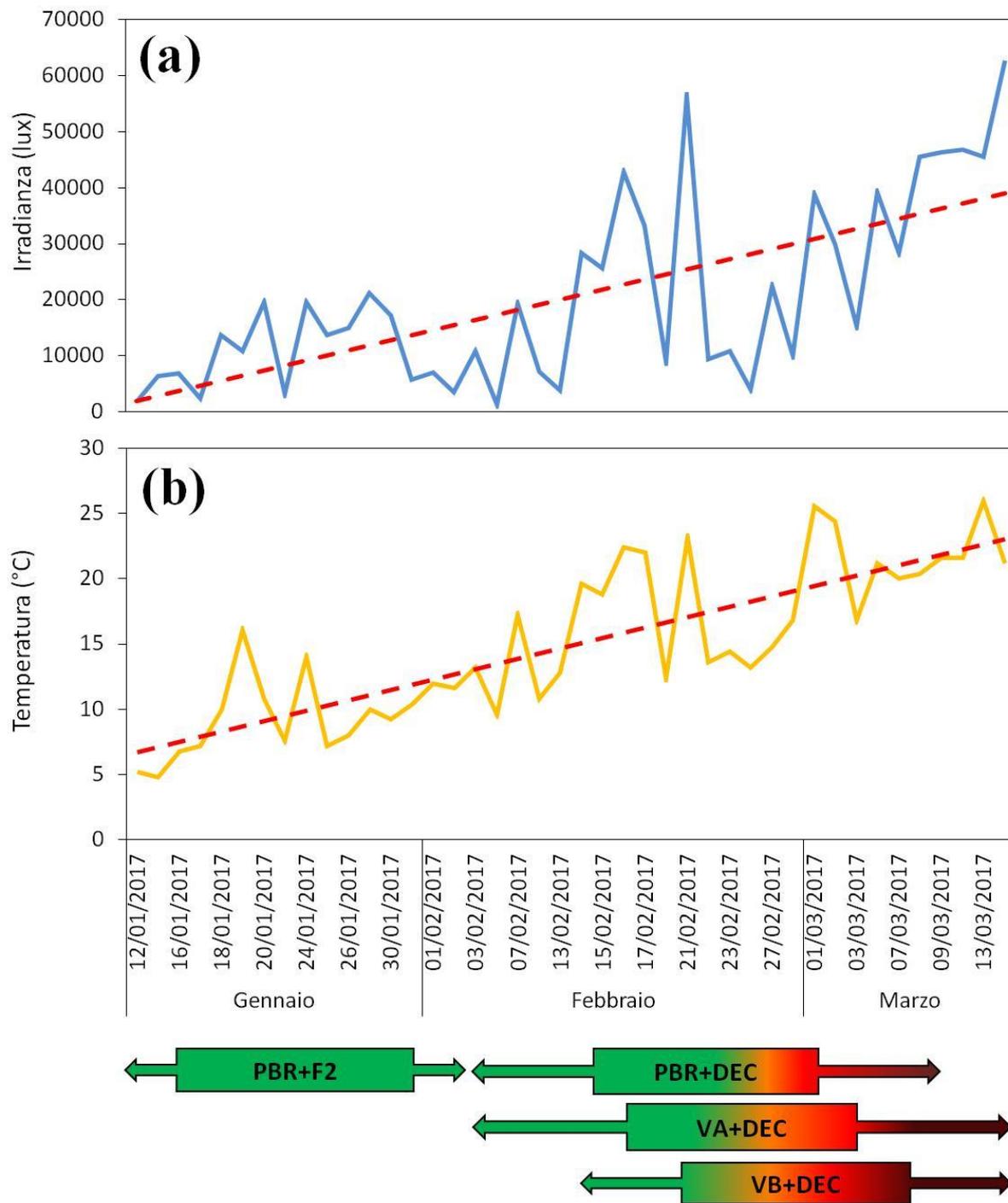


Fig. 12 – Variazioni di luce (12.a) e temperatura (12.b) durante l'intera sperimentazione in PBR e vasche. Nel grafico sono riportati i periodi di allestimento e monitoraggio dei vari sistemi studiati

4.2.2. Crescita di *P. tricornutum* in PBR con terreno sintetico e con DEC

Gli andamenti della crescita di *P. tricornutum* nel PBR con terreno sintetico F2 modificato (Fig. 13.a) e con DEC (Fig. 13.b) sono descritti dai grafici di torbidità, peso secco e conta cellulare. Il PBR con terreno sintetico è stato seguito una volta raggiunto il massimo volume (270 L) a partire dal giorno 47 dell'inoculo; le curve di crescita per questo sistema mostrano un andamento tipico delle colture in semi-continuo con picchi massimi di biomassa seguiti da valori di crescita più bassi dovuti alla simultanea raccolta di parte della coltura e aggiunta di nuovo terreno. Nel PBR con DEC, dopo il raggiungimento del volume massimo, l'aggiunta di nuovo DEC è stata effettuata una sola volta e successivamente la crescita algale è calata drasticamente fino al collasso della coltura. Apparentemente sembrerebbe che sia stata l'aggiunta del DEC a causare il calo della popolazione microalgale, ma osservando i parametri ambientali si può notare che il giorno in cui tale aggiunta è stata effettuata (21/02/2017) corrisponde a valori di irradianza (Fig. 12.a) e temperatura (Fig. 12.b) più alti rispetto a quelli dei giorni precedenti e di quelli immediatamente successivi. Le fluttuazioni e i valori di luce e temperatura nel periodo di monitoraggio del PBR con terreno sintetico sono stati invece più bassi e costanti, suggerendo che i continui cambiamenti esterni abbiano pesantemente gravato sulla crescita dell'alga in DEC. Confrontando infatti la crescita della diatomea nei due sistemi, in linea generale nel PBR con DEC si osservano valori più bassi rispetto al PBR con terreno sintetico; nonostante ciò, nei primi giorni di sperimentazione con DEC e a parità di condizioni ambientali sia il *growth rate* che la produttività volumetrica sono risultati maggiori (Tab. 15), con valori simili ai dati di *growth rate* precedentemente ottenuti nelle prove in *batch* (Tab. 10).

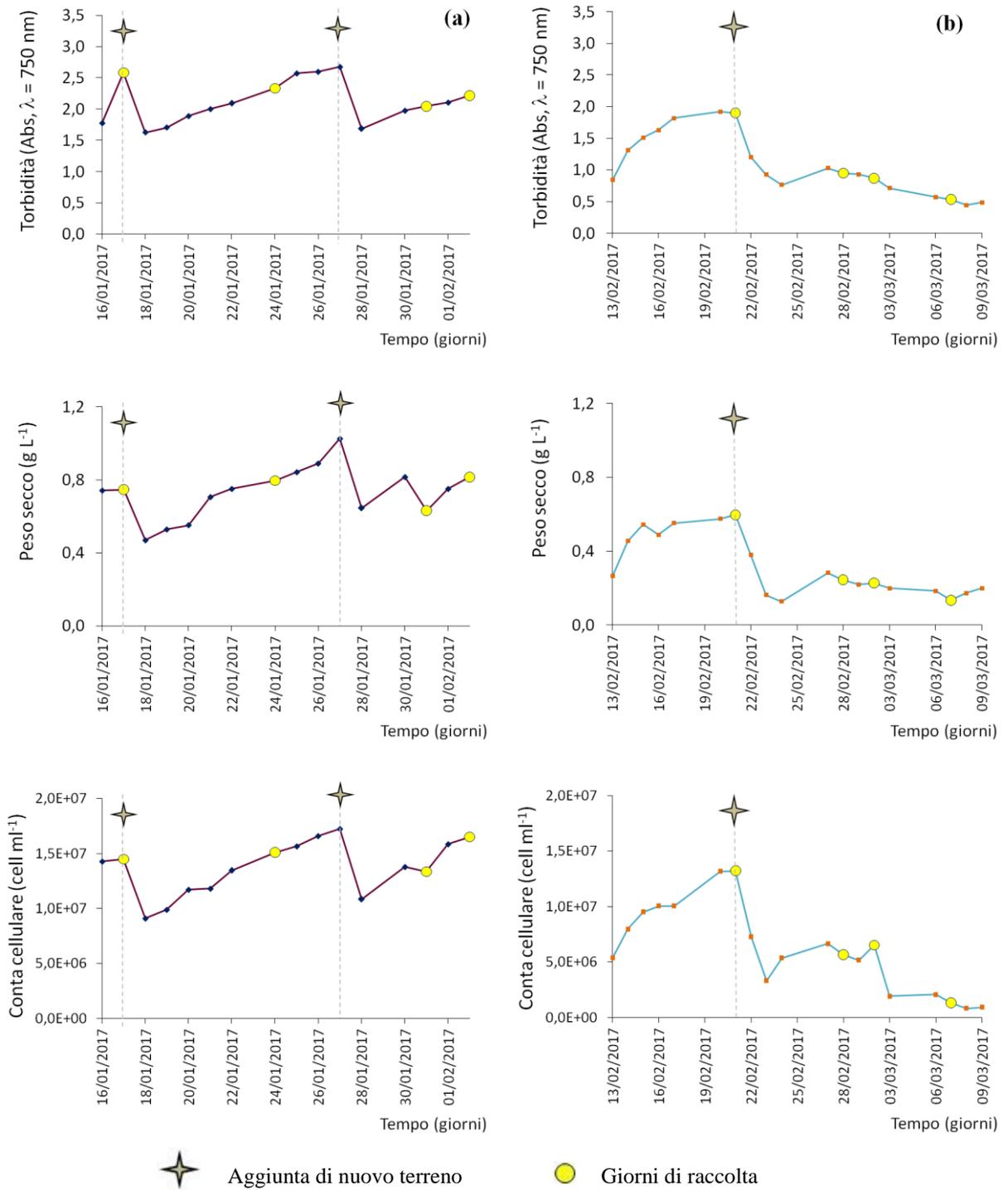


Fig. 13 – Curve di crescita di *P. tricornutum* in PBR con terreno sintetico F2 modificato (13.a) e in PBR con DEC (13.b).

	Variazione di Temperatura (°C)	Abs _{MAX}	DW _{MAX} (g L ⁻¹)	Conta _{MAX} (cell ml ⁻¹)	μ (day ⁻¹)	P_b _{MAX} (g L ⁻¹ day ⁻¹)
PBR + F2	4,8 – 16,1	2,675	1,026	1,72·10 ⁷	0,062	0,053
PBR + DEC	9,6 – 25,6	1,919	0,598	1,32·10 ⁷	0,113	0,140

Tab. 15 – Valori massimi di crescita, *growth rate* e produttività volumetrica in PBR con terreno F2 modificato e in PBR con DEC

La crescita di *P. tricornutum* in DEC è stata fortemente influenzata dalle condizioni di temperatura e luce esterne (Fig. 12) che sono risultate sensibilmente più elevate rispetto al periodo di monitoraggio del PBR con terreno sintetico. Buono e collaboratori (2016) hanno confrontato la produttività di *P. tricornutum* su terreno sintetico in un PBR da 100 L posto in una serra sperimentale rispetto ad un PBR da 250 L posto in ambiente chiuso e controllato, osservando una significativa riduzione della produttività nel primo caso, dovuta alle variazioni stagionali di luce e temperatura; in particolare gli autori riportano che le migliori condizioni di crescita per quest'alga all'interno della serra sperimentale sono state nei mesi autunnali (ottobre-novembre) quando l'irradianza non era troppo elevata e la temperatura non superiore a 20 °C. Nel nostro caso, la crescita della diatomea ha subito un marcato rallentamento a temperature di poco superiori a 20 °C ma in presenza di un'alta irradianza, suggerendo un effetto sinergico di questi due parametri nel controllo della crescita; in aggiunta, le singole fluttuazioni infrasettimanali di quasi 10 °C fra una giornata e l'altra possono aver indotto un maggiore stress nell'alga.

4.2.2.1. Efficienza fotosintetica e consumo dei nutrienti

In figura 14 sono riportati i valori di F_v / F_m (*yield* massimo) e di F'_v / F'_m (*yield* effettivo) osservati nei PBR; in particolare per il PBR allestito con terreno F2 modificato si osserva una lieve riduzione dello *yield* effettivo successiva alla seconda aggiunta di nuovo terreno (27/01/2017), mentre i valori dello *yield* massimo restano più costanti nel tempo (Fig. 14.a). Nel sistema con DEC (Fig. 14.b) in un primo momento i valori di *yield* effettivo risultano costanti e più alti rispetto a quelli osservati nel PBR con terreno sintetico, in seguito però calano in concomitanza dell'aumento di temperatura e irradianza e del collasso della coltura; questo calo, a differenza del PBR con sintetico, si osserva anche per lo *yield* massimo.

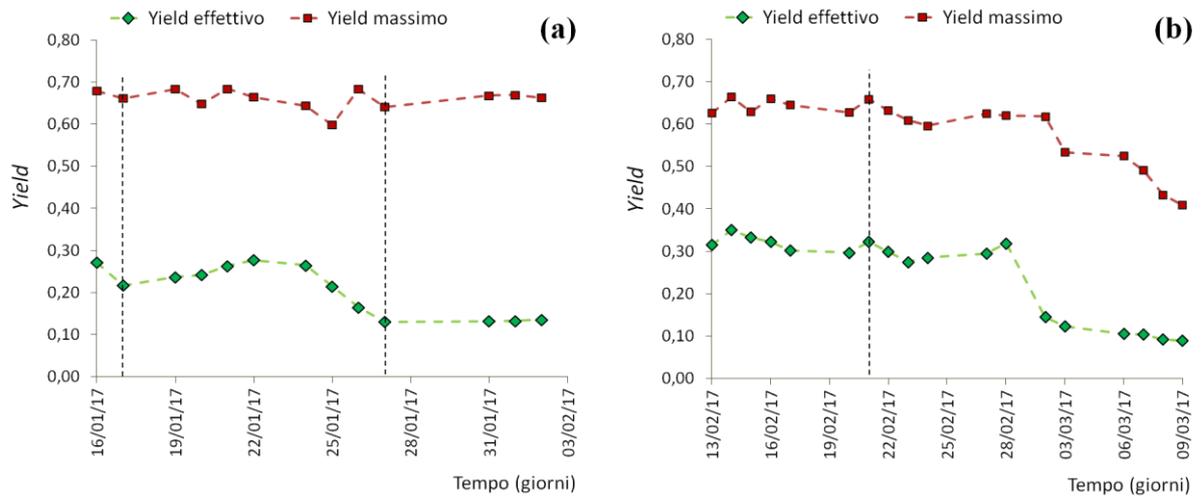


Fig. 14 – Variazioni di *yield* massimo e di *yield* effettivo in PBR con terreno F2 modificato (14.a) e in PBR con DEC (14.b)

Nel PBR con terreno sintetico il leggero calo della torbidità in seguito alla seconda diluizione il 27/01/2017 (Fig. 13.a), in concomitanza col contemporaneo e graduale incremento delle temperature (Fig. 12.b) e, in particolare, dell'irradianza (Fig. 12.a) potrebbe spiegare il lieve abbassamento dei valori di *yield* effettivo riscontrati, in quanto in questa condizione le cellule microalgali sono meno dense e si riduce l'effetto di autombreggiamento della coltura, che viene in questo modo maggiormente esposta alla luce.

L'abbassamento dei valori di *yield* massimo nel PBR con DEC può essere messo in relazione alla ormai compromessa capacità fotosintetica dell'alga dovuta alle elevate temperature che hanno portato, infine, al collasso della coltura. Un dato interessante è che nel primo arco di tempo *P. tricornutum* ha dimostrato un'efficienza fotosintetica (*yield* effettivo) maggiore rispetto alla controparte con terreno sintetico, sottolineando come il PBR allestito con DEC in condizioni ottimali possa rappresentare un buon sistema di produzione; questa osservazione è inoltre supportata dal più alto *growth rate* osservato in questa fase della crescita (Tab. 15). Un'ulteriore prova che non sia stato direttamente il DEC a causare il collasso della popolazione è data dagli stessi valori di *yield* effettivo, che si mantengono alti e costanti anche dopo l'aggiunta di nuovo DEC alla coltura il 21/02/2017 (Fig. 14.b) e fino all'incremento repentino della temperatura che passa da circa 15 °C a circa 25 °C il 28/02/2017 (Fig. 12.b).

Ad oggi non esistono valutazioni così accurate dell'efficienza fotosintetica su sistemi di coltivazione in larga scala; Mirón e collaboratori (2003) hanno per esempio confrontato la crescita e la composizione di *P. tricornutum* in PBR collocati all'aperto (Sud della Spagna, aprile-maggio) e settati ad una temperatura costante di circa 22 °C attraverso un sistema di

controllo termostatico; gli autori hanno in particolare misurato lo *yield* massimo osservato in diverse giornate della sperimentazione per valutare eventuale fotoinibizione delle colture, tuttavia questo dato non è stato posto in correlazione con le fluttuazioni infrasettimanali dei parametri ambientali (in particolare dell'irradianza) e gli autori non hanno preso in considerazione il valore dello *yield* effettivo. Dai nostri dati si evince che piccole variazioni di luce e temperatura (sperimentazione in PBR) non inducono cambiamenti evidenti nello *yield* massimo, al contrario lo *yield* effettivo ha mostrato un lieve calo anche in presenza di fluttuazioni meno consistenti, dando una stima più accurata di una iniziale fase di stress fotofisiologico. Questo studio pertanto ci ha permesso di evidenziare le potenzialità del fluorimetro PAM nel monitorare in maniera rapida e non invasiva lo stato fisiologico delle alghe in prototipi industriali.

I macronutrienti azotati ($N-NO_2 + N-NO_3$) e ortofosfati (PO_4) presenti nel DEC sono stati efficacemente consumati da *P. tricornutum* nel PBR durante la crescita (Fig. 15), tuttavia, al momento del collasso della popolazione negli ultimi giorni sono stati riscontrati nuovamente nel mezzo coltura a concentrazioni comprese fra 2-10 $mg L^{-1}$. In particolare dopo l'aggiunta di nuovo DEC (21/02/2017) nitriti e fosfati sono stati immediatamente consumati dall'alga, mentre la concentrazione di $N-NO_3$ si è mantenuta costante a circa 10 $mg L^{-1}$ indicando che prima del declino della popolazione microalgale non si fosse creata una situazione di limitazione da azoto. La concentrazione residua dei nutrienti negli ultimi giorni della coltura, verso la fine di febbraio e sotto il forte stress causato dall'alta irradianza e temperatura (Fig. 12), ci suggerisce che si siano verificati eventi di lisi cellulare che hanno portato al rilascio di questi nutrienti in coltura; ciò è supportato anche dal forte abbassamento dei valori di *yield* massimo (Fig. 14.b) e della conta cellulare (Fig. 13.b).

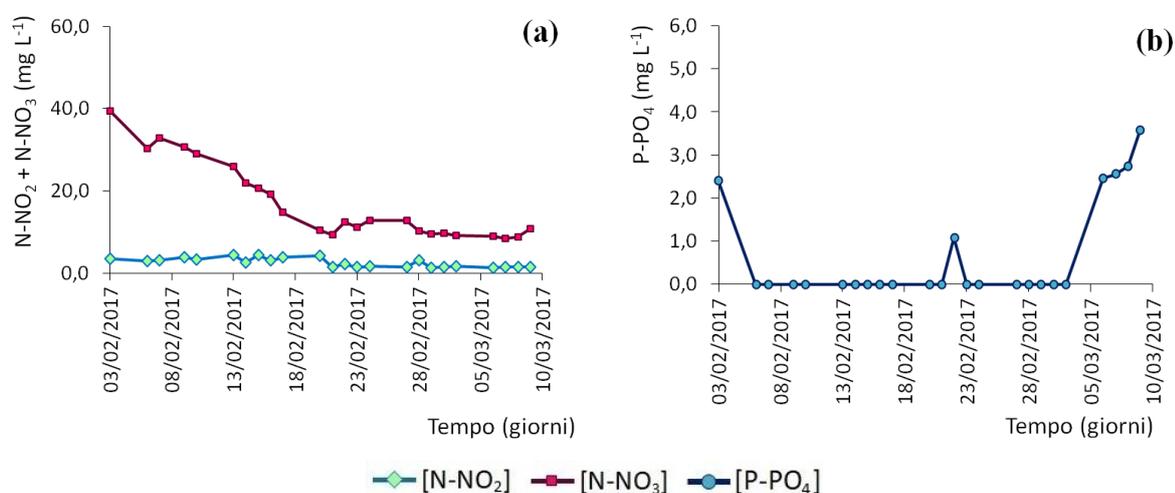


Fig. 15 – Consumo dei nutrienti azotati NO_2 e NO_3 (15.a) e fosfati PO_4 (15.b) in PBR con DEC

4.2.2.2. Composizione elementare e caratterizzazione cellulare

I dati del CHN e del fosforo intracellulare (Fig. 16) mostrano che la composizione media di *P. tricornutum* nei PBR è piuttosto simile, con alti valori di C organico (40-50%) e di detrito cellulare (40-60%); quest'ultimo nel sistema con DEC tende ad accumularsi nel tempo man mano che i contenuti di C, N e P diminuiscono al collasso della coltura.

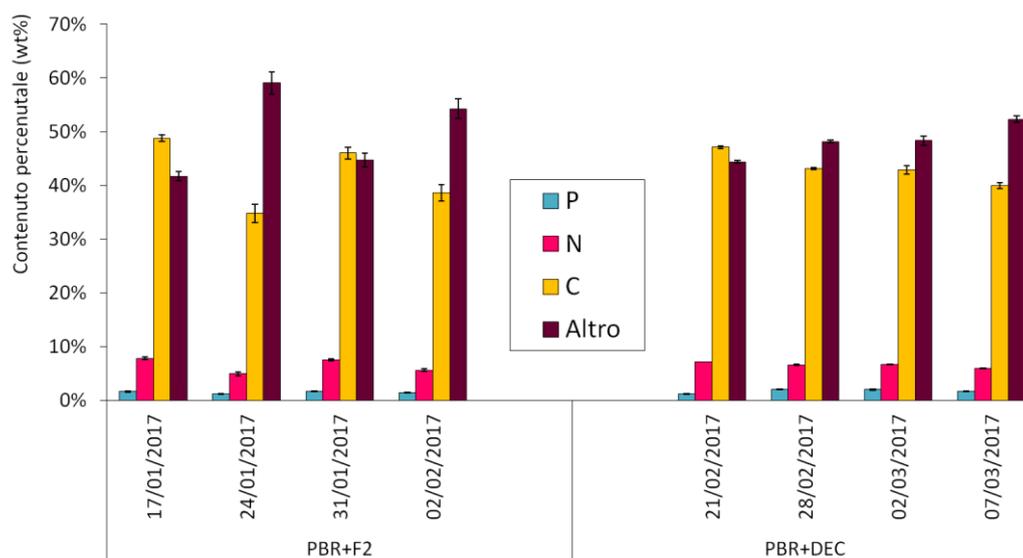


Fig. 16 – Composizione elementare di P intracellulare, C e N organici in PBR con F2 modificato e in PBR con DEC

I grafici in figura 17 mostrano le percentuali su peso secco dell'alga (wt%) delle principali macromolecole che compongono le cellule microalgali in diversi momenti della sperimentazione (Fig. 13). In linea generale la biomassa algale nel PBR con terreno sintetico presenta un più alto e significativo ($p < 0,05$) contenuto di lipidi rispetto al PBR con DEC, mentre un andamento contrario si osserva per quanto riguarda i polisaccaridi, anche se le differenze riscontrate non sono risultate significative ($p > 0,05$). La percentuale di proteine è invece abbastanza simile ($p > 0,05$) e alta in entrambi i sistemi, con valori vicini al 50%. Al collasso della coltura nel PBR con DEC (13.b), proteine e lipidi sono più bassi, mentre i polisaccaridi sembrano aumentare.

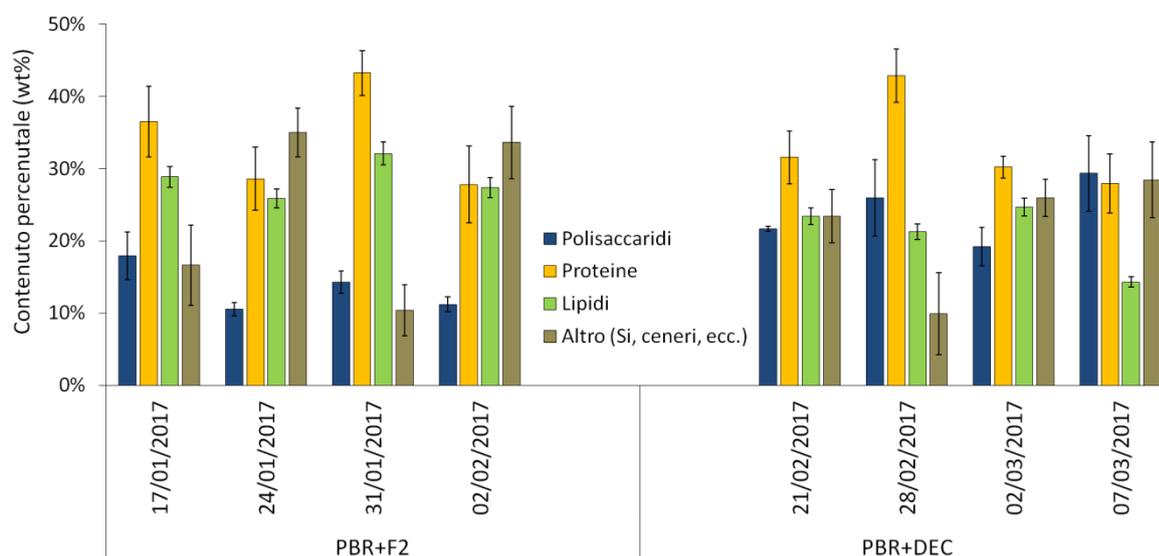


Fig. 17 – Contenuto di polisaccaridi, proteine, lipidi e detrito cellulare in PBR con terreno sintetico e in PBR con DEC

A differenza della fase in *batch*, nel PBR con DEC la frazione proteica è risultata più alta lungo l'intero arco della sperimentazione e questo dato potrebbe essere spiegato dalle differenti concentrazioni dei macronutrienti azotati osservate; infatti, la composizione della biomassa riscontrata in *batch* (Tab. 13) si riferisce a condizioni di carenza di azoto nelle quali l'alga era già entrata in fase stazionaria (Fig. 7), mentre nel sistema di coltura del PBR con il DEC l'azoto, sottoforma di NO_3 , non è mai in limitazione (Fig. 15). In aggiunta, analogamente ai nostri risultati, anche altri autori hanno riscontrato percentuali elevate di proteine pari a circa 50-60% su peso secco di biomassa algale di *P. tricornutum* in PBR con terreni sintetici allestiti in semi-continuo. (Buono et al., 2016; Sánchez Mirón et al., 2003; Torzillo et al., 2012).

Osservando il contenuto degli acidi grassi (Fig. 18), nel PBR con terreno sintetico i FAs più abbondanti sono risultati rispettivamente i C16 insaturi (C16:1 + C16:3) che rappresentano il 40-45% del totale e l'EPA (C20:5) presente in percentuali fra il 30-35%; questi acidi grassi sono stati osservati in tutti i giorni di raccolta con lievi variazioni nell'arco del tempo (Fig. 15). In ordine di abbondanza di seguito troviamo invece l'acido palmitico C16:0 (12-15%), i C18 insaturi (1-6%) e l'acido miristico C14:0 (3-4%); altri FAs sono presenti in concentrazioni più basse attorno al 1-2% (e.g. C 20:4, C24:0).

Nel PBR con DEC, l'acido grasso più abbondante è risultato l'EPA in percentuale costante pari a circa il 35% nei primi giorni di campionamento, seguito dai C16 insaturi (27-35%), dall'acido palmitico C16:0 (14-16%) e dai C18 insaturi (4-12%), mentre i FAs minori seguono un andamento simile in entrambi i PBR.

Un dato interessante è rappresentato dai livelli di DHA che nel PBR con DEC aumentano nel tempo quasi raddoppiando (1,6%-2,6%), mentre nel sistema con terreno sintetico sono costanti; nella tabella 16 è riportato il rapporto DHA/EPA nei giorni di prelievo.

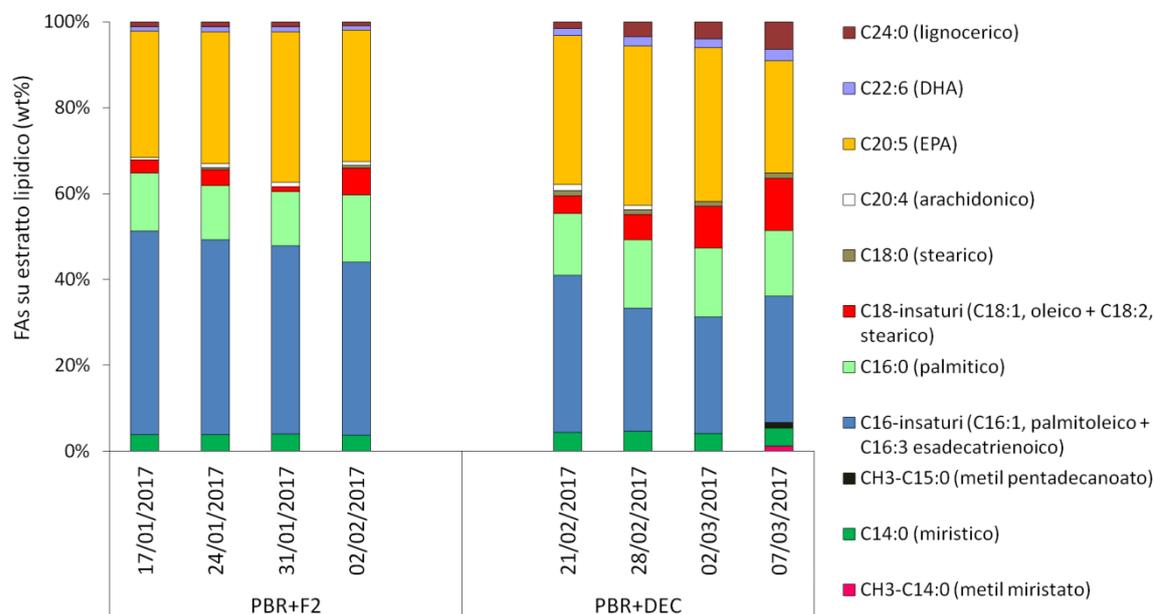


Fig. 18 – Profilo dei FAs in PBR con F2 modificato e in PBR con DEC

	17/01/2017	24/01/2017	31/01/2017	02/02/2017
PBR+F2	0,036	0,036	0,033	0,034
	21/02/2017	28/02/2017	02/03/2017	07/03/2017
PBR+DEC	0,046	0,059	0,060	0,101

Tab. 16 – Rapporto DHA/EPA in PBR con F2 modificato e in PBR con DEC nelle giornate di prelievo

Il profilo dei FAs ottenuto nel sistema con DEC è in linea con quanto osservato da altri autori in PBR allestiti con terreno sintetico (Torzillo et al., 2012); in particolare la resa in EPA nel PBR con DEC, superiore al 35%, è più alta rispetto a quanto osservato da noi in PBR con F2 modificato (Fig. 18) e da Mirón e colleghi (2003) che riportano una percentuale del 27-30% in PBR con terreno sintetico. Questi dati, uniti all'alta percentuale di proteine (Fig. 17), fanno sì che il prodotto ottenuto possa essere potenzialmente collocato nel settore della mangimistica, in particolare per l'acquacoltura. Un altro dato interessante è la variazione nel contenuto percentuale di DHA; sebbene infatti questo acido grasso rappresenti

una piccola frazione dei FAs totali in *P. tricornutum* (Hamilton et al., 2016), è interessante come, avvicinandosi al collasso della coltura, il DHA tende ad aumentare. Calcolando il rapporto DHA/EPA (Tab. 16), si osserva che questo resta pressoché costante nel PBR con terreno sintetico ed aumenta invece nel PBR con DEC nell'ultimo periodo della coltura; Qiao e collaboratori (2016) hanno osservato un trend simile di questo rapporto in *P. tricornutum* sottoposto a stress da salinità, nutrienti e temperatura e suggeriscono che l'incremento del rapporto DHA/EPA potrebbe essere una risposta cellulare allo stress ossidativo dovuto a condizioni molto sfavorevoli per la crescita dell'alga. Nel nostro caso, dunque, l'aumento progressivo nel tempo del rapporto DHA/EPA costituisce un'ulteriore prova del cattivo stato fisiologico delle cellule di *P. tricornutum* nel PBR con DEC a causa delle condizioni ambientali di luce e temperatura.

4.2.3. Crescita di *P. tricornutum* in vasche con una frazione di digestato liquido

Le curve di crescita dell'alga nelle vasche allestite con DEC, VA (19.a) e VB (19.b) sono descritte dai parametri di torbidità, peso secco e conta cellulare. A differenza dei PBR, nelle vasche l'aggiunta di terreno DEC è stata eseguita più volte nel corso della sperimentazione; questa continua diluizione del mezzo è stata effettuata dapprima per portare a regime la coltura (giorno 25/02/2017 e 28/02/2017 rispettivamente per VA e per VB) e in seguito per compensare l'evaporazione. In un primo momento, si è voluto mettere a confronto un sistema a cui veniva regolarmente insufflata CO₂ (VA) con un altro (VB) dove avvenisse solamente il naturale scambio gassoso aria-superficie, al fine di rendere più sostenibile economicamente la coltivazione; tuttavia l'aumento eccessivo dei valori di pH nella vasca VB (8,5-9) ha reso necessario somministrare anche a questo sistema la CO₂ per ripristinare i valori di pH ottimali.

La crescita osservata nelle due vasche (Fig. 19) ha mostrato andamenti simili, con valori massimi confrontabili fra di loro (Tab. 17). Tuttavia, a partire dal giorno 21/02/2017 in entrambe le vasche possiamo osservare una progressiva diminuzione della crescita, fino al collasso delle colture; come visto per il PBR con DEC, in entrambe le vasche il declino della popolazione è iniziato in concomitanza con l'esponenziale aumento di temperatura e irradianza ed in presenza di forti fluttuazioni infrasettimanali di questi parametri ambientali (Fig. 12).

A parità di condizioni ottimali di crescita anche le vasche con DEC hanno mostrato un più alto *growth rate* rispetto al PBR con terreno sintetico e in particolare nella vasca VA si è osservata la più alta produttività di tutti i sistemi monitorati a confronto fra loro (Tab. 17).

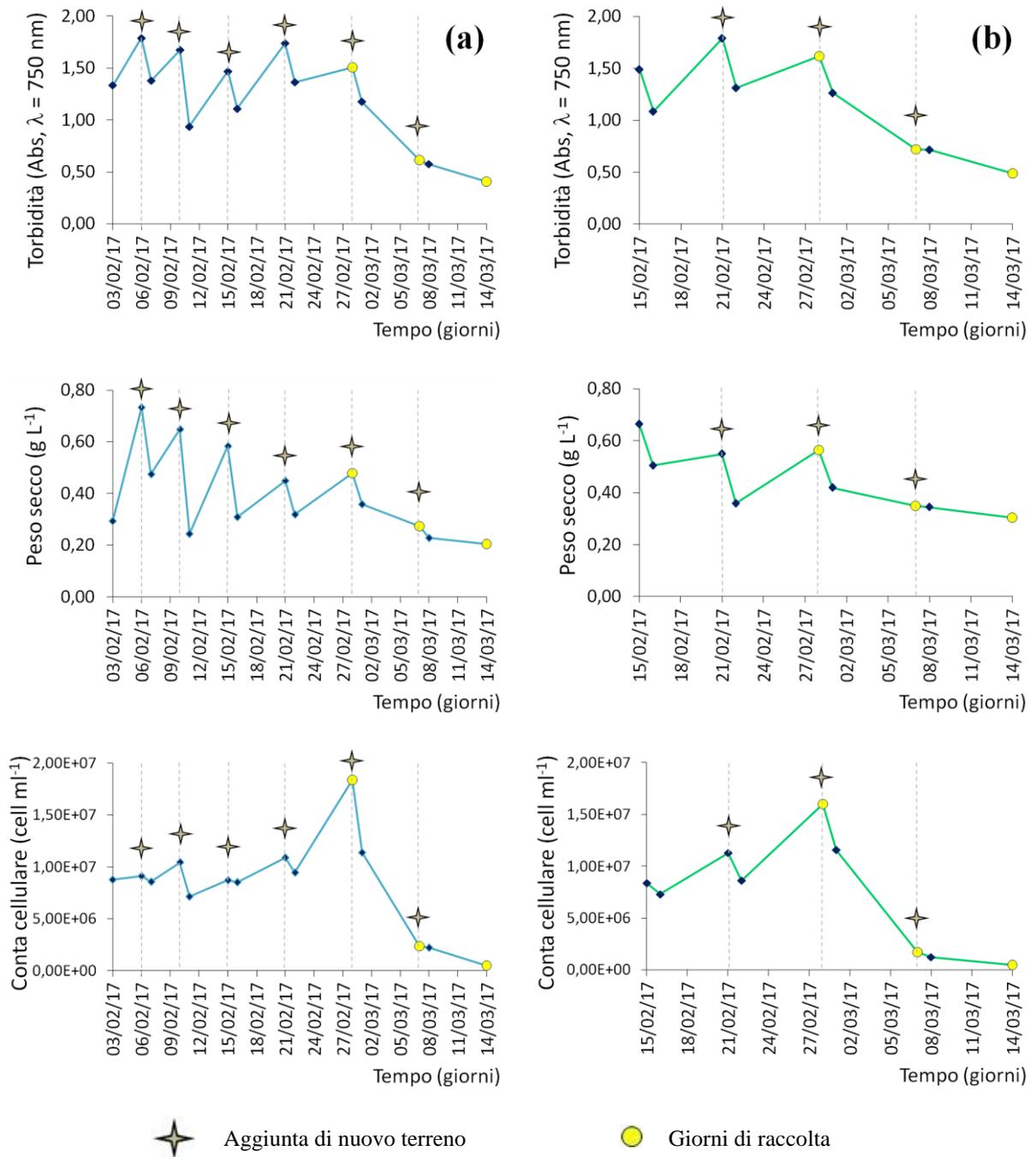


Fig. 19 – Curve di crescita di *P. tricornutum* nelle vasche VA (19.a) e VB (19.b) con DEC

	Variazione di Temperatura (°C)	Abs _{MAX}	DW _{MAX} (g L ⁻¹)	Conta _{MAX} (cell ml ⁻¹)	μ (day ⁻¹)	P_b MAX (g L ⁻¹ day ⁻¹)
VA+DEC	9,6 – 26,0	1,791	0,734	1,84·10 ⁷	0,111	0,147
VB+DEC	12,4 – 26,0	1,790	0,664	1,60·10 ⁷	0,103	0,027

Tab. 17 – Massimi valori di crescita, produttività volumetrica del sistema e *growth rate* nelle vasche VA e VB con DEC

In letteratura, dati sulla produttività in vasche di volumi paragonabili ai nostri e con acque reflue sono scarsi; Buono e collaboratori (2016) riportano ad esempio una produttività di $0,026 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ in vasche con un volume di circa 2500 L allestite con un digestato precedentemente filtrato, centrifugato e autoclavato; questo dato risulta più basso della vasca VA ma in linea con la vasca VB (Tab. 17), tuttavia non è direttamente confrontabile ai nostri dati a causa dei diversi volumi coinvolti e del diverso terreno impiegato. I dati più alti di produttività da noi ottenuti per la vasca VA si riferiscono ai primi giorni di monitoraggio della coltura (03/02/017-06/02/2017) e per questo motivo risultano diversi da quelli ottenuti in VB, allestita solo in un secondo periodo (15/02/2017) quando sia irradianza che temperatura erano sensibilmente più alte (Fig. 12). In ogni caso, la massima produttività osservata in VA ci conferma che in condizioni ottimali di crescita il DEC rappresenta un ottimo medium per la coltivazione di microalghie e il suo impiego in sistemi di coltura aperti come le vasche può essere ottimale.

4.2.3.1. Efficienza fotosintetica e consumo dei nutrienti

I valori di F_v / F_m (*yield* massimo) e di F'_v / F'_m (*yield* effettivo) misurati nelle due vasche diminuiscono nel tempo in concomitanza con il collasso della coltura (Fig. 20). Come già visto per il PBR con DEC (13.b), il marcato abbassamento di questi valori coincide con l'aumento di irradianza e temperatura a partire dalla fine di febbraio (Fig. 12). In particolare, i valori di *yield* massimo riscontrati in VB negli ultimi giorni di campionamento (Fig. 20.b) calano in maniera più marcata rispetto a VA (Fig. 20.a), suggerendo che in questo sistema le cellule fossero maggiormente stressate al momento dei prelievi, nonostante i dati di crescita siano piuttosto simili in entrambe le vasche (Fig. 19).

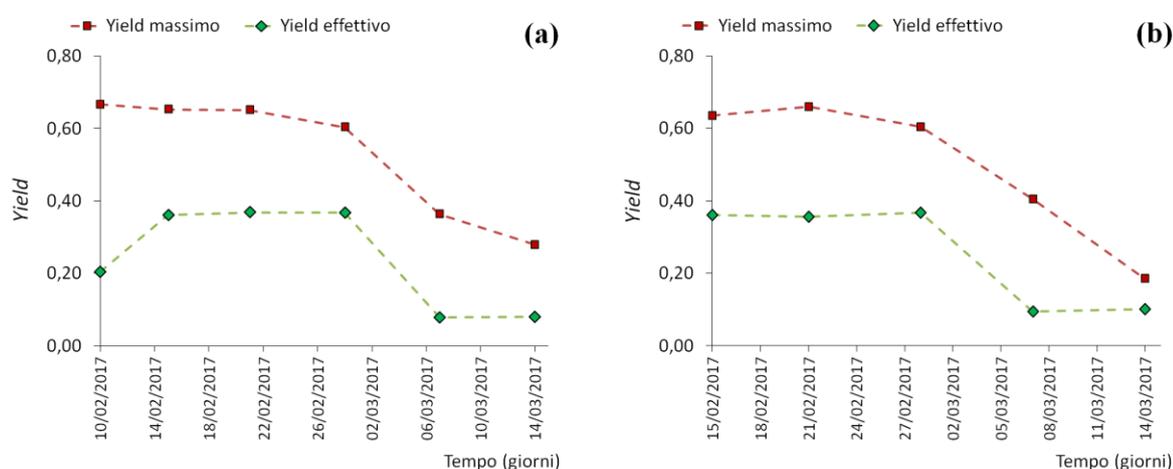


Fig. 20 – Variazioni di *yield* massimo e di *yield* effettivo nelle vasche VA (20.a) e VB (20.b)

I valori di *yield* massimo ed effettivo sono simili a quelli osservati nel PBR con DEC (Fig. 14.b) e nella prima fase di crescita sono più alti rispetto a quelli del PBR con terreno sintetico (14.a), confermando che anche nelle vasche a parità di condizioni ambientali favorevoli, ovvero prima di fine febbraio, il sistema allestito con DEC ha supportato efficacemente la crescita dell'alga.

Come nel PBR con DEC (Fig. 15), in entrambe le vasche i macronutrienti azotati (N-NO₂ + N-NO₃) e ortofosfati (P-PO₄) sono stati rimossi efficacemente dalle cellule di *P. tricornutum* dal mezzo di coltura nel primo periodo della coltivazione; tuttavia, in seguito al declino della popolazione microalgale (Fig. 19), tali nutrienti vengono rilasciati dalle cellule lisate nel terreno, in particolare a partire da fine febbraio (Fig. 21).

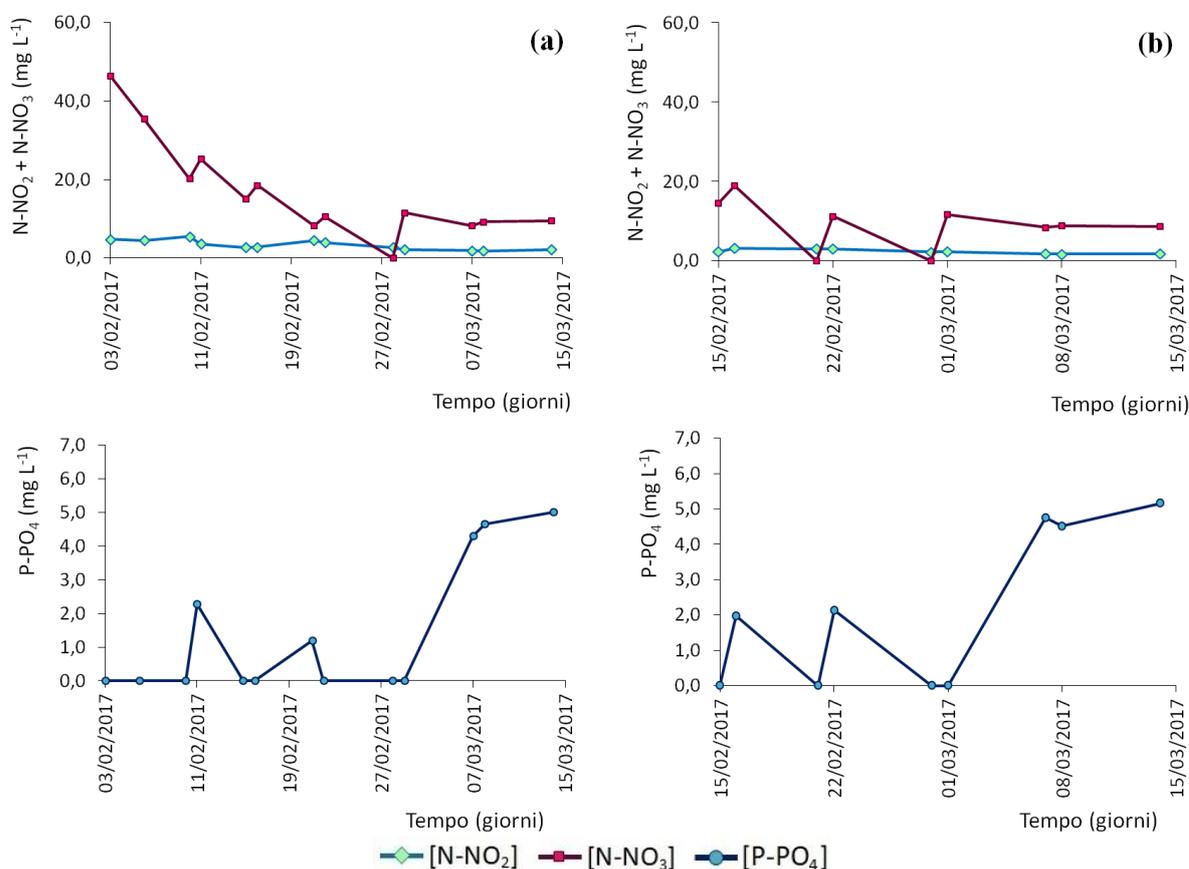


Fig. 21 – Consumo dei macronutrienti azotati e fosfati in VA (21.a) e VB (21.b)

La buona capacità di rimozione dei nutrienti dimostrata da *P. tricornutum* sia nelle vasche che nel PBR rende entrambi questi sistemi adatti alla fitodepurazione; tuttavia, rispetto alle vasche, le procedure di pulizia dei PBR sono spesso più complicate e meno pratiche, a causa in particolare della loro conformazione (Narala et al., 2016); al contrario le vasche sono di più facile gestione, presentano dei costi di allestimento più contenuti e possono trattare

maggiori volumi (Eriksen, 2008), caratteristiche che rendono questi sistemi piuttosto validi per applicazioni nella fitodepurazione.

4.2.3.2. Composizione elementare e caratterizzazione cellulare

I dati del CHN (Fig. 22) ci mostrano una generale diminuzione nel contenuto di C organico lungo tutto il periodo di sperimentazione il quale nelle vasche risulta significativamente più basso ($p < 0,05$) rispetto ad entrambi i PBR (Fig. 16); di conseguenza il detrito cellulare è maggiore (50-65%) in questi sistemi ed aumenta nell'arco del tempo, man mano che ci si avvicina al collasso della popolazione (Fig. 19).

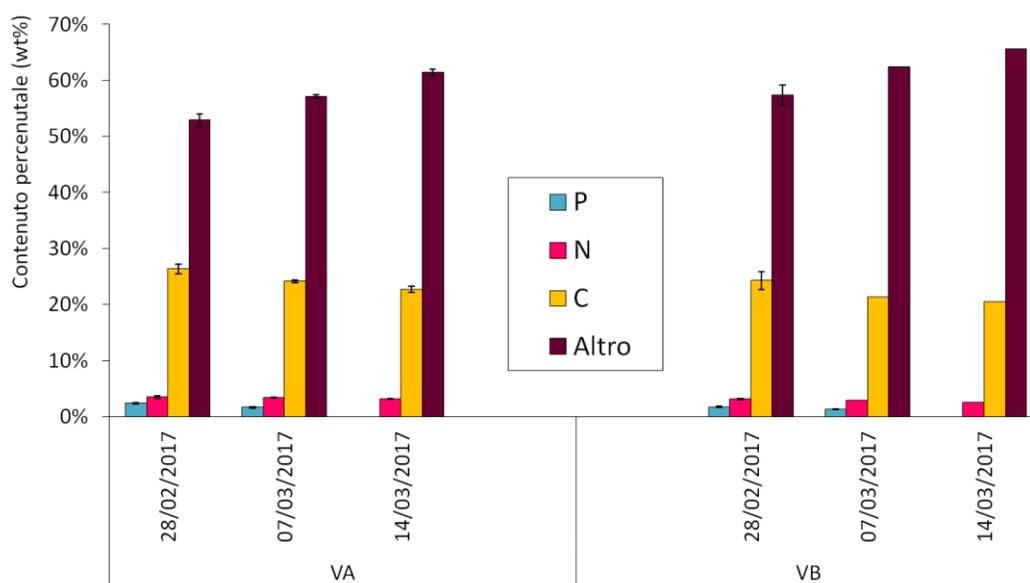


Fig. 22 – Variazioni nel contenuto di C, N organici e P intracellulare nelle vasche con DEC

A differenza dei PBR, le vasche sono sistemi aperti caratterizzate da una più alta diluizione, con una concentrazione di biomassa algale generalmente più bassa (Shen et al., 2009) e sono più facilmente soggette alla contaminazione (Monlau et al., 2015); nei dati da noi ottenuti circa la composizione elementare di *P. tricorutum* il più alto tasso di ceneri/detrito potrebbe essere determinato da tale contaminazione del sistema.

I grafici di figura 23 riportano la composizione biochimica dell'alga nelle vasche, dalla quale è emerso che la biomassa è caratterizzata da un contenuto proteico, lipidico e polisaccaridico più basso rispetto a quello ritrovato nei PBR (Fig. 17) ma questa differenza è risultata significativa ($p < 0,05$) solamente per i lipidi. Analogamente al PBR con DEC (Fig. 17.b), anche nelle vasche lipidi e proteine diminuiscono al collasso della coltura (secondo giorno di prelievo) mentre i polisaccaridi in percentuale aumentano in maniera significativa ($p < 0,05$), passando rispettivamente dal 12 al 25% in VA e dal 13 al 35% in VB. Tuttavia questo

aumento percentuale della frazione polisaccaridica riscontrato in campioni raccolti al momento del collasso della coltura potrebbe non essere imputabile solamente ad un maggior contenuto cellulare in *P. tricornutum*, ma piuttosto alla presenza rilevante di altre componenti biologiche e sostanza organica nei campioni; l'esame al microscopio ottico ha infatti mostrato un basso numero di cellule di *P. tricornutum* (Fig. 19) e la contemporanea presenza di numerosi organismi vegetali e animali contaminanti, assieme ad aggregati batterici e detrito (Fig. 25).

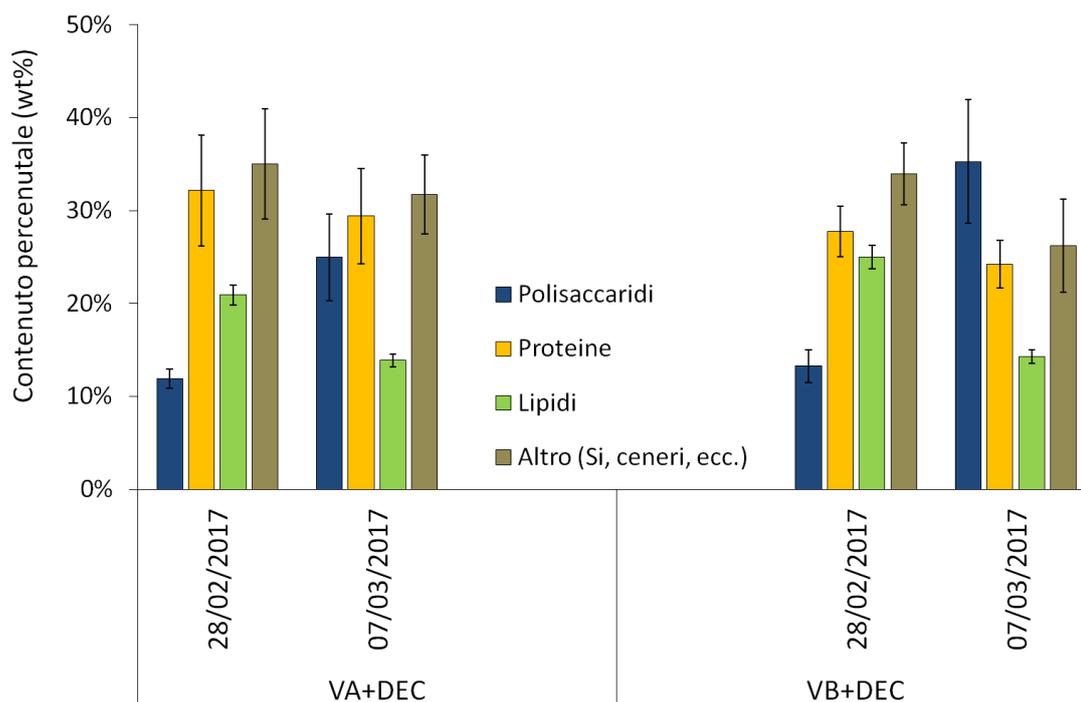


Fig. 23 – Contenuto di polisaccaridi, proteine, lipidi e detrito cellulare nelle vasche VA e VB con DEC

Per quanto concerne il contenuto nel dettaglio degli acidi grassi, dalla figura 24 si può osservare che anche nelle vasche l'EPA rappresenta la frazione più abbondante e nel primo giorno di prelievo è presente ad una concentrazione di circa il 35% in entrambe. Risultano abbondanti anche i C16 insaturi (C16:1+C16:3), presenti con una percentuale compresa fra il 20-40% ai quali seguono, in ordine di abbondanza, acido palmitico (15-18%) e C18 insaturi (5-20%); i componenti minori (e.g. C20:4, C14:0) si presentano in percentuali simili a quanto visto nei PBR (Fig. 16). In entrambe le vasche nei giorni di declino della coltura, corrispondenti ad una bassa conta cellulare (Fig. 19), la composizione dei FAs mostra un aumento consistente di acido lignocerico (C24:0), mentre l'EPA cala a circa un 18% in VA e 11% in VB. Il rapporto DHA/EPA è riportato in tabella 18.

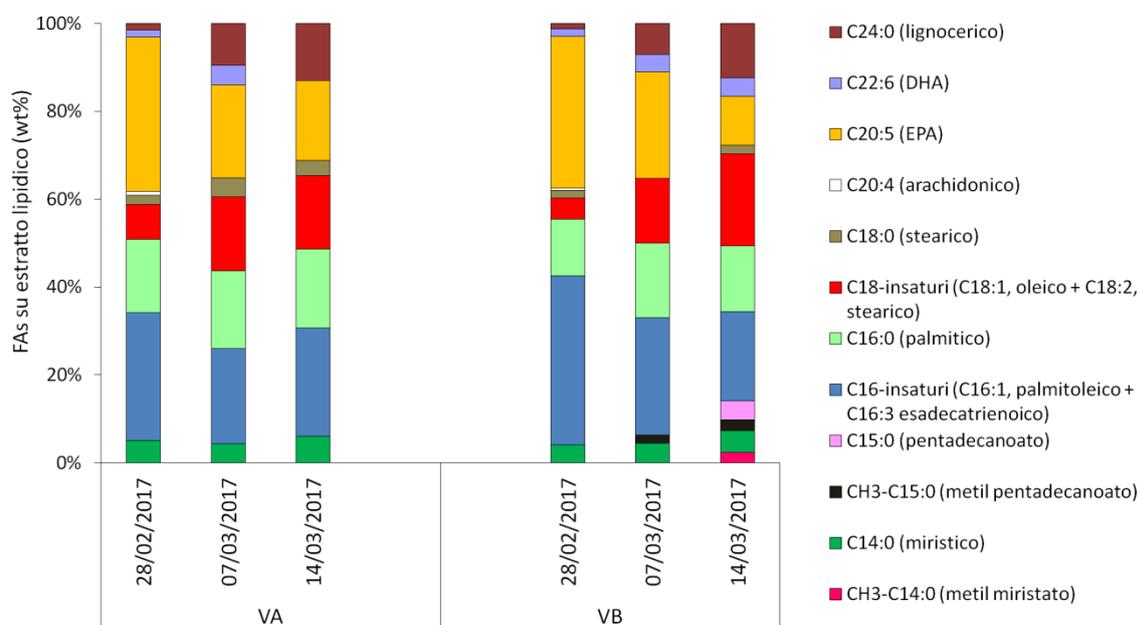


Fig. 24 – Dettaglio dei FAs (wt% su estratto lipidico) nelle vasche VA e VB con DEC

	28/02/2017	07/03/2017	14/03/2017
VA+DEC	0,047	0,211	0,000
VB+DEC	0,051	0,164	0,387

Tab. 18 – Rapporto DHA/EPA nelle vasche VA e VB con DEC nelle giornate di prelievo

La composizione di acidi grassi osservata nel PBR (Fig. 16) e in entrambe le vasche con DEC nel periodo ottimale di crescita, è molto diversa da quanto osservato nelle colture in *batch* dei campioni raccolti in fase stazionaria; in particolare il contenuto di EPA risulta notevolmente incrementato passando da valori del 6-9% in *batch* a valori del 35% negli altri sistemi, mentre contemporaneamente si osserva una riduzione della concentrazione dei C16 insaturi che dal 50% passano al 20-40%. La diversa distribuzione di questi acidi grassi osservata nei nostri campioni, che come precedentemente discusso dipende in particolar modo dalla disponibilità di azoto nel mezzo di coltura (Prestegard et al., 2016; Qiao et al., 2016) suggerisce che la modalità di coltivazione in semi-continuo adottata nei PBR e nelle vasche ha impedito l'instaurarsi di condizioni di forte limitazione da nutrienti. Queste condizioni di coltivazione e raccolta della biomassa hanno favorito la produzione di un maggiore quantitativo di EPA e costituiscono pertanto un vantaggio dal punto di vista economico per l'alto valore di questo composto.

Un dato interessante è l'aumento di acido lignocericico (C24:0) durante l'intero arco della sperimentazione, mentre la coltura entrava in fase di declino (Fig. 19); in letteratura non abbiamo trovato dati riguardanti l'aumento di tale componente, ma avendo osservato un andamento simile anche nel PBR con DEC (Fig. 18) possiamo supporre che l'aumento di tale composto dipenda dalle condizioni di stress della coltura e possa dunque indicare un cattivo stato fisiologico generale dell'alga, ma potrebbe anche derivare dalla diminuzione del numero di cellule (Fig. 19) e dal contemporaneo aumento del detrito e altri materiali in sospensione nel sistema. Analogamente al PBR (Tab. 16), troviamo un aumento del DHA nelle colture in vasca assieme alla contemporanea diminuzione dell'EPA, con la conseguenza che il rapporto DHA/EPA aumenti nel tempo (Tab. 18) che, come già discusso, indica un forte stress nelle colture di *P. tricornutum* dovuto ad esempio a fattori ambientali (Qiao et al., 2016), ad eccezione dell'ultimo giorno di prelievo in cui assistiamo al collasso della coltura (Fig. 19).

4.2.4. Contaminazione delle colture nei sistemi di coltivazione su larga scala

Durante il monitoraggio del PBR e delle vasche con DEC si è osservata la presenza di organismi indesiderati (ciliati, protisti, altre specie microalgali) nelle colture (Fig. 25) ed il loro numero è aumentato esponenzialmente nel corso della sperimentazione fino al declino della coltura di *P. tricornutum*. Presumibilmente questi organismi erano già presenti nel DEC al momento dell'inoculo della diatomea e il progressivo aumento dell'irradianza e temperatura (Fig. 12), condizioni sempre più sfavorevoli per la crescita di *P. tricornutum*, ne ha favorito la proliferazione.

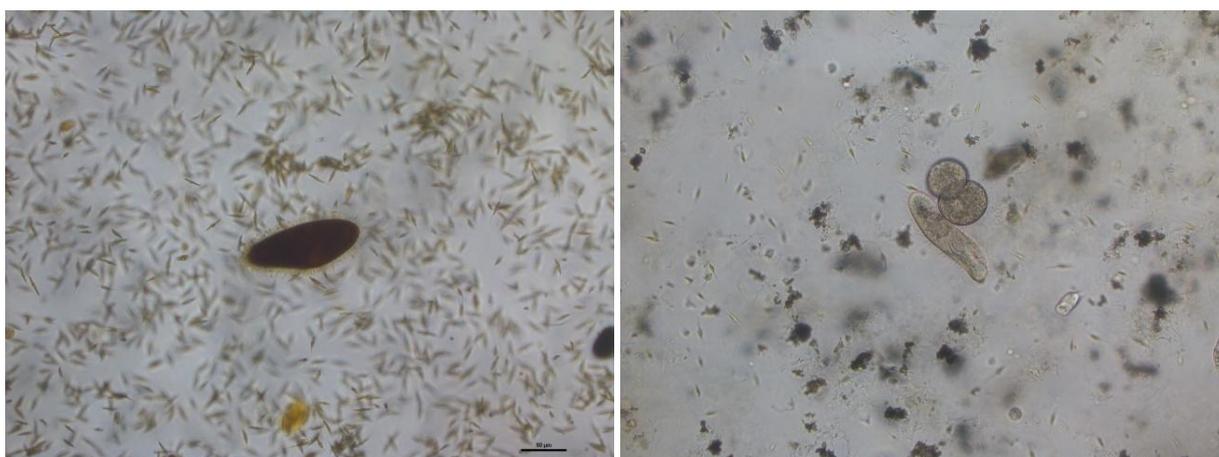


Fig. 25 – Campioni prelevati in due diverse giornate da PBR (sinistra) e vasche (destra) con DEC osservati *in vivo* al microscopio ottico invertito (ingrandimento 200x)

5. CONCLUSIONI

La coltivazione di microalghe ha acquisito un crescente interesse negli ultimi decenni, grazie alle potenziali applicazioni ed impieghi di questi organismi, ma per molte specie la produzione a livelli industriali è frenata dagli elevati costi di allestimento, mantenimento e raccolta. Da diversi anni si cerca di sviluppare nuove strategie nel tentativo di ridurre questi costi e recentemente maggiore attenzione è stata data all'impiego di digestati liquidi come terreni di coltura, tuttavia prove concrete su larga scala sono ancora poche e sono necessari studi approfonditi sulla crescita e la composizione di questi organismi coltivati in reflui.

La prima fase di questo lavoro ha permesso di valutare quale fosse la modalità migliore di somministrazione di CO₂ per incrementare la crescita e la produttività di *P. tricornutum* in colture *batch* allestite con una frazione di digestato liquido; da queste prove è emerso che l'insufflazione di CO₂ pura, seppure per tempi brevi, non rappresenta una metodica ottimale per la fisiologia dell'alga come testimoniato dalla riduzione dell'efficienza fotosintetica osservata, poiché il dispendio energetico necessario alla cellula per contrastare il brusco abbassamento del pH nel mezzo è maggiore rispetto al vantaggio ottenuto dall'aumento della concentrazione del carbonio. Da questi dati si può supporre che, al fine di aumentare la produttività dell'alga, sia più utile una somministrazione in continuo di una miscela di aria e CO₂ regolata da un simultaneo controllo del pH delle colture; questo permetterebbe di ridurre da un lato la quantità di CO₂ dispersa e dall'altro di diminuire lo stress fisiologico dovuto alle variazioni di pH, evitando inoltre che l'eccesso di gas venga disperso nell'atmosfera.

Gli aspetti relativi all'efficienza fotosintetica sono stati studiati in questo lavoro mediante l'analisi con fluorimetro PAM sia nelle colture *batch* che nei prototipi industriali (PBR e vasche) e i risultati ottenuti ci hanno permesso di ottenere una stima indiretta dello stress cellulare e in generale dello stato di salute delle alghe. Il monitoraggio tradizionale dei sistemi industriali di produzione algale richiede talvolta operazioni lunghe e costose per stabilire quale sia lo stato generale delle colture; in questo lavoro abbiamo potuto sottolineare come l'impiego del fluorimetro PAM potrebbe rappresentare una metodica innovativa in campo industriale poiché consente di stabilire in maniera rapida e non invasiva lo stato di salute delle cellule.

Il refluo utilizzato sia nelle nostre prove *batch* che nei sistemi su larga scala si è dimostrato un valido mezzo di coltura per la crescita di *P. tricornutum* che ha mostrato un'alta produttività paragonabile a quella ottenuta in altri sistemi e con altri terreni; in aggiunta,

rispetto ad altri studi in cui venivano impiegati digestati liquidi come medium per la crescita delle microalghe, la frazione liquida di processo industriale in questo lavoro non ha richiesto alcuna diluizione che nel processo produttivo rappresenta sicuramente un vantaggio pratico, potendo essere utilizzato tal quale, ma anche economico poiché si riduce il consumo di acqua per la sua diluizione.

Nel PBR e nelle vasche, tuttavia la crescita dell'alga è stata fortemente influenzata dalle condizioni ambientali, osservando un progressivo declino delle colture con l'aumento dell'irradianza e della temperatura. Spesso in laboratorio si conducono prove in *batch* o in semi-continuo con condizioni controllate dei parametri ambientali e gli effetti di queste variabili sulle colture vengono generalmente valutati separatamente. I sistemi su larga scala sono necessariamente testati in posti all'aperto e quindi tendenzialmente soggetti a più variabili ambientali contemporaneamente senza un controllo diretto da parte dell'operatore; questa condizione rende più difficile effettuare delle specifiche correlazioni fra i parametri ambientali e gli effetti osservati sulla crescita e sulla composizione della biomassa. In aggiunta spesso non è possibile confrontare direttamente i dati ottenuti con quanto riportato in letteratura a causa dei diversi volumi coinvolti e della tipologia di reattore.

A causa delle fluttuazioni stagionali di luce e temperatura alle nostre latitudini, la coltivazione di *P. tricornutum* su larga scala con il refluo DEC nei periodi primaverili-estivi, in seguito all'aumento progressivo delle temperature, richiederebbe un controllo dei parametri ambientali, tuttavia tale approccio non è sostenibile in termini economici. Una strategia vincente potrebbe essere quella di avviare una coltivazione integrata di più specie, allestendo nei mesi autunnali-invernali colture di *P. tricornutum* e nei mesi primaverili-estivi coltura con un'altra specie più tollerante alle temperature elevate (e.g. *A. platensis*) garantendo in questo modo una produzione continua nell'arco dell'anno, più ampia e variegata.

Per quanto concerne la composizione cellulare, *P. tricornutum* nei sistemi con DEC ha dimostrato un'alta percentuale su peso secco di proteine la quale, unita agli elevati tassi di crescita osservati, rende quest'alga particolarmente adatta al settore della mangimistica. Inoltre, in entrambi i sistemi con DEC sono state osservate alte percentuali di EPA, un importante acido grasso che trova allocazione nel mercato nutraceutico ed alimentare ma anche di C16 insaturi, dei potenziali anti-batterici che nel complesso conferiscono a quest'alga un alto valore commerciale. Tuttavia la percentuale di questi acidi grassi varia in funzione della fase di crescita in cui viene prelevata la biomassa dell'alga, sottolineando

come sia importante pianificare la raccolta della biomassa sulla base dei componenti che si vogliono estrarre.

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A., Ibraheem, I.B.M., 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J. Biol. Sci.* 19, 257–275. doi:10.1016/j.sjbs.2012.04.005
- Akhlar, A., Battimelli, A., Torrijos, M., Carrere, H., 2017. Comprehensive characterization of the liquid fraction of digestates from full-scale anaerobic co-digestion. *Waste Manag.* 59, 118–128. doi:10.1016/j.wasman.2016.11.005
- Alcántara, C., Posadas, E., Guieysse, B., Muñoz, R., 2015. Chapter 29 - Microalgae-based Wastewater Treatment, in: Kim, S.-K. (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae*. Academic Press, Boston, pp. 439–455. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00029-7
- Alipanah, L., Rohloff, J., Winge, P., Bones, A.M., Brembu, T., 2015. Whole-cell response to nitrogen deprivation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Exp. Bot.* 66, 6281–6296. doi:10.1093/jxb/erv340
- Amaro, H.M., Barros, R., Guedes, A.C., Sousa-Pinto, I., Malcata, F.X., 2013. Microalgal compounds modulate carcinogenesis in the gastrointestinal tract. *Trends Biotechnol.* 31, 92–98. doi:10.1016/j.tibtech.2012.11.004
- Andersen, R.A., 2013. The Microalgal Cell with Reference to Mass Cultures, in: *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. pp. 3–20.
- APAT, 2003. Metodi analitici per le acque. Volume Primo. Metodo: 4020 - Anioni (fluoruro, cloruro, nitrito, bromuro, nitrato, fosfato e solfato) in cromatografia ionica.
- Apt, K.E., 2002. In vivo characterization of diatom multipartite plastid targeting signals. *J. Cell Sci.* 115, 4061–4069. doi:10.1242/jcs.00092
- Azov, Y., 1982. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Barreira, L., Pereira, H., Gangadhar, K.N., Custódio, L., Varela, J., 2015. Chapter 13 - Medicinal Effects of Microalgae-Derived Fatty Acids, in: Kim, S.-K. (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae*. Academic Press, Boston, pp. 209–231. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00013-3
- Barros, A., Guerra, L.T., Simões, M., Santos, E., Fonseca, D., Silva, J., Costa, L., Navalho, J., 2017. Mass balance analysis of carbon and nitrogen in industrial scale mixotrophic microalgae cultures. *Algal Res.* 21, 35–41. doi:10.1016/j.algal.2016.10.014
- Barros, A.I., Gonçalves, A.L., Simões, M., Pires, J.C.M., 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41, 1489–1500. doi:10.1016/j.rser.2014.09.037
- Barsanti, L., Gualtieri, P., 2014. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC

press.

- Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., McClain, C.R., Feldman, G.C., Los, S.O., Tucker, C.J., Falkowski, P.G., Field, C.B., Frouin, R., Esaias, W.E., 2001. Biospheric primary production during an ENSO transition. *Science* (80-.). 291, 2594–2597.
- Benemann, J.R., Oswald, W.J., 1996. Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO₂ to biomass. Final Report to the US Department of Energy, Pittsburgh. California Univ., Berkeley, CA (United States). Dept. of Civil Engineering.
- Beuckels, A., Smolders, E., Muylaert, K., 2015. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Res.* 77, 98–106. doi:10.1016/j.watres.2015.03.018
- Bhattacharya, D., Medlin, a. L., 1998. Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants. *Plant Physiol.* 116, 9–15. doi:10.1104/pp.116.1.9
- Bjornsson, W.J., Nicol, R.W., Dickinson, K.E., McGinn, P.J., 2013. Anaerobic digestates are useful nutrient sources for microalgae cultivation: Functional coupling of energy and biomass production. *J. Appl. Phycol.* 25, 1523–1528. doi:10.1007/s10811-012-9968-0
- Blanken, W., Cuaresma, M., Wijffels, R.H., Janssen, M., 2013. Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Res.* 2, 333–340. doi:10.1016/j.algal.2013.09.004
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917. doi:dx.doi.org/10.1139/cjm2014-0700
- Borowitzka, M.A., 2013. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.* 25, 743–756. doi:10.1007/s10811-013-9983-9
- Borowitzka, M.A., Moheimani, N.R., 2013. Energy from Microalgae: A Short history, in: *Algae for Biofuels and Energy*. pp. 1–15. doi:10.1007/978-94-007-5479-9
- Borowitzka, M.A., Volcani, B.E., 1978. The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricornutum*: ultrastructure of its morphotypes. *J. Phycol.* 14, 10–21. doi:10.1111/j.1529-8817.1978.tb00625.x
- Brembu, T., Mühlroth, A., Alipanah, L., Bones, A.M., 2017. The effects of phosphorus limitation on carbon metabolism in diatoms. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160406. doi:10.1098/rstb.2016.0406
- Breuer, G., Lamers, P.P., Martens, D.E., Draaisma, R.B., Wijffels, R.H., 2012. The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresour. Technol.* 124, 217–226. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.003
- Buono, S., Colucci, A., Angelini, A., Langellotti, A.L., Massa, M., Martello, A., Fogliano, V., Dibenedetto, A., 2016. Productivity and biochemical composition of *Tetrademus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum*: effects of different cultivation approaches. *J. Appl. Phycol.* 1–14. doi:10.1007/s10811-016-0876-6
- Cahu, C., Salen, P., De Lorgeril, M., 2004. Farmed and wild fish in the prevention of cardiovascular diseases: Assessing possible differences in lipid nutritional values. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 14, 34–41.
- Canter, C.E., Blowers, P., Handler, R.M., Shonnard, D.R., 2015. Implications of widespread

algal biofuels production on macronutrient fertilizer supplies: Nutrient demand and evaluation of potential alternate nutrient sources. *Appl. Energy* 143, 71–80. doi:10.1016/j.apenergy.2014.12.065

- Carvalho, A.P., Meireles, L.A., Malcata, F.X., 2006. Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* doi:10.1021/bp060065r
- Chaiprapat, S., Sasibunyarat, T., Charnnok, B., Cheirsilp, B., 2017. Intensifying Clean Energy Production Through Cultivating Mixotrophic Microalgae from Digestates of Biogas Systems: Effects of Light Intensity, Medium Dilution, and Cultivating Time. *BioEnergy Res.* 1–12.
- Chen, C.Y., Zhao, X.Q., Yen, H.W., Ho, S.H., Cheng, C.L., Lee, D.J., Bai, F.W., Chang, J.S., 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem. Eng. J.* 78, 1–10. doi:10.1016/j.bej.2013.03.006
- Chini Zittelli, G., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M.R., 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture* 261, 932–943. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.08.011
- Christaki, E., Bonos, E., Florou-Paneri, P., 2015. Chapter 14 - Innovative Microalgae Pigments as Functional Ingredients in Nutrition, in: Kim, S.-K. (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae*. Academic Press, Boston, pp. 233–243. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00014-5
- Christenson, L., Sims, R., 2011. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnol. Adv.* 29, 686–702. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.015
- Clarens, A.F., Resurreccion, E.P., White, M.A., Colosi, L.M., 2010. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1813–1819.
- Coustets, M., Al-Karablieh, N., Thomsen, C., Teissié, J., 2013. Flow process for electroextraction of total proteins from microalgae, in: *Journal of Membrane Biology*. pp. 751–760. doi:10.1007/s00232-013-9542-y
- Coustets, M., Joubert-Durigneux, V., H??rault, J., Schoefs, B., Blanckaert, V., Garnier, J.P., Teissi??, J., 2015. Optimization of protein electroextraction from microalgae by a flow process. *Bioelectrochemistry* 103, 74–81. doi:10.1016/j.bioelechem.2014.08.022
- De Jesus Raposo, M.F., De Morais, R.M.S.C., De Morais, A.M.M.B., 2013. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sci.* 93, 479–486. doi:10.1016/j.lfs.2013.08.002
- De la Noüe, J., Laliberté, G., Proulx, D., 1992. Algae and waste water. *J. Appl. Phycol.* 4, 247–254. doi:10.1007/BF02161210
- De Martino, A., Meichenin, A., Shi, J., Pan, K., Bowler, C., 2007. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) accessions. *J. Phycol.* 43, 992–1009. doi:10.1111/j.1529-8817.2007.00384.x
- Dean, A.P., Sigee, D.C., Estrada, B., Pittman, J.K., 2010. Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresour. Technol.* 101, 4499–4507. doi:Doi

- Delgadillo-Mirquez, L., Lopes, F., Taidi, B., Pareau, D., 2016. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnol. Reports* 11, 18–26. doi:10.1016/j.btre.2016.04.003
- Desbois, A.P., Lebl, T., Yan, L., Smith, V.J., 2008. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 755–764. doi:10.1007/s00253-008-1714-9
- Desbois, A.P., Mearns-Spragg, A., Smith, V.J., 2009. A Fatty Acid from the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* is Antibacterial Against Diverse Bacteria Including Multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Mar. Biotechnol.* 11, 45–52. doi:10.1007/s10126-008-9118-5
- Dismukes, G.C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G.M., Posewitz, M.C., 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 235–240. doi:10.1016/j.copbio.2008.05.007
- Doughman, S.D., Krupanidhi, S., Sanjeevi, C.B., 2007. Omega-3 fatty acids for nutrition and medicine: considering microalgae oil as a vegetarian source of EPA and DHA. *Curr. Diabetes Rev.* 3, 198–203.
- Douskova, I., Doucha, J., Livansky, K., MacHat, J., Novak, P., Umysova, D., Zachleder, V., Vitova, M., 2009. Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, 179–185. doi:10.1007/s00253-008-1811-9
- Dubinsky, Z., Matsukawa, R., Karube, I., 1995. Photobiological aspects of algal mass culture. *J. Mar. Biotechnol* 2, 61–65.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. doi:10.1021/ac60111a017
- Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M., Sijtsma, L., 2014. Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. *IPTS Inst. Prospect. Technol. Stud. JRC, Sev.*
- Eriksen, N.T., 2008. The technology of microalgal culturing. *Biotechnol. Lett.* 30, 1525–1536. doi:10.1007/s10529-008-9740-3
- Eskinazi-Leça, E., Gonçalves da Silva Cunha, M. da G., Santiago, M.F., Palmeira Borges, G.C., Cabral de Lima, J.M., Da Silva, M.H., De Paula Lima, J., Menezes, M., 2010. Bacillariophyceae, in: Janeiro., R. de J.A.J.E.I. de P.J.B. do R. de (Ed.), *Catálogo de Plantas E Fungos Do Brasil* . Vol. 1. pp. 262–309. doi:10.7476/9788560035083
- Faimali, M., Giussani, V., Piazza, V., Garaventa, F., Corrà, C., Asnaghi, V., Privitera, D., Gallus, L., Cattaneo-Vietti, R., Mangialajo, L., Chiantore, M., 2012. Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 76, 97–107. doi:10.1016/j.marenvres.2011.09.010
- Falkowski, P.G., Raven, J.A., 2013. *Aquatic photosynthesis*. Princeton University Press.

- Fernández, F.G., Pérez, J.A., Sevilla, J.M., Camacho, F.G., Grima, E.M., 2000. Modeling of eicosapentaenoic acid (EPA) production from *Phaeodactylum tricornutum* cultures in tubular photobioreactors. Effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance. *Biotechnol. Bioeng.* 68, 173–183.
- Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T., Falkowski, P., 1998. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* (80-.). 281, 237–240. doi:10.1126/science.281.5374.237
- Fiori, E., Mazzotti, M., Guerrini, F., Pistocchi, R., 2013. Combined effects of the herbicide terbuthylazine and temperature on different flagellates from the Northern Adriatic Sea. *Aquat. Toxicol.* 128–129, 79–90. doi:10.1016/j.aquatox.2012.12.001
- Fon Sing, M., 2010. Strain selection and outdoor cultivation of halophilic microalgae with potential for large-scale biodiesel production. Murdoch University.
- Frigon, J.C., Matteau-Lebrun, F., Hamani Abdou, R., McGinn, P.J., O’Leary, S.J.B., Guiot, S.R., 2013. Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. *Appl. Energy* 108, 100–107. doi:10.1016/j.apenergy.2013.02.051
- Gao, T., Li, X., 2011. Using thermophilic anaerobic digestate effluent to replace freshwater for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 102, 2126–2129. doi:10.1016/j.biortech.2010.08.088
- Garcia-Pichel, F., Belnap, J., Neuer, S., Schanz, F., 2003. Estimates of global cyanobacterial biomass and its distribution. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algal. Stud.* 109, 213–227.
- Garofalo, A., 2016. Ottimizzazione della produzione di polisaccaridi e lipidi nella diatomea marina *Phaeodactylum tricornutum* in coltura. Tesi di laurea in Botanica Marina Applicata. Università di Bologna.
- Geissdoerfer, M., Savaget, P., Bocken, N.M.P., Hultink, E.J., 2017. The Circular Economy – A new sustainability paradigm? *J. Clean. Prod.* doi:10.1016/j.jclepro.2016.12.048
- Gerardo, M.L., Oatley-Radcliffe, D.L., Lovitt, R.W., 2014. Integration of membrane technology in microalgae biorefineries. *J. Memb. Sci.* 464, 86–99. doi:10.1016/j.memsci.2014.04.010
- Ghezelbash, F., Farboodnia, T., Heidari, R., Agh, N., 2008. Biochemical Effects of Different Salinities and Luminance on Green Microalgae *Tetraselmis chuii*. *Res. J. Biol. Sci.* doi:rjbsci.2008.311.314
- Glibert, P.M., 2016. Margalef revisited: A new phytoplankton mandala incorporating twelve dimensions, including nutritional physiology. *Harmful Algae* 55, 25–30. doi:10.1016/j.hal.2016.01.008
- Goldman, J.C., Azov, Y., Riley, C.B., Dennett, M.R., 1982a. The effect of pH in intensive microalgal cultures. I. Biomass regulation. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 57, 1–13. doi:10.1016/0022-0981(82)90140-X
- Goldman, J.C., Riley, C.B., Dennett, M.R., 1982b. The effect of pH in intensive microalgal cultures. II. Species competition. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 57, 15–24.
- Gouveia, L., 2015. From tiny microalgae to huge biorefineries, in: *New Microbial Technologies for Advanced Biofuels: Toward More Sustainable Production Methods.*

Apple Academic Press, pp. 55–76.

- Granum, E. and S.M.M., 2002. A photobioreactor with pH control: demonstration by growth of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *J. Plankton Res.* 24, 557–563. doi:10.1093/plankt/24.6.557
- Grobbelaar, J.U., Kurano, N., 2003. Use of photoacclimation in the design of a novel photobioreactor to achieve high yields in algal mass cultivation. *J. Appl. Phycol.* 15, 121–126. doi:10.1023/A:1023802820093
- Gross, M.A., 2013. Development and optimization of algal cultivation systems. Iowa State University.
- Guedes, A.C., Meireles, L.A., Amaro, H.M., Malcata, F.X., 2010. Changes in Lipid Class and Fatty Acid Composition of Cultures of *Pavlova lutheri*, in Response to Light Intensity. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 791–801. doi:10.1007/s11746-010-1559-0
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239. doi:10.1139/m62-029
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2017. AlgaeBase. World-wide Electron. Publ. Natl. Univ. Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; Consult. 4 Ottobre 2017.
- Gupta, V.K., Carrott, P.J.M., Ribeiro Carrott, M.M.L., Suhas, 2009. Low-Cost Adsorbents: Growing Approach to Wastewater Treatment—a Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 39, 783–842. doi:10.1080/10643380801977610
- Guschina, I.A., Harwood, J.L., 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* doi:10.1016/j.plipres.2006.01.001
- Hallmann, A., 2015. Algae Biotechnology - Green Cell-Factories on the Rise. *Curr. Biotechnol.* 5, 1. doi:10.2174/2211550105666151107001338
- 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. *Metab. Eng.* 22, 3–9. doi:10.1016/j.ymben.2013.12.003
- Hamilton, M.L., Powers, S., Napier, J.A., Sayanova, O., 2016. Heterotrophic production of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids by trophically converted marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Drugs* 14, 53.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. a. T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(1), 1–9. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.025
- Hempel, N., Petrick, I., Behrendt, F., 2012. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.* 24, 1407–1418. doi:10.1007/s10811-012-9795-3
- Ho, S.H., Chen, C.Y., Lee, D.J., Chang, J.S., 2011. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems - A review. *Biotechnol. Adv.* 29, 189–198. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.11.001
- Hong, S.G., Song, M., Kim, S., Bang, D., Kang, T., Choi, I., Lee, L.P., 2016. Integrated Microalgae Analysis Photobioreactor for Rapid Strain Selection. *ACS Nano* 10, 5635–

5642. doi:10.1021/acsnano.6b00803

- Hu, Q., 2013. Environmental Effects on Cell Composition, in: Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. pp. 114–122.
doi:10.1002/9781118567166.ch7
- Hultberg, M., Lind, O., Birgersson, G., Asp, H., 2017. Use of the effluent from biogas production for cultivation of *Spirulina*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40, 625–631.
doi:10.1007/s00449-016-1726-2
- Jensen, G.S., Ginsberg, D.I., Drapeau, M.S., 2001. Blue-Green Algae as an Immuno-Enhancer and Biomodulator. *J. Am. Nutraceut. Assoc.* 3, 24–30.
- Jeon, Y.C., Cho, C.W., Yun, Y.S., 2005. Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. *Biochem. Eng. J.* 27, 127–131.
doi:10.1016/j.bej.2005.08.017
- Jiang, H.M., Gao, K.S., 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. doi:10.1111/j.1529-8817.2004.03112.x
- Jiang, L., Luo, S., Fan, X., Yang, Z., Guo, R., 2011. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. *Appl. Energy* 88, 3336–3341. doi:10.1016/j.apenergy.2011.03.043
- John, R.P., Anisha, G.S., Nampootheri, K.M., Pandey, A., 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.* 102, 186–193.
doi:10.1016/j.biortech.2010.06.139
- Juneja, A., Ceballos, R.M., Murthy, G.S., 2013. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. *Energies*. doi:10.3390/en6094607
- Kao, C.Y., Chen, T.Y., Chang, Y. Bin, Chiu, T.W., Lin, H.Y., Chen, C. Da, Chang, J.S., Lin, C.S., 2014. Utilization of carbon dioxide in industrial flue gases for the cultivation of microalga *Chlorella* sp. *Bioresour. Technol.* 166, 485–493.
doi:10.1016/j.biortech.2014.05.094
- Kautsky, H., Hirsch, A., 1931. Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Naturwissenschaften* 19, 964. doi:10.1007/BF01516164
- Khoo, C.G., Lam, M.K., Lee, K.T., 2016. Pilot-scale semi-continuous cultivation of microalgae *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactor (BC-PBR): Hydrodynamics and gas-liquid mass transfer study. *Algal Res.* 15, 65–76.
doi:10.1016/j.algal.2016.02.001
- Kim, S.-K., 2015. Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances, Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances. doi:10.1016/C2013-0-19117-9
- Kooistra, W.H.C.F., Gersonde, R., Medlin, L.K., Mann, D.G., 2007. The Origin and Evolution of the Diatoms. Their Adaptation to a Planktonic Existence., in: Evolution of Primary Producers in the Sea. pp. 207–249. doi:10.1016/B978-012370518-1/50012-6
- Krause, G.H., Weis, E., 1991. Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics.

- Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 313–349.
doi:10.1146/annurev.pp.42.060191.001525
- Kumar, A., Ergas, S., Yuan, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., Malcata, F.X., van Langenhove, H., 2010. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: Recent developments and future directions. *Trends Biotechnol.* 28, 371–380.
doi:10.1016/j.tibtech.2010.04.004
- Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J.-P., Bernard, O., 2009. Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6475–6481.
doi:10.1021/es900705j
- Lee, J.W., 2012. Advanced biofuels and bioproducts, *Advanced Biofuels and Bioproducts*.
doi:10.1007/978-1-4614-3348-4
- Lee, Y.K., Chen, W., Shen, H., Han, D., Li, Y., Jones, H.D.T., Timlin, J.A., Hu, Q., 2013. Basic Culturing and Analytical Measurement Techniques, in: *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. pp. 37–68.
doi:10.1002/9781118567166.ch3
- Lewin, J.C., 1958. The taxonomic position of *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Gen. Microbiol.* 18, 427–432. doi:10.1099/00221287-18-2-427
- Li, F., Beardall, J., Collins, S., Gao, K., 2017. Decreased photosynthesis and growth with reduced respiration in the model diatom *Phaeodactylum tricornutum* grown under elevated CO₂ over 1800 generations. *Glob. Chang. Biol.* 23, 127–137.
doi:10.1111/gcb.13501
- Li, W., Gao, K., Beardall, J., 2012. Interactive effects of ocean acidification and nitrogen-limitation on the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS One* 7, e51590.
doi:10.1371/journal.pone.0051590
- Lim, P.T., Leaw, C.P., Usup, G., Kobiyama, A., Koike, K., Ogata, T., 2006. Effects of light and temperature on growth, nitrate uptake, and toxin production of two tropical dinoflagellates: *Alexandrium tamiyavanichii* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 42, 786–799. doi:10.1111/j.1529-8817.2006.00249.x
- Liu, T., Wang, J., Hu, Q., Cheng, P., Ji, B., Liu, J., Chen, Y., Zhang, W., Chen, X., Chen, L., Gao, L., Ji, C., Wang, H., 2013. Attached cultivation technology of microalgae for efficient biomass feedstock production. *Bioresour. Technol.* 127, 216–222.
doi:10.1016/j.biortech.2012.09.100
- Liu, Z., Zhang, F., Chen, F., 2013. High throughput screening of CO₂-tolerating microalgae using GasPak bags. *Aquat. Biosyst.* 9, 23. doi:10.1186/2046-9063-9-23
- 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. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4
- Luo, X., Su, P., Zhang, W., 2015. Advances in microalgae-derived phytosterols for functional food and pharmaceutical applications. *Mar. Drugs* 13, 4231–4254.
doi:10.3390/md13074231
- Lynch, D. V., Thompson, G.A., 1982. Low Temperature-Induced Alterations in the Chloroplast and Microsomal Membranes of *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* 69, 1369–

1375. doi:10.1104/pp.69.6.1369

- Maity, J.P., Bundschuh, J., Chen, C.-Y., Bhattacharya, P., 2014. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives – A mini review. *Energy* 78, 104–113. doi:10.1016/j.energy.2014.04.003
- Mann, G., Schlegel, M., Schumann, R., Sakalauskas, A., 2009. Biogas-conditioning with microalgae. *Agron. Res.* 7, 33–38. doi:10.1038/jid.1938.36
- Marazzi, F., Sambusiti, C., Monlau, F., Cecere, S.E., Scaglione, D., Barakat, A., Mezzanotte, V., Ficara, E., 2017. A novel option for reducing the optical density of liquid digestate to achieve a more productive microalgal culturing. *Algal Res.* 24, 19–28.
- Marcilhac, C., Sialve, B., Pourcher, A.M., Ziebal, C., Bernet, N., Béline, F., 2014. Digestate color and light intensity affect nutrient removal and competition phenomena in a microalgal-bacterial ecosystem. *Water Res.* 64, 278–287. doi:10.1016/j.watres.2014.07.012
- Margalef, R., 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanol. Acta* 1, 493–509. doi:10.1007/BF00202661
- Massa, M., Buono, S., Langellotti, A.L., Castaldo, L., Martello, A., Paduano, A., Sacchi, R., Fogliano, V., 2017. Evaluation of anaerobic digestates from different feedstocks as growth media for *Tetradismus obliquus*, *Botryococcus braunii*, *Phaeodactylum tricorutum* and *Arthrospira maxima*. *N. Biotechnol.* 36, 8–16.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668. doi:10.1093/jxb/51.345.659
- Melis, A., Happe, T., 2001. Hydrogen Production . Green Algae as a Source of Energy. *Plant Physiol.* 127, 740–748. doi:10.1104/pp.010498.740
- Menzel, D.W., Corwin, N., 1965. The measurement of total phosphorus in seawater based on the liberation of organically bound fractions by persulfate oxidation. *Limnol. Oceanogr.* 10, 280–282.
- Michels, M.H.A., van der Goot, A.J., Vermuë, M.H., Wijffels, R.H., 2016. Cultivation of shear stress sensitive and tolerant microalgal species in a tubular photobioreactor equipped with a centrifugal pump. *J. Appl. Phycol.* 28, 53–62. doi:10.1007/s10811-015-0559-8
- Mirón, A.S., Gómez, A.C., Camacho, F.G., Grima, E.M., Chisti, Y., 1999. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Prog. Ind. Microbiol.* 35, 249–270. doi:10.1016/S0079-6352(99)80119-2
- Mohsenpour, S.F., Willoughby, N., 2016. Effect of CO₂ aeration on cultivation of microalgae in luminescent photobioreactors. *Biomass and Bioenergy* 85, 168–177. doi:10.1016/j.biombioe.2015.12.002
- Molina Grima, E., Belarbi, E.H., Acién Fernández, F.G., Robles Medina, A., Chisti, Y.,

2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnol. Adv.* 20, 491–515. doi:10.1016/S0734-9750(02)00050-2
- Molina Grima, E., Garcia Camacho, F., Acien Fernandez, F.G., 1999. Production of EPA from *Phaeodactylum tricornutum*, in: *Chemicals from Microalgae*. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 57–92.
- Monlau, F., Sambusiti, C., Ficara, E., Aboulkas, A., Barakat, A., Carrère, H., 2015. New opportunities for agricultural digestate valorization: current situation and perspectives. *Energy Environ. Sci.* 2600–2621. doi:10.1039/C5EE01633A
- Monti, M., Minocci, M., Beran, A., Iveša, L., 2007. First record of *Ostreopsis* cfr. *ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 598–601. doi:10.1016/j.marpolbul.2007.01.013
- Moustafa, A., Beszteri, B., Maier, U.G., Bowler, C., Valentin, K., Bhattacharya, D., 2009. Genomic Footprints of a Cryptic Plastid Endosymbiosis in Diatoms. *Science* (80-.). 324, 1724–1726. doi:10.1126/science.1172983
- Mus, F., Toussaint, J.-P., 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.* 97, 3625–42. doi:10.1007/s00253-013-4747-7
- Myklestad, S.M., Haug, A., Larsen, B., 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var *Willeri* (Gran) Hustedt. II. Preliminary investigation of the extracellular polysaccharide. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 9, 137–144.
- Narala, R.R., Garg, S., Sharma, K.K., Thomas-Hall, S.R., Deme, M., Li, Y., Schenk, P.M., 2016. Comparison of Microalgae Cultivation in Photobioreactor, Open Raceway Pond, and a Two-Stage Hybrid System. *Front. Energy Res.* 4, 29. doi:10.3389/fenrg.2016.00029
- Necas, J., Bartosikova, L., 2013. Carrageenan: A review. *Vet. Med. (Praha)*. 58, 187–205.
- Noll, F., Sumper, M., Hampp, N., 2002. Nanostructure of Diatom Silica Surfaces and of Biomimetic Analogues. *Nano Lett.* 2, 91–95. doi:10.1021/nl015581k
- Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., Grigoriev, I. V., Dubchak, I., 2014. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute - <https://genome.jgi.doe.gov/Phatr2/Phatr2.home.html> consultato il 06 Ottobre 2017. *Nucleic Acids Res.* 42. doi:10.1093/nar/gkt1069
- Norton, T.A., Melkonian, M., Andersen, R.A., Norton, T.A., Melkonian, M., 1996. Algal biodiversity. *Phycologia* 35, 308–326. doi:10.2216/i0031-8884-35-4-308.1
- Novoveská, L., Zapata, A.K.M., Zabolotney, J.B., Atwood, M.C., Sundstrom, E.R., 2016. Optimizing microalgae cultivation and wastewater treatment in large-scale offshore photobioreactors. *Algal Res.* 18, 86–94. doi:10.1016/j.algal.2016.05.033
- Olaizola, M., 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: From the test tube to the marketplace. *Biomol. Eng.* 20, 459–466. doi:10.1016/S1389-0344(03)00076-5
- Oncel, S.S., Kose, A., Vardar, F., Torzillo, G., 2015. Chapter 9 - From the Ancient Tribes to

Modern Societies, Microalgae Evolution from a Simple Food to an Alternative Fuel Source, in: Kim, S.-K. (Ed.), Handbook of Marine Microalgae. Academic Press, Boston, pp. 127–144. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00009-1>

- Ono, E., Cuello, J., 2003. Selection of optimal microalgae species for CO₂ sequestration. Natl. Conf. Carbon Sequestration. 1–7.
- Peng, J., Yuan, J.P., Wu, C.F., Wang, J.H., 2011. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health. Mar. Drugs 9, 1806–1828. doi:10.3390/md9101806
- Peršić, V., Horvatić, J., Has-Schön, E., Bogut, I., 2009. Changes in N and P limitation induced by water level fluctuations in Nature Park Kopački Rit (Croatia): Nutrient enrichment bioassay. Aquat. Ecol. 43, 27–36. doi:10.1007/s10452-007-9156-5
- Pires, J.C.M., 2015. Chapter 5 - Mass Production of Microalgae, in: Kim, S.-K. (Ed.), Handbook of Marine Microalgae. Academic Press, Boston, pp. 55–68. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00005-4>
- Pires, J.C.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Martins, F.G., Simões, M., 2012. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. Renew. Sustain. Energy Rev. doi:10.1016/j.rser.2012.02.055
- Prajapati, S.K., Kaushik, P., Malik, A., Vijay, V.K., 2013. Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges. Biotechnol. Adv. 31, 1408–1425. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.06.005
- Prestegard, S.K., Erga, S.R., Steinrücken, P., Mjøs, S.A., Knutsen, G., Rohloff, J., 2016. Specific metabolites in a *Phaeodactylum tricornutum* strain isolated from Western Norwegian fjord water. Mar. Drugs 14. doi:10.3390/md14010009
- Pudaruth, S., Juwaheer, T.D., Seewoo, Y.D., 2015. Gender-based differences in understanding the purchasing patterns of eco-friendly cosmetics and beauty care products in Mauritius: a study of female customers. Soc. Responsib. J. 11, 179–198. doi:10.1108/SRJ-04-2013-0049
- Pulz, O., 2001. Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. doi:10.1007/s002530100702
- Qiao, H., Cong, C., Sun, C., Li, B., Wang, J., Zhang, L., 2016. Effect of culture conditions on growth, fatty acid composition and DHA/EPA ratio of *Phaeodactylum tricornutum*. Aquaculture 452, 311–317. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.11.011
- Qiao H; Wang, J.Z.L.S.C.M.J.S.Z.L.B., 2015. An improved direct transesterification method for fatty acid determination of *Phaeodactylum tricornutum*. J. Appl. Phycol. 27, 697–701. doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s10811-014-0376-5>
- Radakovits, R., Eduafo, P.M., Posewitz, M.C., 2011. Genetic engineering of fatty acid chain length in *Phaeodactylum tricornutum*. Metab. Eng. 13, 89–95. doi:10.1016/j.ymben.2010.10.003
- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A., Posewitz, M.C., 2010. Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. Eukaryot. Cell 9, 486–501. doi:10.1128/EC.00364-09

- Ramachandra, T. V., Mahapatra, D.M., Karthick, B., Gordon, R., 2009. Milking diatoms for sustainable energy: Biochemical engineering versus gasoline-secreting diatom solar panels. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48, 8769–8788. doi:10.1021/ie900044j
- Rausch, T., 1981. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia* 78, 237–251. doi:10.1007/BF00008520
- Razzak, S.A., Hossain, M.M., Lucky, R.A., Bassi, A.S., de Lasa, H., 2013. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 27, 622–653. doi:https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.063
- Reboloso-Fuentes, M.M., Navarro-pÉrez, A., Ramos-miras, J.J., Guil-guerrero, J.L., 2001. Biomass nutrient profiles of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Food Biochem.* 25, 57–76. doi:10.1111/j.1745-4514.2001.tb00724.x
- Recht, L., Zarka, A., Boussiba, S., 2012. Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1495–1503. doi:10.1007/s00253-012-3940-4
- Renaud, S.M., Parry, D.L., 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *J. Appl. Phycol.* 6, 347–356. doi:10.1007/BF02181949
- Renaud, S.M., Thinh, L. V., Lambrinidis, G., Parry, D.L., 2002. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211, 195–214. doi:10.1016/S0044-8486(01)00875-4
- Richmond, A., 2008. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.* John Wiley & Sons.
- Richmond, A., Karg, S., Boussiba, S., 1982. Effects of Bicarbonate and Carbon Dioxide on the Competition between *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* 23, 1411–1417. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076489
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 100–112.
- Ryckebosch, E., Drouillon, M., Vervaeren, H., 2011. Techniques for transformation of biogas to biomethane. *Biomass and Bioenergy.* doi:10.1016/j.biombioe.2011.02.033
- Safafar, H., Wagenen, J. Van, Møller, P., Jacobsen, C., 2015. Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Mar. Drugs* 13, 7339–7356. doi:10.3390/md13127069
- Salam, K.A., Velasquez-Orta, S.B., Harvey, A.P., 2016. A sustainable integrated in situ transesterification of microalgae for biodiesel production and associated co-products — A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 65, 1179–1198. doi:10.1016/j.rser.2016.07.068
- Salim, S., Bosma, R., Vermuë, M.H., Wijffels, R.H., 2011. Harvesting of microalgae by bio-

- flocculation. *J. Appl. Phycol.* 23, 849–855. doi:10.1007/s10811-010-9591-x
- Sánchez Mirón, A., Cerón García, M.C., Contreras Gómez, A., García Camacho, F., Molina Grima, E., Chisti, Y., 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochem. Eng. J.* 16, 287–297. doi:10.1016/S1369-703X(03)00072-X
- Santos-Sánchez, N.F., Valadez-Blanco, R., Hernández-Carlos, B., Torres-Ariño, A., Guadarrama-Mendoza, P.C., Salas-Coronado, R., 2016. Lipids rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids from microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 8667–8684. doi:10.1007/s00253-016-7818-8
- Sato, N., Hagio, M., Wada, H., Tsuzuki, M., 2000. Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranes. *Biochem. Soc. Trans.* 28, 912–914. doi:10.1042/BST0280912
- Sayre, R., 2010. Microalgae: The Potential for Carbon Capture. *Bioscience* 60, 722–727. doi:10.1525/bio.2010.60.9.9
- Schlesinger, W.H., 1997. *Biogeochemistry: An analysis of global change.*, 2nd ed, Academic Press: San Diego, CA, USA. San Diego.
- Schreiber, C., Behrendt, D., Huber, G., Pfaff, C., Widzowski, J., Ackermann, B., Müller, A., Zachleder, V., Moudříková, Š., Mojzeš, P., Schurr, U., Grobbelaar, J., Nedbal, L., 2017. Growth of algal biomass in laboratory and in large-scale algal photobioreactors in the temperate climate of western Germany. *Bioresour. Technol.* 234, 140–149. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.028
- Schreiber, U., 2004. Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Methode: An Overview, in: *Chlorophyll a Fluorescence*. pp. 279–319. doi:10.1007/978-1-4020-3218-9
- Schulze, P.S.C., Barreira, L.A., Pereira, H.G.C., Perales, J.A., Varela, J.C.S., 2014. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends Biotechnol.* 32, 422–430.
- Searchinger, T., Heimlich, R., Houghton, R.A., Dong, F., Elobeid, A., Fabiosa, J., Tokgoz, S., Hayes, D., Yu, T.-H., 2008. Use of U.S. Croplands for Biofuels Increases Greenhouse Gases Through Emissions from Land-Use Change. *Science* (80-.). 319, 1238–1240. doi:10.1126/science.1151861
- Serrano, R., Mulet, J.M., Rios, G., Marquez, J. a, de Larrinoa, I.F., Leube, M.P., Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, a, Proft, M., Ros, R., Montesinos, C., 1999. A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Bot.* 50, 1023–1036. doi:10.1093/jxb/50.Special_Issue.1023
- Sforza, E., Barbera, E., Giroto, F., Cossu, R., Bertucco, A., 2017. Anaerobic digestion of lipid-extracted microalgae: Enhancing nutrient recovery towards a closed loop recycling. *Biochem. Eng. J.* 121, 139–146.
- Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z.J., Wu, Q., Mao, E., 2009. Microalgae mass production methods. *Trans. ASABE* 52, 1275–1287. doi:10.1023/A:1012663213153
- Shono, M., Hara, Y., Wada, M., Fujii, T., 1996. A sodium pump in the plasma membrane of the marine alga *Heterosigma akashiwo*. *Plant Cell Physiol.* 37, 385–388. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a028957

- Singh, J., Saxena, R.C., 2015. Chapter 2 - An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance, in: Kim, S.-K. (Ed.), Handbook of Marine Microalgae. Academic Press, Boston, pp. 11–24. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00002-9>
- Singh, S.P., Singh, P., 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 50, 431–444. doi:[10.1016/j.rser.2015.05.024](https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024)
- Siron, R., Giusti, G., Berland, B., 1989. Changes in the fatty acid composition of *Phaeodactylum tricornutum* and *Dunaliella tertiolecta* during growth and under phosphorus deficiency. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 55, 95–100. doi:[10.3354/meps055095](https://doi.org/10.3354/meps055095)
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96. doi:[10.1263/jbb.101.87](https://doi.org/10.1263/jbb.101.87)
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis.
- Strizh, I.G., Popova, L.G., Balnokin, Y. V., 2004. Physiological aspects of adaptation of the marine microalga *Tetraselmis (Platymonas) viridis* to various medium salinity. *Russ. J. Plant Physiol.* 51, 176–182. doi:[10.1023/B:RUPP.0000019210.59579.6b](https://doi.org/10.1023/B:RUPP.0000019210.59579.6b)
- Tesson, B., Gaillard, C., Martin-J??z??quel, V., 2009. Insights into the polymorphism of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Bot. Mar.* 52, 104–116. doi:[10.1515/BOT.2009.012](https://doi.org/10.1515/BOT.2009.012)
- Thompson, G.A., 1996. Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* doi:[10.1016/0005-2760\(96\)00045-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(96)00045-8)
- Thompson, P.A., Guo, M., Harrison, P.J., 1992. Effects of Variation in Temperature. I. on the Biochemical Composition of Eight Species of Marine Phytoplankton. *J. Phycol.* 28, 481–488.
- Torzillo, G., Faraloni, C., Silva, A.M., Kopecký, J., Pilný, J., Masojídek, J., 2012. Photoacclimation of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in photobioreactors and open ponds. *Eur. J. Phycol.* 47, 169–181.
- Touloupakis, E., Cicchi, B., Benavides, A.M.S., Torzillo, G., 2016. Effect of high pH on growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae (*Poterioochromonas* sp.). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1333–1341. doi:[10.1007/s00253-015-7024-0](https://doi.org/10.1007/s00253-015-7024-0)
- Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D.P., Kaul, S., Garg, M.O., 2015. Algae based biorefinery— How to make sense? *Renew. Sustain. Energy Rev.* 47, 295–307. doi:[10.1016/j.rser.2015.03.052](https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.052)
- Uggetti, E., Sialve, B., Trably, E., Steyer, J.P., 2014. Integrating microalgae production with anaerobic digestion: A biorefinery approach. *Biofuels, Bioprod. Biorefining.* doi:[10.1002/bbb.1469](https://doi.org/10.1002/bbb.1469)
- Van Wagenen, J., Miller, T.W., Hobbs, S., Hook, P., Crowe, B., Huesemann, M., 2012. Effects of light and temperature on fatty acid production in *Nannochloropsis salina*. *Energies* 5, 731–740. doi:[10.3390/en5030731](https://doi.org/10.3390/en5030731)
- Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H.M., 2013. Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresour. Technol.* 135, 142–149. doi:[10.1016/j.biortech.2012.10.135](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.135)

- Vasseur, C., Bougaran, G., Garnier, M., Hamelin, J., Leboulanger, C., Chevanton, M. Le, Mostajir, B., Sialve, B., Steyer, J.P., Fouilland, E., 2012. Carbon conversion efficiency and population dynamics of a marine algae-bacteria consortium growing on simplified synthetic digestate: First step in a bioprocess coupling algal production and anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 119, 79–87. doi:10.1016/j.biortech.2012.05.128
- Venkatesan, J., Lowe, B., Kim, S.-K., 2015a. Chapter 15 - Application of Diatom Biosilica in Drug Delivery, in: Kim, S.-K. (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae*. Academic Press, Boston, pp. 245–254. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00015-7
- Venkatesan, J., Manivasagan, P., Kim, S.-K., 2015b. Chapter 1 - Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances, in: Kim, S.-K. (Ed.), *Handbook of Marine Microalgae*. Academic Press, Boston, pp. 1–9. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00001-7
- Vergara-Fernández, A., Vargas, G., Alarcón, N., Velasco, A., 2008. Evaluation of marine algae as a source of biogas in a two-stage anaerobic reactor system. *Biomass and Bioenergy* 32, 338–344. doi:10.1016/j.biombioe.2007.10.005
- Veronesi, D., Idà, A., Imporzano, G.D., Adani, F., 2015. Microalgae Cultivation : Nutrient Recovery from Digestate for Producing Algae Biomass. *Chem. Eng. Trans.* 43, 1201–1206. doi:10.3303/CET1543201
- Veronesi, D., D'Imporzano, G., Salati, S., Adani, F., 2017. Pre-treated digestate as culture media for producing algal biomass. *Ecol. Eng.* 105, 335–340. doi:10.1016/j.ecoleng.2017.05.007
- Viličić, D., Marasović, I., Mioković, D., 2002. Checklist of phytoplankton in the eastern Adriatic Sea. *Acta Bot. Croat.* 61, 57–91.
- Vinayak, V., Gordon, R., Gautam, S., Rai, A., 2014. Discovery of a diatom that oozes oil. *Adv. Sci. Lett.* 20, 1256–1267.
- Vinayak, V., Manoylov, K.M., Gateau, H., Blanckaert, V., Hérault, J., Pencreac'h, G., Marchand, J., Gordon, R., Schoefs, B., 2015. Diatom milking: A review and new approaches. *Mar. Drugs* 13, 2629–2665. doi:10.3390/md13052629
- Wang, B., Li, Y., Wu, N., Lan, C.Q., 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 707–718. doi:10.1007/s00253-008-1518-y
- Wang, H.M.D., Chen, C.C., Huynh, P., Chang, J.S., 2015. Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresour. Technol.* doi:10.1016/j.biortech.2014.12.001
- Wang, L., Li, Y., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2013. A flexible culture process for production of the green microalga *Scenedesmus dimorphus* rich in protein, carbohydrate or lipid. *Bioresour. Technol.* 129, 289–295. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.062
- Wen, X., Du, K., Wang, Z., Peng, X., Luo, L., Tao, H., Xu, Y., Zhang, D., Geng, Y., Li, Y., 2016. Effective cultivation of microalgae for biofuel production: a pilot-scale evaluation of a novel oleaginous microalga *Graesiella* sp. WBG-1. *Biotechnol. Biofuels* 9, 123. doi:10.1186/s13068-016-0541-y
- Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2010. An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science* (80-.). 329, 796–799. doi:10.1126/science.1189003

- Willis, A., Chiovitti, A., Dugdale, T.M., Wetherbee, R., 2013. Characterization of the extracellular matrix of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae): Structure, composition, and adhesive characteristics. *J. Phycol.* 49, 937–949. doi:10.1111/jpy.12103
- Wolf, J., Ross, I.L., Radzun, K.A., Jakob, G., Stephens, E., Hankamer, B., 2015. High-throughput screen for high performance microalgae strain selection and integrated media design. *Algal Res.* 11, 313–325. doi:10.1016/j.algal.2015.07.005
- Wong, J.T.Y., Kwok, A.C.M., 2005. Proliferation of dinoflagellates: Blooming or bleaching. *BioEssays* 27, 730–740. doi:10.1002/bies.20250
- Wu, Y., Gao, K., Riebesell, U., 2010. CO₂-induced seawater acidification affects physiological performance of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biogeosciences* 7, 2915–2923. doi:10.5194/bg-7-2915-2010
- Xia, A., Murphy, J.D., 2016. Microalgal Cultivation in Treating Liquid Digestate from Biogas Systems. *Trends Biotechnol.* 34, 264–275. doi:10.1016/j.tibtech.2015.12.010
- Xin, L., Hong-ying, H., Yu-ping, Z., 2011. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresour. Technol.* 102, 3098–3102. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.055
- Xu, X., Liu, J., Shi, Q., Mei, H., Zhao, Y., Wu, H., 2016. Ocean warming alters photosynthetic responses of diatom *Phaeodactylum tricornutum* to fluctuating irradiance. *Phycologia* 55, 126–133. doi:10.2216/15-64.1
- Yang, J., Xu, M., Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M., Chen, Y., 2011. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Bioresour. Technol.* 102, 159–165. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.017
- Yeesang, C., Cheirsilp, B., 2011. Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresour. Technol.* 102, 3034–3040.
- Yen, H.-W., Ho, S.-H., Chen, C.-Y., Chang, J.-S., 2015. CO₂, NO_x and SO_x removal from flue gas via microalgae cultivation: A critical review. *Biotechnol. J.* n/a-n/a. doi:10.1002/biot.201400707
- Yen, H.-W., Hu, I.C., Chen, C.-Y., Chang, J.-S., 2014. Design of Photobioreactors for Algal Cultivation, in: *Biofuels from Algae*. pp. 23–45. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00002-4
- Yen, H.W., Hu, I.C., Chen, C.Y., Ho, S.H., Lee, D.J., Chang, J.S., 2013. Microalgae-based biorefinery - From biofuels to natural products. *Bioresour. Technol.* 135, 166–174. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.099
- Yu, Z., Song, M., Pei, H., Han, F., Jiang, L., Hou, Q., 2017. The growth characteristics and biodiesel production of ten algae strains cultivated in anaerobically digested effluent from kitchen waste. *Algal Res.* 24, 265–275. doi:10.1016/j.algal.2017.04.010
- Yusuf, C., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Zhang, F., Cheng, L., Xu, X., Zhang, L., Chen, H., 2012. Technologies of microalgal

harvesting and lipid extraction. *Prog. Chem.* 24, 2062–2072.

Zhang, F., Cheng, L.H., Xu, X.H., Zhang, L., Chen, H.L., 2013. Application of membrane dispersion for enhanced lipid milking from *Botryococcus braunii* FACHB 357. *J. Biotechnol.* 165, 22–29. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.02.010

Zhang, T.Y., Hu, H.Y., Wu, Y.H., Zhuang, L.L., Xu, X.Q., Wang, X.X., Dao, G.H., 2016. Promising solutions to solve the bottlenecks in the large-scale cultivation of microalgae for biomass/bioenergy production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 60, 1602–1614. doi:10.1016/j.rser.2016.02.008

Zhila, N.O., Kalacheva, G.S., Volova, T.G., 2011. Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *J. Appl. Phycol.* 23, 47–52. doi:10.1007/s10811-010-9532-8

Zhu, L.D., Hiltunen, E., 2016. Application of livestock waste compost to cultivate microalgae for bioproducts production: A feasible framework. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 54, 1285–1290. doi:10.1016/j.rser.2015.10.093

Zimmerman, W.B., Tesař, V., Bandulasena, H.C.H., 2011. Towards energy efficient nanobubble generation with fluidic oscillation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 16, 350–356. doi:10.1016/j.cocis.2011.01.010

Zuliani, L., Frison, N., Jelic, A., Fatone, F., Bolzonella, D., Ballottari, M., 2016. Microalgae cultivation on anaerobic digestate of municipal wastewater, sewage sludge and agro-waste. *Int. J. Mol. Sci.* 17. doi:10.3390/ijms17101692