

Università
Ca' Foscari
Venezia

Pietro Labruzzo

XXV Ciclo

a.s. 2013-2014



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

***Influenza delle Onde Acustiche sulla
crescita delle microalghe***

Scenedesmus obliquus

Prof. Emanuele Argese

Co-tutor Paolo Blasi

Immagine di Copertina:
Yeast cells respond to sound
di **Andrew Dopheide**

<http://andrewdopheide.wordpress.com/science/#jp-carousel-716>

This image illustrates recent research at the Centre for Microbial Innovation (at the University of Auckland), which demonstrated that – somewhat surprisingly – sound has a significant effect upon the growth and metabolism of yeast cells. The image is a composite of electron microscope imagery and 3-d models.

The research is published here an citation in this Thesis: Aggio, R.B.M; Obolonkin, V. and Villas-Boas, S.G. Sonic vibration affects the metabolism of yeast cells growing in liquid culture: a metabolomic study. Metabolomics, 2011.



Università
Ca' Foscari
Venezia

Dottorato di ricerca in Scienze Ambientali
Scuola di dottorato in Scienze e Tecnologie
Ciclo XXV
(A.A. 2012 - 2013)

*Influenza delle Onde Acustiche sulla crescita delle
microalghe (sp. Scenedesmus obliquus)*

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE DI AFFERENZA:
BIO/07

Tesi di dottorato di Pietro Labruzzo, matricola 955757

Coordinatore del Dottorato

Prof. Gabriele Capodaglio

Tutore del dottorando

Prof. Emanuele Argese

Co-tutore del dottorando

Dott. Paolo Blasi

Tanti sono stati nella mia vita i momenti importanti e belle emozioni vissute ma, in particolare, due grandi traguardi lasceranno per sempre il loro segno:

la laurea Magistrale in Economia il 13 Dicembre 2006 e il Dottorato di Ricerca.

Con grande dedizione e impegno nella vita e si conquistano obiettivi tanto lontani che certamente possono cambiarti la vita ma, queste scelte importanti, inesorabilmente coinvolgono anche la tua famiglia.

Dedico questo articolato e complesso lavoro di ricerca alle tre persone più importanti della mia vita: mia Moglie e i miei figli Giorgio e Alice.

Tutto sembra sempre impossibile finché non viene fatto.

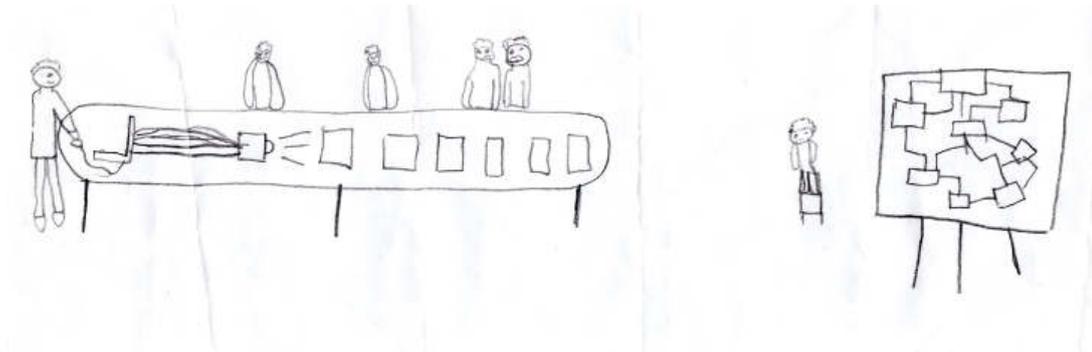
Nelson Mandela

Anche loro, con tanta semplicità hanno ricordato i traguardi più importanti del loro papà così.

Giorgio, undici anni

durante la discussione di Laurea

a Terni, il 13 dicembre 2006



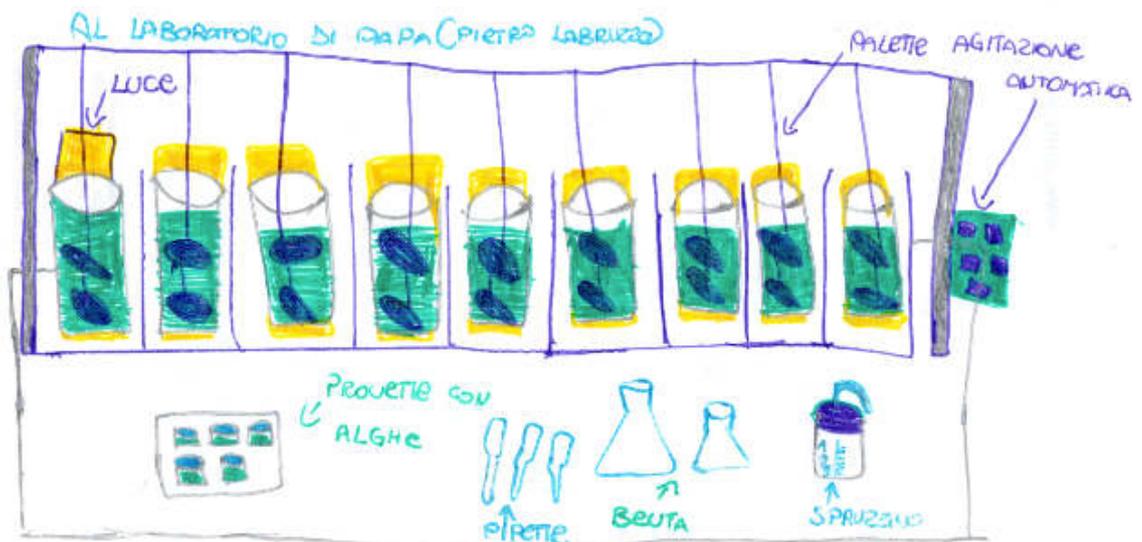
Alice, undici anni

durante la redazione della tesi di dottorato,

il giorno del suo compleanno

ricordando la visita al laboratorio del suo papà.

Mazara del Vallo, 24 dicembre 2013



Sommario

Presentazione sintetica e articolazione in fasi dell'attività svolta durante il periodo di dottorato inerente il progetto di ricerca	15
Capitolo 1.....	21
Introduzione.....	21
1.1 Il Protocollo di Kyoto, i crediti di emissione e il mercato della CO ₂	22
1.2 Come trasformare un costo di un intangibile asset (energia dissipata, crediti di emissione) in una grande opportunità.....	24
1.3 Le microalghe e i fotobioreattori quale modulo innovativo di conversione energetica per una cementeria.	26
1.4 La scelta della microalga <i>Scenedesmus obliquus</i> come organismo modello per lo studio degli effetti delle stimolazioni acustiche sulle cinetiche di crescita.....	28
1.5 Il cuore del progetto: la stimolazione acustica di bassa frequenza ed intensità.....	29
Capitolo 2.....	37
Le microalghe, sp. <i>Scenedesmus obliquus</i>	37
2.1 La conversione dell'energia fotochimica: la fotosintesi, i cloroplasti e i nutrienti	38
2.2.1 La morfologia.....	41
2.2.2 Caratteristiche reologiche della <i>Scenedesmus obliquus</i>	45
2.2.3 Le caratteristiche idrodinamiche della <i>Scenedesmus obliquus</i>	46
2.3 Sedimentazione e turbolenza nella colonna d'acqua	47
2.3.1 Scattering e ombreggiamento delle cellule.....	48
2.3.2 Degasamento dell'ossigeno e fenomeni di adesione cellulare alle superfici con la formazione di colonie e biofilm cellulari.....	49
2.3.3 Stress meccanico tollerato dalle alghe e sistemi di agitazione.....	50
2.4 La meccanotrasduzione sulle cellule microalgali.....	51
2.5 Le caratteristiche spettrali della luce.....	51

2.6 Il Suono e le Onde acustiche	53
2.6.2 Le grandezze fisiche del suono.....	55
2.6.3 Le misure del suono	57
2.6.4 L'idrofono.....	58
2.6.5 L'attuatore acustico	58
2.7 La velocità del suono nei diversi mezzi.....	58
2.7.1 le Onde acustiche in acqua.....	59
2.7.2 Intensità e densità di energia.....	60
2.7.3 Trasmissione del suono nei tubi.....	60
2.7.4 Cinematica e particle motions.....	61
2.7.5 Attenuazione del suono nei liquidi	62
2.7.6 Propagazione del suono nelle colture microalgali	63
Capitolo 3.....	65
Materiali e Metodi.....	65
3.1 Disegno Sperimentale per la preparazione dei terreni di coltura, le colture di mantenimento e gli inoculi starter	65
3.1.1 Preparazione del terreno di coltura BG11 modificato e sua sterilizzazione.....	65
3.1.2 Preparazione degli inoculi starter e delle colture di mantenimento.....	67
3.1.3 Inoculo microalgale nei fbr per l'avvio delle attività sperimentali	68
3.1.4 I prelievi di campioni di microalghe per le analisi di laboratorio	69
3.1.5 La conservazione dei campioni in frigo a 4°C	70
3.2 Il monitoraggio chimico fisico delle colture microalgali.....	70
3.2.1 Il monitoraggio chimico fisico con la sonda multiparametrica e le misure del pH	70
3.2.2 Il monitoraggio delle temperature di funzionamento dei fbr e le prove di evoluzione dell'ossigeno.....	71
3.3 Curve di crescita.....	72
3.3.1 Densità ottica	72
3.3.2 Le misure di assorbanza con la sonda Li-Cor	73

3.3.3 Peso secco.....	76
3.3.3 Conta Cellulare.....	77
3.3.3.1 Analisi in camera di Burkner.....	78
3.3.3.2 Analisi al Granulometro Laser 780/AD Autodiluter	79
3.3.3.3 Analisi con lo Scepter Coulter Counter della Millipore.....	81
3.3.4 La retta di taratura dei metodi di analisi impiegati.....	83
3.3.5 Misure di correlazione tra lo Scepter e il Granulometro laser	85
3.4 Le analisi fluorimetriche e di microscopia ottica ed elettronica.....	89
3.4.1 Lo Spettrofluorimetro.....	89
3.4.2 Il fluorimetro portatile AquaPen AP 100 (Photon System Instruments)	91
3.4.3 Le analisi all’Infrarosso Fourier Transform Infrared (FTIR)	92
3.4.4 Le analisi di Microscopia ottica a fluorescenza	97
3.4.5 Le analisi al Microscopio elettronico TEM	99
3.5 Il sistema d’illuminazione artificiale e il fotoperiodo e le analisi di termografia	99
3.5.2 Il fotoperiodo	103
3.5.3 Misure con termocamera per la verifica del calore dissipato dalle lampade al neon	104
3.6 Il sistema di agitazione delle colture con astina e bolla d’aria microfiltrata.	106
3.7 Realizzazione del sistema di riproduzione dei segnali e di conversione analogico-digitale	107
3.7.1 Software Nuendo – scheda audio Presonus e Amplificatori a canale separato	107
3.7.2 L’attuatore acustico Ottone	108
3.7.3 Il sistema di registrazione audio con il microfono e con l’drofono.....	109
3.8 La costruzione dei fbr, e le analisi dei materiali.....	110
3.8.1 Le misure spettrofotometriche del fotobioreattore di vetro	110
3.8.2 Le analisi Laser Doppler Vibrometer LDV.....	114
3.8.3 La costruzione delle basi di appoggio per i fbr e smorzamento delle vibrazioni .	118
Capitolo 4.....	119

Risultati e Discussione	119
Prima Sessione	120
4.1 Studio e prove sui materiali da costruzione per la realizzazione di un banco sperimentale per lo studio della crescita microalgale in funzione delle stimolazioni acustiche.....	120
4.1.1 Analisi del fbr con la tecnica Laser Doppler Vibrometer (LDV)	121
4.1.2 Le Analisi Laser Doppler Vibrometer sull'attuatore acustico Ottone.....	132
4.1.3 Ottimizzazione della trasmissione del suono nel sistema accoppiato trasduttore fotobioreattore.....	135
4.1.4 Le misure spettrofotometriche sulla riflessione del vetro	136
4.1.5 Realizzazione del banco sperimentale e sua validazione.	140
4.1.5.1 Prove d'interferenza dei suoni tra fbr	143
Seconda Sessione	146
4.2 Esperimento Pilota - Attività sperimentali di accrescimento delle colture microalgali di <i>Scenedesmus obliquus</i> con le stimolazioni acustiche di bassa frequenza e intensità.....	146
4.2.1 Il disegno sperimentale (fotoperiodo, suoni e sistema di agitazione delle colture)	146
4.2.2 Il rate di crescita osservato	150
4.2.3 La conta cellulare con lo Scepter contacellule automatico.....	151
4.2.3.1 La distribuzione dimensionale delle cellule nei diversi programmi di stimolazione acustica.....	153
4.2.4 I parametri chimico fisici e le misure spettrofotometriche.....	158
4.2.5 Le misure di bioacustica e le registrazioni dei segnali in acqua	161
Terza Sessione	165
4.4 Realizzazione del sistema di agitazione sincrono, seriale e automatizzato delle colture nei 12 fbr.....	165
4.4.1 Analisi con il blue di metilene per la validazione del dispositivo di agitazione.....	168
4.4.2 Automazione del dispositivo e studio del protocollo sperimentale.....	170
4.4.3 Misure Spettroradiometriche di verifica della sedimentazione delle colture nei fbr e validazione dei timesheet di pausa lavoro dell'agitazione	172

Quarta Sessione	176
4.5 Disegno fattoriale e ottimizzazione dei parametri di crescita	176
4.5.1 Descrizione del setup sperimentale	177
4.5.1 Risultati ottenuti dalle sperimentazioni del Doe. Le superfici di risposta tridimensionali.	180
4.5.2 Individuazione e ottimizzazione dei parametri acustici più efficienti per la crescita delle microalghe. L'aumento % del rate di crescita ottenuto	184
4.5.2.1 La conta cellulare nei due esperimenti del Doe con lo Scepter contacellule automatico.....	185
4.5.2.2 Le misure del peso secco.....	188
4.5.3 Risultati ottenuti dall'impiego di metodologie innovative di analisi e monitoraggio delle colture.	193
4.5.4 Il monitoraggio Li-Cor nelle due repliche sperimentali del Doe	194
4.5.5 Le registrazioni acustiche e i risultati ottenuti.....	206
4.6 Le Analisi al microscopio elettronico TEM	213
4.7 Analisi di Microscopia in fluorescenza	217
Capitolo 5.....	221
Gli effetti della meccanotrasduzione sulle cellule di <i>Scenedesmus obliquus</i>	221
I fase: approfondimento bibliografico	225
5.1.1 L'attivazione dei Canali ionici.....	225
5.1.2 Il metabolismo cellulare e l'espressione genica	226
II fase: le metodologie di analisi impiegate.....	228
5.2 Le tecniche fluorimetriche di analisi impiegate per indagare gli effetti della meccanotrasduzione sulle cellule di <i>Scenedesmus obliquus</i>	228
5.3 Risultati complessivi delle analisi allo Spettrofluorimetro	229
5.3.1 Misure allo Spettrofluorimetro dei campioni del primo esperimento del Doe.....	231
5.3.2 Misure allo Spettrofluorimetro dei campioni del secondo esperimento del Doe	237
5.4 Le analisi con il fluorimetro portatile AquaPen AP 100 (Photon System Instruments)	242

5.4.1 Le curve di induzione della fluorescenza delle clorofille con l'OJIP test AquaPen delle microalghe <i>S. obliquus</i> dopo due giorni dall'inizio del secondo esperimento del Doe.....	246
5.4.2 I dati di induzione della fluorescenza delle clorofille con l'OJIP test AquaPen delle microalghe <i>S. obliquus</i> dopo tre, cinque e otto giorni dall'inizio del secondo esperimento del Doe.....	250
5.4.3 Le curve di induzione della fluorescenza delle clorofille con l'OJIP test AquaPen delle microalghe <i>S. obliquus</i> dopo dieci giorni dall'inizio del secondo esperimento del Doe.....	256
5.4.4 Misure di NPQ - Non-Photochemical Quenching.....	265
5.5 Le tecniche di analisi all'Infrarosso FTIR.....	271
5.5.1 Analisi dei campioni con la Spettroscopia FTIR. Spettri più rappresentativi relativi alle stimolazioni acustiche nei due esperimenti del Doe.....	271
5.5.2 In dettaglio la regione dello spettro: carboidrati e proteine nei fbr del primo esperimento del Doe.....	275
5.5.3 In dettaglio la regione dello spettro: carboidrati e proteine nei fbr del secondo esperimento del Doe.....	279
5.5.4 Discussione conclusiva sugli esiti delle misure FTIR nei diversi programmi di stimolazione acustica impiegati.....	283
5.6 La tecnica di analisi Particle Image Velocimetry (mPIV) per visualizzare gli effetti delle stimolazioni acustiche sulla microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	288
5.6.1 Contenuti multimediali della tecnica mPIV.....	291
Conclusioni.....	292
Galleria Fotografica.....	294
Bibliografia.....	298
Ringraziamenti.....	304
Hanno parlato di noi:.....	306
Estratto per riassunto della tesi di dottorato.....	308

Presentazione sintetica e articolazione in fasi dell'attività svolta durante il periodo di dottorato inerente il progetto di ricerca

*Gli obiettivi principali di questa ricerca sono: 1) studiare gli effetti indotti sulle cellule di *Scenedesmus obliquus* dalle stimolazioni acustiche a diversa frequenza e intensità; 2) distinguere se gli effetti riscontrati siano da imputare solo a un effetto puramente meccanico di riduzione degli aggregati cellulari con un incremento complessivo di attività fotosintetica attribuibile ad un numero maggiore di cellule esposte al flusso fotonico oppure se, in risposta agli effetti della meccanotrasduzione, ciascuna cellula risponde con un incremento di efficienza fotosintetica; 3) realizzare un banco sperimentale costituito da una serie di fotobioreattori per effettuare test di semplice e rapida esecuzione, facilmente automatizzabili e scalabili a livello industriale, con i quali studiare gli effetti delle stimolazioni acustiche sulla crescita microalgale.*

*Obiettivi della ricerca sono, quindi, quelli di valutare se l'impiego della tecnologia acustica possa ritenersi valida nell'incrementare positivamente le cinetiche di crescita delle microalghie e in particolar modo della *Scenedesmus obliquus*, ritenuta dalla comunità scientifica uno tra gli organismi più efficienti e resistenti nell'assimilazione di flussi di CO₂ da combustione.*

In particolare, la ricerca è stata avviata con lo scopo di studiare gli effetti della meccanotrasduzione indotta dalle onde acustiche di basse frequenza e intensità sulle cellule microalgali e di investigare le risposte biochimiche agli stimoli di compressione e rarefazione nelle frequenze del suono udibile (100 – 20.000 Hz).

La complessità del lavoro di analisi e i numerosi parametri da monitorare hanno richiesto la messa a punto di protocolli di analisi specifici e l'utilizzo di strumentazione sofisticata quale il fluorimetro portatile AquaPen per monitorare lo stato fisiologico cellulare durante la crescita delle colture, un ossimetro a fibra ottica per il monitoraggio dell'ossigeno molecolare, la sonda Li-Cor per la misura del PAR (Photosynthetically Active Radiation) e uno Spettrometro per la misura indiretta di assorbanza e scattering della luce.

Con le analisi FTIR e Spettrofluorimetriche grazie alla collaborazione delle Prof. Paola Sassi e Loredana Latterini coadiuvate dalla Dott.ssa Sara Mattana è stato studiato l'effetto delle stimolazioni acustiche sulla composizione cellulare di carboidrati, proteine, lipidi e di quei metaboliti per i quali è stato possibile seguire l'andamento nel tempo nelle diverse condizioni di stress oltre che valutare lo stato fisiologico delle microalghe e di composizione per quanto riguarda le clorofille.

Con l'impiego di un idrofono è stato misurato nei fotobioreattori il campo acustico trasmesso al terreno di coltura e quindi alle microalghe dall'attuatore acustico posizionato alla base del fotobioreattore. Sono emerse correlazioni positive con il numero di cellule microalgali presenti che hanno permesso di mettere a punto ed utilizzare una nuova metodica per il monitoraggio continuo degli effetti delle onde acustiche sulle cinetiche di crescita delle colture microalgali.

La popolazione cellulare è stata, inoltre, misurata mediante un granulometro laser e uno Scepter contacellule automatico, con i quali è stato possibile monitorare giornalmente in ciascuno dei 12 fbr i cambiamenti nella distribuzione spaziale e dimensionale delle cellule di microalghe e degli aggregati, potendo così stabilire non solo il numero, ma anche il trend dimensionale durante l'incremento della biomassa cellulare.

Nella terza e ultima sessione sperimentale, eseguita mediante la costruzione di un disegno fattoriale Design of Experiment (Doe) con la collaborazione del Dott. Stefano Giovagnoli e del Co-Tutor Dott. Paolo Blasi. Dopo aver ottenuto la superficie di risposta e averne testato in successive repliche sperimentali l'affidabilità del sistema, sono stati condotti gli esperimenti finali sottoponendo le colture cellulari ai programmi di stimolazione ottimizzati dal Doe per caratteristiche sonore (frequenza e intensità), durata e presenza o meno delle stimolazioni acustiche nel fotoperiodo.

Sono tuttora in corso di sviluppo studi per la valutazione dell'ossigeno prodotto dalle membrane tilacoidali al fine di ottenere ulteriori conferme sul comportamento ed efficienza del fotosistema II. Tali studi vengono effettuati mediante la collaborazione attivata con il BioSolarLab di Alessandria diretto dalla dott.ssa Cristina Pagliano, sede distaccata del

Politecnico di Torino, e dal Prof. Guido Saracco con la supervisione del Prof James Barber dell'Imperial College di Londra.

Ulteriori studi ancora in corso di sviluppo vengono effettuati con la collaborazione del Gruppo di fisiologia delle Alghe costituito dal Prof. Mario Giordano, della Dott. ssa Alessandra Norici, dal Prof. Polonara e dall'Ing. Matteo Moglie, tutti dell'Università Politecnica delle Marche in Ancona. Le analisi riguardano CN e TXRF oltre alla determinazione della composizione della frazione lipidica mediante analisi gascromatografica.

Non è stata per niente banale la realizzazione degli stessi fotobioreattori (fbr) di vetro e dell'accoppiamento elettromeccanico con gli attuatori acustici pilotati da una scheda audio multicanale con amplificazione separata per ciascuno dei nove canali impiegati.

Entrambi i fbr di vetro e PVC e l'attuatore acustico sono stati analizzati con la tecnica Laser Doppler Vibrometer presso il Laboratorio di Misure Meccaniche della Facoltà di Ingegneria dell'Università Politecnica delle Marche, dove il gruppo di ricerca diretto dal Prof. Enrico Primo Tomasini che, in collaborazione con gli Ingegneri Paolo Castellini, Milena Martarelli e Claudio Santolini, ha effettuato le prove e le misure meccaniche necessarie ad ottimizzare i suoni utilizzati per le stimolazioni acustiche in funzione della capacità di risposta del tubo di vetro fotobioreattore (fbr)/attuatore acustico, in modo tale da avere risposte in frequenza ottimali caratterizzate da riproducibilità e stabilità.

Le colture microalgali durante la loro crescita sono state monitorate mediante registrazioni acustiche ottenute con un idrofono, allo scopo di rilevare la forma d'onda e la pressione acustica trasmessa e di correlarla con la popolazione di cellule presenti nel fbr al fine di testare le potenzialità di una nuova stima indiretta della biomassa per il monitoraggio automatico, continuo e in tempo reale, degli effetti delle onde acustiche sulle cinetiche di crescita delle microalghe.

La maggiore difficoltà nell'esecuzione di questa ricerca è stata la realizzazione del banco sperimentale avente la caratteristica di operare in contemporanea con 12 fbr, ciascuno del volume di 4 litri, in modo tale da poter effettuare per ogni campagna sperimentale 3 diversi programmi di stimolazioni acustiche e disporre di una linea di controllo. Ciò è stato reso possibile mediante l'impiego di una scheda audio e dell'amplificatore di segnale a 9 ingressi e 9 uscite audio separate.

Ciascuno dei 12 fbr è stato dotato di illuminazione artificiale ed è stata posta particolare attenzione allo studio e alla realizzazione del sistema di agitazione, visto che in questo lavoro di acustica applicata, si è ritenuto di non impiegare sistemi air lift ad aria o CO₂, allo scopo di preservare questa sperimentazione da possibili interferenze acustiche che avrebbero reso difficile l'interpretazione dei risultati ottenuti sulle cinetiche di crescita.

Nelle diverse fasi evolutive della sperimentazione e dopo vari tentativi si è giunti alla realizzazione di un sistema meccanico di agitazione delle colture realizzato mediante due palette di teflon collegate ad un asse verticale in acciaio, azionato con moto alternativo nella colonna d'acqua da un congegno di trascinamento silente. Tale sistema di agitazione si è rivelato, nelle sperimentazioni successive, ideale perché permetteva di distribuire in modo continuo e omogeneo le microalghe in tutta la colonna d'acqua, minimizzando effetti di ombreggiamento e prevenendo la formazione di biofilm di microalghe sulle pareti del fbr e non interferendo con onde luminose e acustiche.

*La collaborazione con l'Istituto "Institut für Strömungsmechanik und Aerodynamik LRT-7 Universität der Bundeswehr München", con l'Ing. Massimiliano Rossi ha consentito la realizzazione di filmati sul comportamento delle linee cellulari osservate in microscopia su microcanali su cui sono stati riprodotti con un attuatore piezoelettrico segnali acustici a diverse frequenze ed intensità al fine di acquisire le registrazioni video e poter approfondire le dinamiche prodotte dal campo acustico sulla popolazione cellulare, e quindi sulle oscillazioni in MHz indotta dall'esposizione delle cellule di *Scenedesmus obliquus* ai suoni udibili.*

La realizzazione di questa complessa e articolata attività di ricerca è stata resa possibile anche grazie alla collaborazione del fornitore Steroglass di Perugia che ha messo a disposizione le proprie sonde multi - parametriche, la sonda per la misurazione dell'ossigeno molecolare a fibra ottica Presens e ha realizzato i tubi fotobioreattori in vetro borosilicato corredati dalla vetreria (pipette in vetro lunghe 80 cm) necessarie ad effettuare in modo idoneo i prelievi sulla intera colonna d'acqua in ciascuno dei 12 fbr del banco sperimentale.

L'obiettivo generale di questo studio è stato la ricerca di strategie per il miglioramento dell'efficienza fotosintetica e della crescita di microalghe, in grado di fissare elevate quantità di CO₂, massimizzando la produzione di biomassa. Studi precedenti hanno dimostrato come l'impiego di onde acustiche influenzi positivamente la velocità di crescita di colture batteriche e altri microrganismi (Weinberger et al., 1973; Bozhkova et al., 1993; Hoki et al., 1996; Matsubashi et al., 1998; Pitt, et al., 2003; Beizhen et al., 2008; Hunt et al., 2009; Cara et al., 2011; Eltayeb et al., 2010; Hoki et al., 1996; Rokhina et al., 2009; Lee Ying et al., 2009; Lee et al., 2009; Azencott et al., 2007; Shaobin et al., 2010). Si è ritenuto quindi importante approfondire il meccanismo con cui tali effetti influiscono positivamente sulla crescita delle cellule microalgali e sull'abbattimento di CO₂ (Cervantes et al., 2013; Maraskolbe et al., 2012; Fang Li et al., 2011; Hsin Ho et al., 2010 Willem et al., 2008; Mitra et al., 2008; Lehr et al., 2009; Lee et al., 1994)

*In particolar modo, sono state eseguite sperimentazioni preliminari sul ceppo microalgale *Scenedesmus obliquus*, selezionato dopo accurata ricerca bibliografica. Questo ceppo ha mostrato capacità di assorbire quantità di CO₂ superiori rispetto ad altre specie microalgali, (Hsin Ho et al., 2010) nell'ordine di 390 mg/L, a una concentrazione in fase aeriforme del 20%, pari a quella presente nei gas di scarico prodotti dai siti industriali. Inoltre, date le sue caratteristiche morfologiche e la particolare tendenza a formare aggregati durante l'aumento della biomassa è stato ritenuto interessante valutare la possibilità di utilizzare le stimolazioni acustiche per limitare la formazione di aggregati cellulari, allo scopo di incrementare il rapporto superficie/ volume, migliorando il trasferimento di massa per l'approvvigionamento di nutrienti presenti in soluzione, ma anche di CO₂, e O₂.*

Introduzione

Questo progetto di ricerca, nella sua formulazione originaria, nasce con l'idea di studiare e affrontare le problematiche legate alla rimozione della CO₂ in una cementeria mediante l'impiego di fotobioreattori per la crescita di colture microalgali.

Esso s'inquadra in un più ampio programma di ricerca gestito dal Ministero dell'Ambiente con il cofinanziamento di 100 progetti di ricerca finalizzati a interventi di efficienza energetica e all'utilizzo di fonti di energia rinnovabile in aree urbane dal titolo: "Utilizzo di cluster di FotoBioReattori a illuminazione interna per lo sviluppo della produzione, su larga scala, di energia rinnovabile dalla coltivazione diffusa di microalghe" ammesso a finanziamento con decreto direttoriale SEC-2011-0007111 del 16/05/2011.

Il progetto del dottorato di ricerca è diventato parte integrante della ricerca ministeriale in cui il relatore della tesi di dottorato è stato nominato Direttore Tecnico del progetto, ammesso a cofinanziamento per l'importo di 500.000,00 euro proprio in tema di energie rinnovabili, di fotobioreattori e di microalghe, con un partenariato industriale composto da tre imprese. Dovendo rispondere a una progettualità più ampia, si è resa più dispendiosa la fase di ideazione, di progettazione e di realizzazione di un banco sperimentale su cui condurre in serie batterie di test dai quali poter ottenere importanti conferme sperimentali sull'impiego di questa innovativa tecnologia, che si ricorda essere stata proposta dal dottorando in itinere al percorso di ricerca intrapreso con l'assegnazione del dottorato il 01.01.2010.

L'industria del cemento, per ragioni principalmente legate al costo dei trasporti e all'approvvigionamento delle materie prime nonché dei combustibili, risulta quasi sempre ubicata nei pressi o comunque nelle immediate vicinanze di aree urbane, o che comunque negli anni sono diventate tali per l'espansione demografica che incalza a ritmi sempre crescenti.

Dalle stime economiche internazionali, la crescita demografica evolve a ritmi impressionanti e la testimonianza diretta globale sul pianeta viene confermata dalla crescita incontrollata della richiesta di “minerali da costruzione” tipo sabbia, pietra, cemento che ha raggiunto circa 25 miliardi di tonnellate all'anno corrispondenti ad un consumo pro capite superiore alle 3 tonnellate. Tutto ciò deve far riflettere non solo sulla fenomenologia, in questi giorni largamente frenata dalla crisi, ma anche sulle emissioni in atmosfera legate all'indotto di questa grande filiera industriale.

Il trend di produzione è davvero allarmante. Gli strumenti di politica economica messi in campo, dall'introduzione del Protocollo di Kyoto, impongono limiti sempre più stringenti, chiedendo a questi colossi industriali di bilanciare le proprie emissioni in atmosfera con l'introduzione del mercato del carbonio (carbon market) e dei relativi certificati ovvero permessi ad inquinare.

1.1 Il Protocollo di Kyoto, i crediti di emissione e il mercato della CO₂

Risale al 1997 la sottoscrizione del protocollo di Kyoto che decreta il programma comune di ridurre le emissioni dei gas esausti responsabili dell'effetto serra e del riscaldamento del pianeta. Tale accordo è divenuto operativo il 16 febbraio 2005. Fu fissata la percentuale di riduzione delle emissioni climalteranti nel valore pari al 5,2% del tetto raggiunto nelle emissioni in atmosfera nel 1990, non includendo obblighi e prescrizioni per i paesi in via di sviluppo.

E' nell'ambito della ratifica di tali accordi, che fu articolato un sistema flessibile di libero scambio di permessi tra le imprese al fine di contenere il tetto fissato da limiti imposti dal trattato. L'emission trading sheme ETS è, infatti, un programma di libero scambio dove, una volta fissato il tetto limite del carico ambientale di anidride carbonica emettabile, lo Stato distribuisce alle imprese un ammontare di certificati scambiabili in grado di coprire la quantità fissata. Coloro che non sono in grado di coprire le proprie emissioni incorrono nel pagamento di sanzioni pecuniarie. Il parametro più importante su tutti è quindi il metodo di assegnazione dei certificati.

L'emission trading è quindi uno dei maggiori strumenti di politica climatica ed è caratterizzato dalla capacità di stabilire un prezzo per la CO₂. La formazione del prezzo delle

quote di emissione (ovvero dei permessi ad inquinare) è l'aspetto più interessante se si vuole considerare l'inquinamento prodotto come parte integrante del processo produttivo e non solo come una sua esternalità negativa.

Queste determinano il prezzo di equilibrio che sarà la base per l'effettuazione di questi scambi.

Il sostenimento di questi costi per l'acquisto dei permessi o crediti di emissione determina un aumento nel prezzo dell'energia e ciò dovrebbe produrre l'effetto della contrazione dei consumi e orientare la domanda nella richiesta di energia da fonti rinnovabili.

A seguito delle congiunture negative del mercato, è cambiato il metodo di allocazione dei certificati che non vengono più distribuiti ma assegnati tramite aste, ciò al fine di elidere la formazione di windfall profits, ovvero di guadagni inaspettati dalla vendita del surplus dei certificati non impiegati.

In un mercato dove si è invertita la tendenza di crescita è infatti accaduto che a seguito della contrazione della produzione le imprese non hanno avuto alcuna necessità di acquistare certificati addizionali, trovandosi già un esubero sulle quote assegnate gratuitamente hanno permesso loro di conseguire ricavi dalla vendita dei certificati in eccesso.

Ma nel prossimo futuro, con lo sperato rilancio dell'economia, non sarà più così e solo chi si sarà dotato di strutture più efficienti e a basso impatto ambientale potrà competere nel mercato, considerando i trend e le previsioni che vedono un rapido incremento sul costo e soprattutto sulla disponibilità dei permessi necessari a bilanciare le proprie emissioni climalteranti.

Il principale impatto prodotto dall'ETS è rappresentato dal costo che le imprese dovranno affrontare per procurarsi i permessi necessari a coprire le proprie emissioni, per cui essendo il costo di tecnologie innovative per l'abbattimento delle emissioni di CO₂ presumibilmente inferiore al costo atteso per l'acquisto di nuovi certificati sul mercato, le imprese si sentiranno incentivate all'adozione delle nuove tecnologie.

Dallo scenario emerge chiaramente l'interesse verso il comparto industriale del cemento che, al di là delle "esternalità negative" alle quali si è erroneamente abituati a pensare, deve essere vista come una grande opportunità verso cui dirigere concrete azioni di sostenibilità visto che la ricaduta del valore aggiunto risultante da queste azioni virtuose verrebbe percepita non solo dagli operatori del comparto, ma si estenderebbe immediatamente alle aree urbane e alle grandi filiere produttive.

Deve quindi assolutamente cambiare il metodo di osservazione e occorre restituire valore con precise azioni di politica economica che consentano di unire filiere oggi così distanti quali la produzione del cemento, delle biomasse e delle energie.

In questo progetto di ricerca è stata proposta, per la prima volta in Italia, la possibilità di affiancare ad una cementeria un impianto di fotobioreattori in cui far crescere le colture microalgali, considerando questo impianto a biomasse come un vero e proprio modulo di conversione energetica.

1.2 Come trasformare un costo di un intangibile asset (energia dissipata, crediti di emissione) in una grande opportunità.

Purtroppo, come visto in precedenza, le cementerie sono particolarmente penalizzate dall'introduzione del sistema ETS, nonostante che nel primo periodo di applicazione dello schema queste hanno potuto realizzare profitti o comunque sostenersi nel mercato e fare fronte alla contrazione della domanda.

La possibilità di dotarsi di un valido ed efficiente ritrovato tecnologico che consenta di ridurre, almeno in parte, le emissioni inquinanti di CO₂ convogliando quest'ultime in fotobioreattori per la produzione di biomassa, deve fare riflettere e pensare a tutta una serie di altri importanti benefici che è possibile trarre dal ricorso a questa tecnologia.

In primo luogo, verrebbero investiti parte del costo marginale oggi sostenuto solo per la compensazione "virtuale" della CO₂ che continua però a fluire in atmosfera. Di contro la biosintesi operata dalle microalghe interviene in questo processo sequestrando e trasformando il carbonio inorganico (CO₂) in carbonio organico (CH₂O) e restituendo all'ambiente ossigeno molecolare.

E' pur vero che però questi organismi unicellulari della dimensione di 5-7 microns, fluttuando nell'acqua hanno bisogno di grandi volumi affinché possano restituire importanti azioni di sequestro della CO₂ che in soluzione acquosa è presente con pochi grammi/litro.

D'altro canto, come si dirà meglio in seguito, la possibilità di impiegare questa tecnica di coltivazione in abbinamento ad una cementeria considerandola un modulo di conversione energetica, impone adeguate riflessioni.

Anche le quantità di biofuels ottenibili sarebbero fortemente limitate e direttamente proporzionali ai volumi di colture da avviare, ma, come si vedrà in seguito, è in una logica di filiera corta che occorre pensare per quanto concerne l'impiego di queste risicate aliquote di biofuels e non certo ad un mercato più allargato.

Da qui lo slogan di “richiamare entro le mura domestiche, le minori emissioni prodotte dalla combustione del biodiesel ottenuto dalle microalghe, CO₂ free”.

Impiegare nella filiera del trasporto da e verso le aree urbane dei prodotti ottenibili da una cementeria con camion e betoniere alimentate esclusivamente con questo biofuels, potrebbe consentire nel prossimo futuro di amplificare in modo esponenziale il valore delle tonnellate di CO₂ sequestrabili nello stabilimento per opera delle microalghe.

Nel secondo e più importante livello di impiego, questi biofuels se tracciati, con il monitoraggio delle emissioni (con apposite centraline installate a bordo degli utilizzatori), potranno consentire di contabilizzare entro le mura dello stabilimento di appartenenza le relative quantità di CO₂ risparmiate che sarebbero pari al 78% circa, quindi 780 Kg di CO₂ evitata per 1 tonnellata convenzionalmente emessa dalla combustione di gasolio tradizionale (Sheehan et al.,1998), Figura 1.

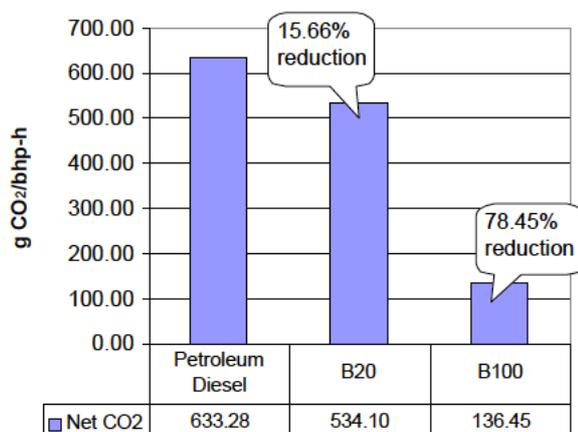


Figura 1: Confronto delle emissioni di CO₂ da autotrazione mediante l'impiego di gasolio e biodiesel al 20% e 100% rapportate alla potenza oraria (cv/ora) negli autobus urbani (Sheehan et al.,1998)

E' quindi verosimile la possibilità di dotarsi con questa tecnologia di certificati al proprio interno dello stabilimento sottraendosi dai rischi del mercato legati al prezzo variabile, ma lo sarà ancor di più, su base esponenziale, il beneficio ottenuto dall'allocazione sui mercati internazionali del valore corrispondente alle minori emissioni in atmosfera, contabilizzate

questa volta su un volume chiaramente maggiore quale quello pari alle emissioni di CO₂ in atmosfera derivanti dall'utilizzo del biodiesel ottenuto dalle microalghe.

Ma vi è di più. Questo beneficio, sarà un beneficio localizzato, direttamente fruibile dai cittadini residenti nelle aree urbane visto che il transito di automezzi che utilizzano biofuels ottenuto con queste filiere è l'87% circa meno inquinante.

E' stato inoltre ipotizzato che un intervento di possibile realizzazione possa restituire ad un complesso industriale di medie dimensioni un beneficio del 20% circa che per una cementeria che su base annua non interrompe mai i cicli di produzione corrisponderebbe a circa 2,4 mesi di assenza di funzionamento.

Come si vedrà poi meglio in seguito, alle citate azioni di sostenibilità ambientale vanno a sommarsi il valore ottenibile dall'impiego delle frazioni lipidiche della biomassa (Leonardi et al., e quindi omega 3 e omega 6 che sul mercato hanno un elevato valore stimato intorno ai 2000 euro al Kg.

Ciò dovrebbe consentire di raggiungere un valore positivo di EROI ovvero di ritorno sull'investimento, con una quantità di energia nettamente inferiore a quanta necessaria a garantire il funzionamento di questi impianti a biomasse.

1.3 Le microalghe e i fotobioreattori quale modulo innovativo di conversione energetica per una cementeria.

Le colture microalgali in ambiente controllato sono considerate, nella produzione di biomassa e quindi di biodiesel, più efficienti rispetto alle piante superiori per la loro velocità di crescita. Inoltre, essendo le microalghe coltivate in fotobioreattori chiusi e alimentati da luce artificiale, queste non saranno condizionate da cambiamenti meteo-climatici e/o da contaminazioni ambientali.

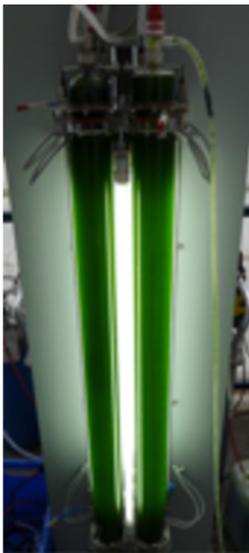
La possibilità di utilizzare microalghe per i suddetti scopi, riduce sicuramente l'uso di fertilizzanti e pesticidi e riduce sensibilmente l'impiego di combustibili fossili. Inoltre, su base teorica, la superficie necessaria per la produzione di biocombustibile da microalghe è da 10 a 100 volte inferiore a quella necessaria alla stessa produzione utilizzando piante superiori (Greenwell et al., 2010).

Dalla biomassa prodotta dalla coltivazione di microalghe, è possibile inoltre estrarre la frazione lipidica che, sottoposta a successiva raffinazione, consentirà di ottenere biodiesel e fine chemicals pregiati.

Il processo di produzione di biodiesel è a basso impatto ambientale e presumibilmente “CO₂ free” (Argese et al., 2006), in quanto la captazione di CO₂ dall’atmosfera ad opera della fotosintesi clorofilliana nelle microalghe in crescita dovrebbe sopravvalere o al massimo equivalere la CO₂ emessa in atmosfera dalla combustione del biocarburante da esse prodotto. Studi dimostrano che l’impiego di questi biocarburanti per autotrazione potrebbe ridurre l’emissione di CO₂ di circa il 78% (Figura 1) (Sheehan et al., 1998).

Il biodiesel ottenuto dalle microalghe potrà essere utilizzato per rifornire la filiera energetica del medesimo complesso industriale ospitante, “richiamando entro le mura dello stabilimento” le minori emissioni prodotte dall’impiego di questi biocombustibili.

Solo così, la riduzione della CO₂ ottenute nei Fbr, e la successiva combustione per autotrazione del biodiesel prodotto potrà concorrere in concrete azioni di riduzione della CO₂ atmosferica e conseguente riduzione dell’effetto serra incrementando la sostenibilità ambientale del processo.



Un esempio di un’applicazione di ricerca industriale con l’impiego di fotobioreattori microalgali (Figura 2) è quello realizzato in Francia nella cementeria di Gargenville su Progetto della Italcementi.¹

Nell’impianto di Gargenville, la cattura della CO₂ con le microalghe è mirata al recupero e al riciclaggio della CO₂ prodotta dal processo di produzione del clinker, mentre la biomassa algale prodotta viene utilizzata nella produzione di biofuels.

Figura 2: Un particolare del fbr di vetro utilizzato nell’impianto di Gargenville.

¹ <http://www.italcementigroup.com/ENG/Media+and+Communication/News/Sustainability/20120529.htm>

*1.4 La scelta della microalga *Scenedesmus obliquus* come organismo modello per lo studio degli effetti delle stimolazioni acustiche sulle cinetiche di crescita*

L'analisi approfondita della letteratura ha messo in risalto le complesse problematiche legate alla scalabilità di tali processi a livello industriale, in cui anche la semplice e indispensabile operazione di agitazione delle colture microalgali diventa un grosso problema di difficile soluzione.

Su scala industriale, infatti, le colture microalgali, presuppongono l'impiego di grandi volumi d'acqua che sono messi in movimento con pompe idrauliche di vario genere che provocano danno alle colture cellulari a causa di collisioni delle cellule con gli organi meccanici in movimento, meglio definite forze di taglio.

Lo studio è stato concentrato, quindi, sulle metodologie di agitazione delle colture cellulari utilizzate e in particolare sulle forme di stress meccanico provocato dall'impiego di questi dispositivi.

Particolare attenzione è stata rivolta allo studio del modello meccanico di cellula biologica e alle forme di interazione tra essa e l'ambiente circostante. In natura i rumori prodotti dalla pioggia, dal vento, dalle stesse onde del mare, dei fiumi e dei laghi, dal cinguettio degli uccelli interferiscono con l'ambiente circostante con vere e proprie interazioni meccaniche. Ad esempio è stato dimostrato con l'utilizzo di colture batteriche di *E. Coli* che le stimolazioni meccaniche nel campo del suono udibile incrementavano sensibilmente le cinetiche di crescita (Shaobin et al., 2010).

Da tutti quanti questi approfondimenti ha cominciato a delinearsi l'interesse per l'analisi e la previsione degli effetti prodotti dall'esposizione delle colture microalgali a stimolazioni sonore di bassa frequenza ed intensità.

Nell'ambito di tali approfondimenti sono stati presi in esame alcuni lavori scientifici in cui le sospensioni microalgali erano stimulate anche da onde acustiche, ma questo settore era non solo privo di approfondimenti, ma al di là di isolate evidenze sperimentali, non era per nulla chiaro il meccanismo di risposta della cellula microalgale alle sollecitazioni meccaniche. Alcune evidenze sugli effetti delle onde acustiche, seppure in range di frequenza e intensità diverse erano state rilevate con alcune colture di lieviti e batteri che presentavano caratteristiche morfologiche simili alla microalga selezionata per la sperimentazione.

La scelta della microalga da avviare alla sperimentazione è scaturita proprio dall'evidenza sperimentale che le cellule che erano risultate maggiormente sensibili agli effetti meccanici generati dalla pressione idrostatica nella coltura erano quelle a geometria allungata: le geometrie astiforme di *E. coli* e di *P. aeruginosa* si erano dimostrate infatti più sensibili all'applicazione di pressione (Hartmann et al, 2005).

La *Scenedesmus obliquus*, con la sua forma di uno sferoide prolato (ellisse allungato) potenzialmente rispondeva a queste caratteristiche per forma e dimensione e, una recente pubblicazione di (Hsin Ho et al., 2010) attribuiva a questo ceppo microalgale elevata capacità di assorbimento della CO₂ emessa dalla combustione, e ciò rispondeva al requisito primario del progetto di riduzione della CO₂ emessa in una cementeria.

1.5 Il cuore del progetto: la stimolazione acustica di bassa frequenza ed intensità.

Questa parte del progetto ha richiesto un'attenta individuazione e caratterizzazione dei materiali da impiegare, per cui è stata messa in piedi una fitta rete di relazioni con diversi organismi ed enti di ricerca che sono stati implicati nell'acquisizione e/o realizzazione dei dispositivi con caratteristiche prestazionali ottimali per la corretta realizzazione dei test sperimentali previsti dal progetto di ricerca.

Il primo problema affrontato è stata la riproduzione dei suoni di bassa frequenza ed intensità in acqua. Allo scopo è stata effettuata una ricerca di mercato che ha permesso di individuare un dispositivo acustico in grado di trasmettere suoni nel range delle basse frequenze alla superficie del fotobioreattore, con una buona risoluzione.

E' stata individuata la società Esarc Hi Tech di Milano, proprietaria di un brevetto recente (2011) e produttore dell'attuatore acustico denominato Ottone che possedeva le caratteristiche cercate, cioè in grado di operare nel range delle basse frequenze (nel campo del suono udibile), con una buona capacità di risposta e una buona massa inerziale capace di mettere in vibrazione una superficie di vetro ovvero il tubo fbr in cui erano fatte crescere le microalghe.

Il secondo aspetto che si è dovuto affrontare è stato la scelta della geometria del fotobioreattore e dei materiali di costruzione in rapporto al volume di coltura microalgale da impiegare nella realizzazione dei fbr. Sono state prese in esame diverse forme e materiali che potevano avere le caratteristiche di trasmettere in modo efficace ed efficiente i suoni prodotti dall'attuatore acustico.

Dalle prove meccaniche effettuate nei laboratori di misure dell'Università Politecnica delle Marche, gli Ingegneri Paolo Castellini, Milena Martarelli e Claudio Santolini, sotto la direzione del Prof. Enrico Primo Tomasini, mediante l'analisi modale effettuata con l'impiego di un vibrometro laser, si è individuata una particolare struttura di vetro, un tubo chiuso alla base a sezione ellittica che offriva la migliore conformazione prestazionale alla trasmissione dei segnali.

Il vetro ha dimostrato di prestarsi bene ad un lavoro seriale di sperimentazione in cui è necessario poter sterilizzare le strutture dei fbr impiegati al termine di ciascuna replica sperimentale. Le superfici in vetro riducevano in modo considerevole la formazione di biofilm cellulare sulle superfici, minimizzando i fenomeni di ombreggiamento al passaggio del flusso fotonico. Il vetro offriva anche la possibilità di mantenere fuori dal fbr la fonte artificiale d'illuminazione, evitando così la trasmissione del calore dissipato dalle lampade alle colture microalgali.

Lo studio e l'analisi modale ha interessato sia il vetro che l'attuatore acustico ed è stato successivamente esteso all'intera catena elettromeccanica di trasporto dei segnali. È stata verificata la risposta del sistema a diverse condizioni d'impiego: sola acqua bidistillata, terreno di coltura e terreno di coltura più le microalghe, al fine di valutare la risposta dell'attuatore, i modi di vibrazione e i nodi presenti sulla struttura del fbr.

Queste tecniche d'indagine hanno consentito di appurare non solo la risposta dell'intero sistema (fbr e attuatore) nelle varie condizioni operative, ivi incluso il livello del brodo di coltura, ma di campionare successivamente le tracce audio da impiegare nelle attività sperimentali tenuto conto delle resistenze e dei buchi di riproduzione propri del dispositivo. Tutte queste informazioni si sono dimostrate preziose nella realizzazione del disegno sperimentale con il quale sono stati preparati i programmi delle stimolazioni acustiche.

La geometria di fbr scelta ha presentato difficoltà tecniche costruttive che hanno trovato una valida risoluzione presso le officine della Steroglass di Perugia.

La sezione ellittica del tubo di vetro è stata scelta per due sostanziali ragioni:

- la prima perché questa geometria espone alla luce una superficie laterale più ampia rispetto al raggio di curvatura di un tubo cilindrico dello stesso diametro;
- la seconda ragione è che il tubo a sezione ellittica, ha un diametro centrale esattamente pari alla metà della sezione cilindrica, raddoppiando l'efficienza nella penetrazione della luce rispetto a un tubo a sezione cilindrica.

E' stata così incrementata notevolmente la penetrazione della luce nei fbr che in questo lavoro era l'unico parametro fisso ed era necessario rendere in qualche modo più efficiente. Inoltre, dal punto di vista meccanico vibrazionale, questa soluzione eliminava fastidiosi moti radiali che invece sono stati rilevati su analoghe strutture di vetro a sezione circolare.

Solo in seguito è stata caratterizzata la fonte artificiale di illuminazione, ottenuta mediante l'impiego di due distinte lampade al neon con diverso grado di colore, ed una buona intensità nella regione spettrale del Photosintetically Active Radiation (PAR), ovvero della porzione dello spettro fotosinteticamente attiva.

Una volta individuate le strutture dei fbr e l'illuminazione artificiale, è stato affrontato il problema della trasmissione dei segnali acustici ai 9 attuatori acustici con 9 canali separati e 9 distinte piste di amplificazione necessarie nella gestione di diversi programmi di stimolazione acustica da impiegare.

Dalle ricerche di mercato, è stato individuato il software Nuendo 4 per la gestione dei segnali e la scheda audio Presonus Fire Studio con cui gestire separatamente le 9 tracce audio registrate da riprodurre sui 9 attuatori acustici, corredando la scheda audio di amplificatori di segnale a canali separati.

A questo punto, una volta ricevuti in laboratorio i materiali commissionati come nella descrizione fin qui esposta, è stato realizzato il banco sperimentale composto da 12 fbr, di cui 9 dedicati ai programmi di stimolazione acustica e 3 di controllo, e sono stati effettuati i test di controllo per assicurare il corretto funzionamento del fotoperiodo della luce artificiale (alternando 14 ore di luce e 10 ore di buio), della riproduzione sonora e del sistema di agitazione delle colture.

Sono state eseguite le misure atte a rilevare i rumori di fondo del laboratorio e tutte le altre possibili emissioni sonore che avrebbero potuto perturbare la corretta esecuzione dei test sperimentali di acustica. Sono stati così registrati ed elaborati i rumori di fondo prodotti dai reattori delle lampade al neon, dall'impianto di condizionamento del laboratorio e, della eventuale interferenza tra i suoni riprodotti da ciascun fbr.

Si è dovuto quindi progettare e realizzare la base di ciascun fbr, ottenuta con l'accoppiamento di due materiali: marmo e legno con uno strato di materiale isolante proprio per attenuare le vibrazioni trasmesse sul banco di lavoro.

Una volta dato avvio al nostro primo esperimento pilota con i 12 fbr, sono stati testati 3 diversi stimoli acustici in triplicato sui 9 fbr dedicati e la linea di controllo anch'essa in triplicato su altri 3 fbr.

Omettendo la descrizione sulle difficoltà nascenti dalla sterilizzazione dei fbr e della vetreria occorrente, non è stato facile procedere alla sterilizzazione del volume complessivo di acqua bidistillata (48 litri) cui sono stati aggiunti i nutrienti e i sali minerali al fine di ottenere il terreno di coltura BG11 modificato. Sono state quindi ideate e commissionate delle pipette lunghe 80 cm per consentire un prelievo omogeneo lungo tutta la colonna d'acqua del fbr.

Nella sua conformazione originaria è stato scelto un sistema di agitazione manuale con una semplice astina di vetro, munita di un piattello alla base, azionata manualmente con 5 azioni di salita e discesa lungo la colonna d'acqua di ciascun fbr, poco prima del prelievo al fine di ottenere un campione rappresentativo. Infine da un semplice ugello si faceva fluire aria microfiltrata in ciascun fbr. Le piccole bolle di aria introdotte dal basso operavano la lenta risospensione delle microalghe senza provocare fenomeni di turbolenza nei fbr.

Si sono evidenziati però subito problemi a proposito delle tecniche di analisi da impiegare poiché una simile configurazione non rendeva possibile procedere con tecniche ordinarie di analisi, perché dovendo operare in triplicato per ciascun parametro da acquisire si dovevano effettuare 36 misure.

Il lavoro di conta cellulare al microscopio ottico e con camera di burker non solo era estenuante, ma diventava privo di attendibilità a causa del tempo impiegato per le conte cellulari e, soprattutto nello studio delle cinetiche di crescita cellulari, questo metodo risultava privo di importanti informazioni legate all'aspetto dimensionale ed al volume stesso delle cellule, informazione quest'ultima essenziale nello stabilire il rapporto di massima efficienza superficie/volume delle stesse cellule microalgali.

Neanche il peso secco era in grado di aggiungere valore a tale informazione e pertanto nell'immediatezza, sono stati scelti i metodi ottici di analisi mediante lettura dei campioni allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 678 nm, operazione non automatizzabile.

E' stato quindi iniziato uno studio approfondito sulla morfologia della microalga, con analisi di microscopia ottica ed elettronica TEM al fine di acquisire informazioni in merito:

1. all'eventuale modificazione delle cellule microalgali da attribuire alle stimolazioni meccaniche prodotte dalle diverse conformazioni sonore inviate ai fbr;
2. alla presenza e distribuzione nel campione osservato di aggregati cellulari;
3. agli aspetti dimensionali.

Una volta ottenute queste informazioni, e soprattutto il diametro medio e volume di ciascuna cellula, è stata operata la conversione geometrica della forma della cellula di *Scenedesmus obliquus*: ellisse prolato al pari diametro dell'ombra generata dalla sfera equivalente. Queste informazioni sono state, infatti, utilizzate nella caratterizzazione di un nuovo strumento con cui effettuare la conta cellulare: il granulometro laser.

Per questo strumento di analisi, la consultazione bibliografica non ha restituito informazioni e protocolli sperimentali per il riconoscimento di cellule con questa particolare conformazione morfologica.

In pratica lo strumento operando in autodiluizione del campione, lascia passare un piccolo flusso di campione davanti ad un raggio laser, producendo sul rilevatore un'ombra al passaggio di ciascuna cellula. La particolare conformazione ellittica delle microalghette rendeva difficile considerare un diametro univoco al momento del passaggio della cellula davanti al detector. L'inclinazione dell'asse maggiore della cellula al passaggio davanti al raggio laser proiettava, infatti, sullo schermo del detector un'ombra di dimensioni variabile dovuta ai due diametri maggiore e minore della possibile posizione istantanea.

Nonostante l'auto diluizione del campione e, nonostante l'impiego di aliquote sempre più ridotte di campione, tutto ciò al fine di ridurre il tempo necessario per ciascuna conta cellulare, alla fine si arrivava alla inevitabile perdita delle informazioni per concentrazioni limite. Questo metodo innovativo trovava quindi una sua piena conferma al suo impiego per la determinazione della distribuzione spaziale e dimensionale di cellule di *Scenedesmus obliquus*, ma nel nostro caso, il fattore tempo non consentiva il suo impiego in maniera così massiva.

Da una ricerca di mercato è stato, infine, individuato il nuovo contacellule automatico Scepter della Millipore, successivamente utilizzato per rapide misure di concentrazione nelle analisi in triplicato delle colture microalgali presenti nei diversi fbr. Per una maggiore certezza sulla precisione delle letture, i metodi di analisi per le conte cellulari descritte sono stati correlati tra loro mediante la realizzazione di una retta di taratura in cui sono stati messi a confronto i valori osservati con il metodo ottico, il peso secco, le conte in camera di burker e con i due metodi Scepter e Granulometro laser.

Il metodo ottico di lettura del campione in cuvette allo spettrofotometro riusciva a descrivere bene lo stato di avanzamento delle singole colture mentre lo Scepter forniva l'esatta distribuzione dimensionale delle cellule e dei suoi aggregati. Con questa configurazione di misura si è riusciti a osservare nei fbr stimolati con un particolare suono denominato sweep acustico una crescita doppia rispetto ai fbr di controllo.

Una volta ottenute le preliminari conferme sperimentali, lo studio si è concentrato sull'analisi e successiva realizzazione di un sistema di agitazione in cui fossero state annullate le turbolenze e le perturbazioni di vario genere prodotte da organi meccanici in movimento, quali ad esempio la rotazione di ancorette magnetiche, di bolle d'aria, di palette, eliche in immersione, sempre allo scopo di preservare questa sperimentazione da possibili interferenze acustiche che avrebbero reso difficile l'interpretazione dei risultati ottenuti sulle cinetiche di crescita.

A questo punto si è cercato di studiare come rendere ancora più veloce l'attività di misura sull'andamento di crescita delle colture microalgali, senza peraltro sacrificare la precisione della misura, con la messa a punto di un nuovo metodo ottico indiretto mediante l'impiego della sonda radiometrica Li-Cor, utilizzata in precedenza per le misure del PAR su ciascun fbr.

In pratica, con questo nuovo metodo, viene rilevato sulla superficie del fbr un livello di intensità luminosa captato dalla sonda radiometrica Li-Cor nella regione del PAR della radiazione luminosa che viene poi sperimentalmente valutata come assorbanza con la medesima relazione usata nelle misure spettrofotometriche $OD = -\log T1/T0$.

L'impiego di questa nuova metodica ha consentito di dedicare, negli esperimenti successivi, buona parte del tempo ad altri approfondimenti e analisi volte a valutare le risposte delle cellule microalgali allo stress indotto dalla meccanotrasduzione.

Sono stati così messi a punto i protocolli per le analisi con tecniche fluorimetriche per la determinazione dell'efficienza fotosintetica e quindi dello stato fisiologico delle microalghe nei diversi programmi di stimolazione, eseguendo due diverse misure di cui una in tempo reale, investigando un campione microalgale prima e dopo la stimolazione sonora con l'ausilio del fluorimetro portatile AquaPen e, sui campioni crioconservati, mediante uno Spettrofluorimetro in laboratorio, acquisendo anche immagini in microscopia a fluorescenza solo dopo aver individuato l'esatta frequenza di eccitazione del campione.

Altri approfondimenti sono stati fatti con lo studio e le analisi con tecnica FTIR al fine di rilevare le variazioni in intensità dei segnali spettrali per i quali erano state preventivamente assegnate le relative bande, tutto ciò al fine di valutare le loro variazioni nel profilo molecolare della cellula in risposta alle sollecitazioni meccaniche.

L'introduzione di queste metodiche di analisi idonee per misure direttamente in campo ha consentito di poter dedicare parte del tempo anche per l'acquisizione di segnali acustici, disponendo per l'occorrenza di un idrofono ad altissima sensibilità e risoluzione spettrale.

In pratica la misura consisteva nella diffusione nel fbr di un suono campionato della durata di 10 secondi e nella registrazione della traccia audio con l'idrofono preamplificato.

Queste misure sono state ripetute su tutti e 9 i fbr stimolati acusticamente nei diversi stati di avanzamento delle colture a partire dalla misura del solo terreno di coltura al tempo zero (T_0), cioè del terreno a cui sono state aggiunte le alghe, T_3 (dopo 3 giorni di crescita) e T_{10} (a 10 giorni dall'avvio).

La successiva elaborazione tra i dataset acustici e le popolazioni cellulari ha consentito la normalizzazione degli spettri e lo studio della correlazione tra i due dati.

E' emersa una piena corrispondenza nella risposta tra l'intensità di segnale acustico misurato ed il numero di particelle e si è giunti alla conclusione di pensare di utilizzare questa nuova metodica di misura in vivo per avere una risposta immediata sullo stato di avanzamento delle colture, seguito successivamente da tutti gli altri approfondimenti e conferme sperimentali.

Si è pensato già ad una ipotesi brevettuale di questa metodica per applicazioni industriali la dove risulta difficile monitorare le cinetiche di crescita in fbr lunghi decine se non centinaia di metri, con milioni di litri di acqua.

In conclusione, i due sistemi di misura Li-Cor e le registrazioni delle onde acustiche trasmesse, hanno permesso in questo studio di ridurre notevolmente il tempo rispetto a quello impiegato per analisi convenzionali, incrementando notevolmente il numero di esperimenti effettuabili e soprattutto riducendo notevolmente i costi. L'impiego del contacellule automatico, al di là del costo per l'acquisto dello strumento, viene incrementato dal costo del singolo sensore monouso che opera in micro fluidica e che si aggira intorno ai 2 euro più iva che, nel nostro caso portava ad un esborso pari a circa 100 euro per ogni giorno di monitoraggio delle colture.

L'introduzione di questa nuova metodica di rilevazione acustica delle cellule per millilitro, non invasiva e continua nel tempo, caratterizzata da elevate automaticità rapidità e velocità di esecuzione, che alla luce delle prove e delle misure effettuate si è dimostrata, in condizioni standardizzate, riproducibile, al pari delle misure ottiche ottenibili con la Licor, ma in questo

caso, con la possibilità di automatizzarle in ciascun fbr con un apposito software e senza la presenza di un operatore che vada a graficarne successivamente il dato, visto che la correlazione tra intensità acustica e numero di particelle, una volta calibrato il sistema, fornisce una risposta immediata ed inequivocabile.

Tutte queste considerazioni, rendono quest'ultimo metodo assolutamente indispensabile laddove si vogliano approfondire e portare avanti studi caratterizzati da tali difficoltà operative.

Il banco sperimentale costituito dai fbr attrezzati con i dispositivi e gli strumenti sopra descritti è stato utilizzato per monitorare l'effetto sulle cinetiche di crescita microalgale delle stimolazioni acustiche.

Il numero complessivo di esperimenti da eseguire è stato notevolmente ridotto con l'impiego di un disegno sperimentale Design of experiment (Doe) con il quale, una volta ottenuta una superficie tridimensionale di risposta e la sua validazione, sono state individuate le caratteristiche sonore per frequenza, intensità e durata delle stimolazioni con le quali ottenere le migliori cinetiche di crescita rispetto alle colture di controllo.

Le microalghe, sp. Scenedesmus obliquus

La microalga di acqua dolce della Specie *Scenedesmus obliquus* appartiene alla famiglia delle *Scenedesmaceae*, ordine Clorococcales, classe Clorophyceae, divisione Chlorophyta (alghe verdi). E' un organismo eucariota, unicellulare, dalla forma geometrica di uno sferoide prolato (Vedi Figura 1 riquadro 2a, 2b) che vive da solo o in colonie di più individui che si appoggiano le une alle altre formando dei cenobi in cui le cellule che si trovano alle estremità assumono la forma di una mezzaluna (vedi Figura 1 riquadro 2c, 2d). Durante la crescita raggiungono una dimensione media nell'ordine dei 5-7 um.

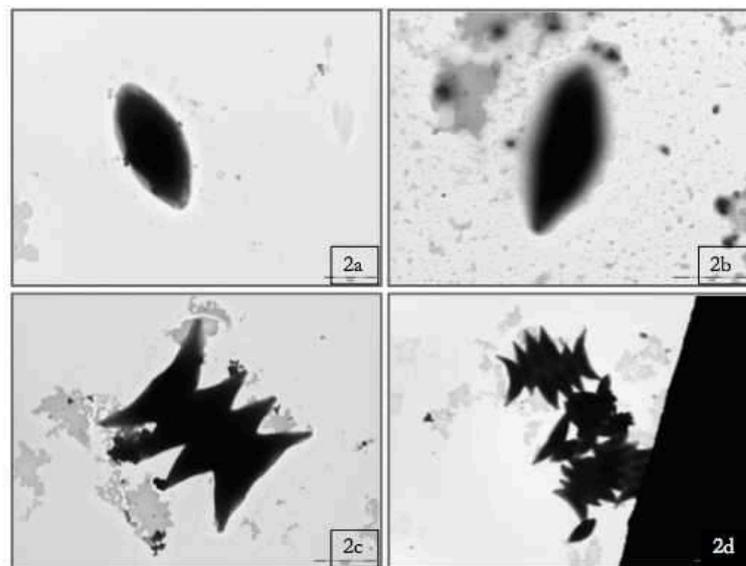


Figura 1: *Scenedesmus obliquus* caratterizzati morfologicamente mediante microscopia elettronica a trasmissione (transmission electron microscopy, TEM) usando un microscopio Philips EM 400T (Eindhoven, NL). Nel riquadro 2c e 2d sono visibili cenobi microalgali formati da 4 cellule in cui quelle esterne assumono morfologia caratteristica di una mezza luna.

Si uniscono in gruppo per superare la competizione con altri organismi e non essendo dotate di moto proprio sono gli stessi moti convettivi che le agganciano e le indirizzano verso l'alto, trasportandole e soprattutto rallentando la velocità nella ricerca di nutrienti, ma anche di luce e calore.

Si riproducono per divisione cellulare. Da una singola cellula alga madre si originano diverse cellule figlie. Durante la crescita, le cellule figlie generano una propria membrana, fino al dissolvimento di quella derivante dalla cellula madre. Presentano un grosso cloroplasto situato nella sua posizione centrale, contenente clorofilla a e b, insieme ad un'alta percentuale di luteina e immagazzinano i prodotti di riserva (amilosio e amilopectina) all'interno del cloroplasto. Solamente nei momenti di carenza d'azoto (Çelekli et al., 2008), vengono accumulati differenti tipi di carotenoidi nel citoplasma.

2.1 La conversione dell'energia fotochimica: la fotosintesi, i cloroplasti e i nutrienti

La fotosintesi è il processo più importante per il metabolismo delle alghe. La maggiorparte delle alghe sono organismi fotoautotrofi obbligati, ovvero ottengono il carbonio organico cellulare dalla riduzione della CO₂ in carboidrati.

Attraverso l'energia luminosa, che viene catturata dai pigmenti fotosintetici e, successivamente, trasformata in energia chimica, viene ottenuta l'energia per compiere la reazione di riduzione della CO₂. In assenza di luce, oppure se presente in quantità o intensità insufficiente, le alghe tendono a morire dopo che i composti organici depositati nelle cellule sono stati utilizzati, oppure divengono inattive a livello metabolico, in stato quiescente, fino a che la luce diviene nuovamente disponibile.

I cloroplasti sono gli organi cellulari deputati alla creazione dell'energia necessaria al sostentamento cellulare, e rappresentano il luogo fisico dove si esplica la funzione fotosintetica.

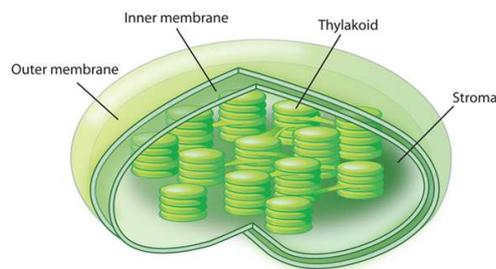


Figura 2: Cloroplasti circondati da due membrane racchiudono lo stroma dove risiedono enzimi metabolici e i Tilacoidi implicati nella conversione fotochimica della radiazione luminosa. Immagine tratta da <http://www.nature.com/scitable/topicpage/plant-cells-chloroplasts-and-cell-walls-14053956#>

Le clorofille a, b e c sono quei pigmenti presenti in tutte le cellule eucariote vegetali localizzati nella membrana tilacoidale che assorbono e amplificano lo spettro del flusso fotonico dell'energia luminosa disponibile. La fotosintesi ossigenica avviene nelle membrane tilacoidali dei cloroplasti (Figura 2). Le clorofille mediamente composte da oltre 300 molecole si differenziano tra di loro strutturalmente per le diverse proteine di membrana e lavorano in modo funzionale accoppiato nella cattura della radiazione luminosa a diverse lunghezze d'onda. Nei centri di reazione la clorofilla a, trasmette energia per risonanza fluorescente avviando così la catena del trasporto elettronico che attraverso una serie di passaggi intermolecolari determina quel potenziale chemiosmotico transmembrana necessario ad attivare la sintesi di molecole ad alto contenuto energetico ATP e NADPH.

Il fotosistema II lavora in serie al fotosistema I, secondo lo schema non ciclico definito “a zeta” rappresentato nella Figura 3 (Williams et Laurens, 2010). La fissazione conclusiva del carbonio nelle molecole di glucosio avviene infine attraverso una serie di reazioni luce-indipendenti nel ciclo di Kelvin.

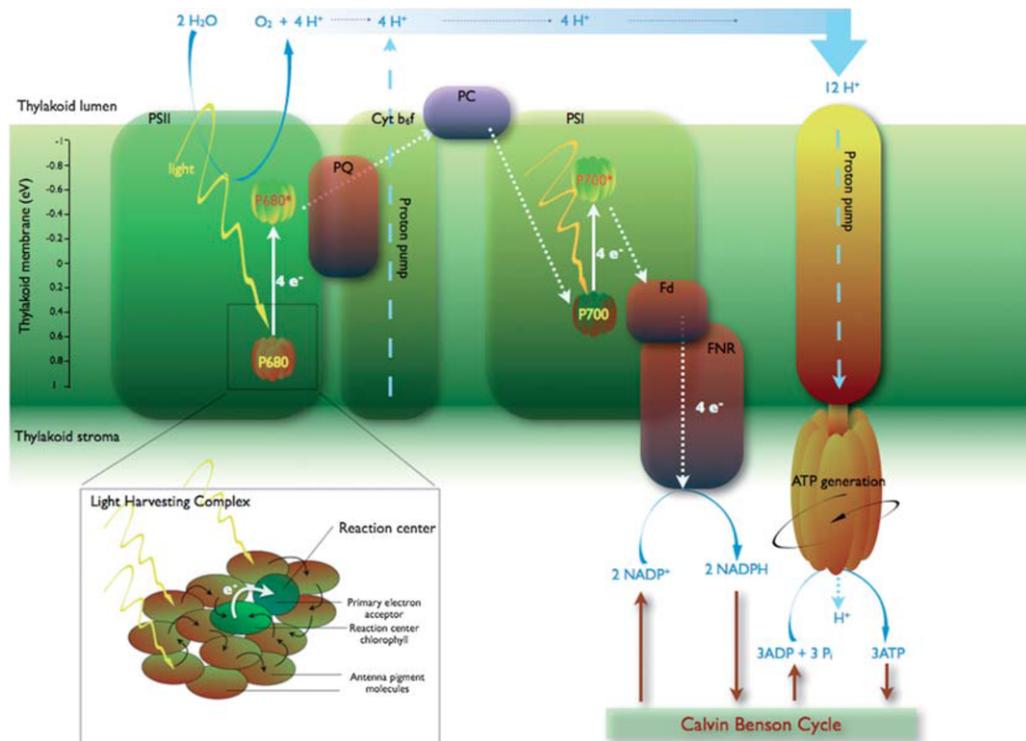


Figura 3: Illustrazione delle reazioni luce della fotosintesi (il cosiddetto schema a zeta)².

Le caratteristiche dei pigmenti fotosintetici di assorbire solo determinate lunghezze d'onda della radiazione luminosa e di riemettere in fluorescenza se irraggiati alle frequenze di eccitazione ne consente la loro individuazione con i metodi ottici e fluorimetrici per lo studio sulle efficienze di conversione dell'energia fotochimica di questi complessi cellulari eucarioti.

Gran parte dei fenomeni fluorescenti a temperatura ambiente ha origine dal fotosistema II (Genty et al., 1989) ed è caratterizzata da spettri di assorbimento costanti per quanto riguarda la clorofilla *a*. Per quanto riguarda invece i pigmenti accessori delle clorofille *b* e *c*, queste ampliano i segnali dello spettro con intensità diverse a seconda della radiazione luminosa disponibile.

Oltre alla qualità e disponibilità della radiazione luminosa, e la temperatura, la disponibilità dei nutrienti svolge un ruolo di cruciale importanza nella vita di questi microrganismi. Studi

² Le principali unità funzionali nei centri di reazione sono rappresentate come forme ovali fotosistema II (PSII), plastoquinone (PQ), plastocianina (PC), citocromo b6f complesso (Cyt b6f), fotosistema I (PSI), ferredossina (Fd), ferredossina NADP reductasi (FNR) (in ordine di elettroni catena di trasporto) e ATP sintasi. P680 e P700, si riferiscono ai centri di reazione del fotosistema II (PSII) e I (PSI), rispettivamente. L'inserito mostra uno schema del primo piano del complesso di raccolta della luce (LHC).

approfonditi sull'argomento hanno individuato particolari rapporti stechiometrici sulla combinazione degli elementi chimici essenziali allo svolgimento del ciclo vitale (N, P, K) che consentono di incrementare non solo le cinetiche di crescita, ma di ottenere profili biochimici cellulari ad alto contenuto energetico.

Ma tra questi elementi chimici ve ne sono altri essenziali (C, H, O, S, Mg, Ca, e metalli Fe, Cu, Zn) mentre ve ne sono altri, pure impiegati nelle funzioni metaboliche cellulari come il CO che se assenti non ne compromettono il regolare funzionamento.

Il rapporto atomico più citato per i principali elementi nel plancton è noto come rapporto di Redfield: 106 C: 263 H: 110 O: 16 N: 1 P: 0.7 S. (Sparber, 2006).

A seconda della loro biodisponibilità, il carbonio, l'azoto e il fosforo, l'idrogeno e all'ossigeno, formano le basi della sintesi delle macromolecole e del metabolismo energetico cellulare.

2.2.1 La morfologia

Dalle analisi in microscopia è emerso che una caratteristica della specie è quella di essere incline alla formazione di aggregati cellulari e questo è un fattore altamente limitante per i fenomeni di ombreggiamento cellulare.

La riduzione degli aggregati incrementa l'area superficiale delle singole cellule che può assorbire direttamente i fotoni di luce necessari ad attivare i propri sistemi fotosintetici, fenomeno drasticamente ridotto a causa dei fenomeni di ombreggiamento nel caso in cui le cellule si aggregano le une alle altre come spiegato meglio nel paragrafo 2.3.2.

È stata quindi eseguita un'analisi microscopica per determinare le caratteristiche morfologiche delle cellule di *S. obliquus* per paragonarle ai dati riportati in letteratura. Le alghe sono state inoltre caratterizzate dal punto di vista dimensionale elaborando le immagini digitali ottenute dalla microscopia ottica ed elettronica a trasmissione.

La morfologia rilevata al microscopio ottico (Figura 4) per la *S. obliquus* ha confermato quanto noto in letteratura, cioè che le cellule di tale specie presentano la forma di un ellissoide prolato, talvolta presente in forma di aggregazione di individui più o meno

numerosi. Negli aggregati sono state inoltre rilevate numerose cellule sferoidali di dimensioni generalmente inferiori, anch'esse riportate in letteratura (Burlew, 1953).

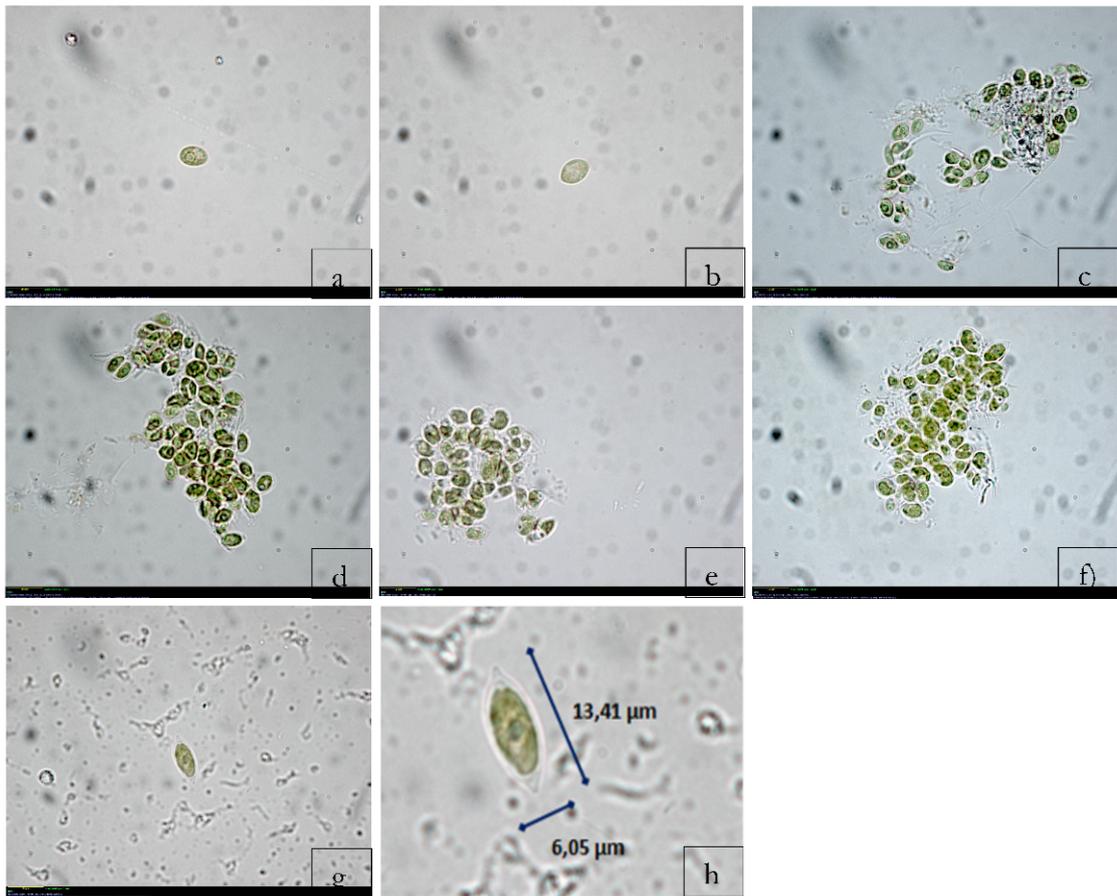


Figura 4: Fotografie di campioni di *S. obliquus* (coltura starter), acquisite per mezzo di un microscopio ottico a 1000 ingrandimenti (a-g). h, ulteriore ingrandimento dell'immagine g.

Nelle immagini in Figura 4 a, b, c e g si possono apprezzare le singole cellule presenti in sospensione, la cui morfologia è più evidente in l'igura 4h, ingrandimento dell'immagine 4 g. Le foto restanti (Figura 4 c, d, e, f) mostrano invece esempi di aggregati dove è possibile anche individuare una matrice extracellulare in accordo a quanto rilevato anche da altri autori (Xin et al., 2011; Liu et al., 2010).

Conoscendo l'ingrandimento utilizzato per le foto di microscopia ottica, è stato possibile dalla misura del numero di pixel risalire alle dimensioni delle cellule misurando asse maggiore e asse minore dell'ellisse.

Campione	n. cellule	Asse maggiore medio	Asse minore medio
1	35	4,7 ± 1,1	3,0 ± 0,9
2	91	4,5 ± 0,9	3,1 ± 0,8
3	246	4,6 ± 1,2	3,5 ± 0,9

Figura 3: Media della lunghezza degli assi maggiori e degli assi minori della *S. obliquus* misurata dalle immagini digitali di microscopia ottica a 1000 ingrandimenti.

Come si può vedere dalle dimensioni medie riportate in Tabella 2, l'asse maggiore misura mediamente 4,6 micron con una deviazione standard $\pm 1,06$ micron mentre l'asse minore, che nel caso delle cellule sferoidali rappresenta il diametro, misura 3,2 micron $\pm 0,87$ micron.

La conformazione cellulare osservata è stata perfettamente in accordo con un lavoro sulla Taxonomy e Filogeny of *S. Obliquus* di Hegewald, 1997, in cui la presenza di cenobi e quindi di associazione di uno o più individui di cellule microalgali relativi a questa specie può dipendere da vari fattori del microambiente, ivi incluse sostanze polimeriche di aggregazione.

Le attività successive sono state dedicate al perfezionamento di un protocollo sperimentale per la misura delle dimensioni delle alghe (singole cellule e aggregati) nelle sospensioni mediante analisi dimensionali. Tali analisi sono state eseguite con un Granulometro Laser Accusizer 780/AD Autodiluter e sono riportate nel paragrafo 3.3.3.2. Tale strumento conta e analizza le dimensioni delle particelle in una sospensione, utilizzando il sistema Single-Particle Optical Sensing (SPOS).

La tecnica di analisi Computational Fluid Dynamics (CFD) consente di studiare il comportamento fluidodinamico di superfici tridimensionali come quella della *Scenedesmus obliquus*: sferoide prolato, per mezzo delle simulazioni con specifici software. Basandosi su flussi laminari a geometria semplice quali sfere ecc., analizza le turbolenze generate nel fluido in cui gli oggetti esaminati si muovono. Ad esempio dall'analisi fluidodinamica computazionale di uno sferoide prolato³ di Figura 5 in cui il rapporto tra le due dimensioni è pari a 6:1 (diametri maggiore e minore) e stato ricostruito l'attrito, i contorni di pressione e la velocità delle sfere che attraversano i filetti fluidi che scorrono sulla superficie.

³ *Quentin Lux* CFD Analysis of a 6:1 Prolate Spheroid 2011 - Internship in the CFD IDEA research Chair at Polytechnique Montreal <http://www.behance.net/gallery/CFD-Analysis-of-a-61-Prolate-Spheroid/4739325>

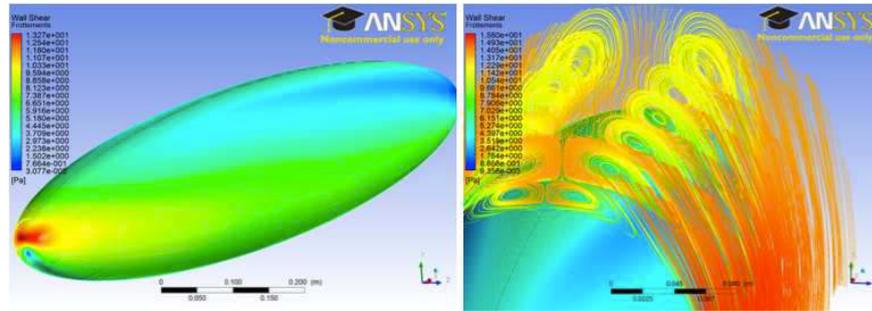


Figura 5: analisi fluidodinamica computazionale di uno sferoide prolato con il rapporto tra le due dimensioni pari a 6:1. Sono rappresentate le simulazioni sull'attrito, i contorni di pressione e la velocità delle sfere che attraversano i filetti fluidi che scorrono sulla superficie.

La visualizzazione di queste immagini ha messo in luce alcuni aspetti interessanti sulla morfologia delle cellule della *S. obliquus*. Ad esempio, la visualizzazione della disposizione dei filetti fluidi in corrispondenza delle due estremità dell'asse maggiore, determinano un attrito molto diverso da quello generato dal passaggio di una sfera nello stesso mezzo. A seconda delle forze di pressione presenti nel mezzo di coltura, questo profilo geometrico in taluni casi può favorire, a seconda delle inclinazioni istantanee una maggiore o minore superficie di contatto, essa stessa capace di generare spinte direzionali lungo la colonna d'acqua in cui queste microalghe sono libere di fluttuare, non essendo dotate di moto proprio.

Anche la formazione di cenobi di cellule di *S. obliquus* con tre o più individui potrebbe trovare una ragione d'essere nella possibilità offerta da questi fenomeni di aggregazione di far assumere a queste cellule profili geometrici che consentono di catturare particolari spinte direzionali e quindi di potersi spostare agevolmente nel fluido in cui sono immerse.

Dallo studio sulla deformazione di uno sferoide prolato (Figura 6) sotto l'azione di stress meccanico Yin et al., 2008 ricostruiscono quello che potrebbe ragionevolmente accadere sul comportamento dello sferoide prolato sotto l'azione di forze meccaniche e quindi delle modificazioni che potrebbe subire. Lo studio è stato condotto su vegetali e sulla morfogenesi ma, relativamente alle deformazioni dovute alle forze meccaniche, queste possono coinvolgere processi biochimici a livello profondo. Simulazioni del genere sono impiegate per studiare le interazioni tra forze meccaniche e processi biologici.

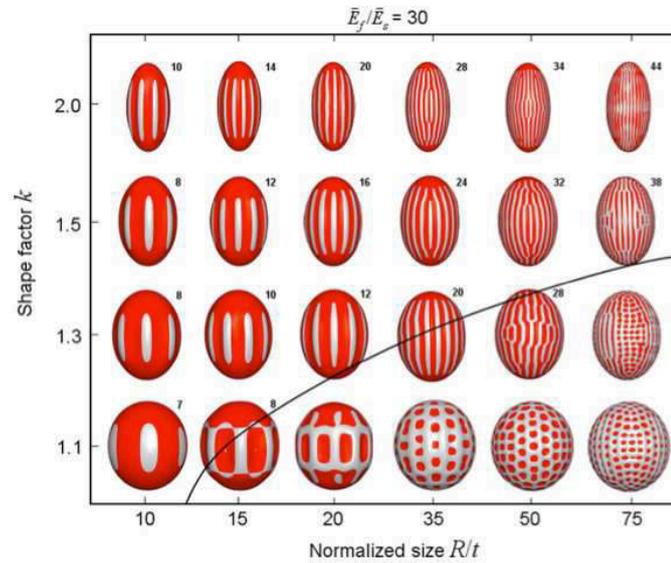


Figura 6: Mappa delle simulazioni sulle deformazioni di uno sferoide prolato sotto l'azione di forze esterne. Nelle zone concave di colore rosso, lo spostamento radiale assume un valore inferiore (Yin et al., 2008)

2.2.2 Caratteristiche reologiche della *Scenedesmus obliquus*

I dati di caratterizzazione della distribuzione morfologica – dimensionale contribuiscono senz'altro ad avere una conoscenza più approfondita sulle proprietà della singola cellula di *Scenedesmus obliquus* e sul comportamento degli aggregati cellulari.

La comprensione delle proprietà reologiche di questi complessi cellulari, quali la morfologia aggregata, consente di ottenere importanti conferme sulla validità del metodo acustico di consentire cinetiche di crescita cellulari con particelle disperse.

Comprendere il comportamento complessivo del fluido sotto l'effetto delle onde acustiche al fine di fornire un equilibrio ottimale alle particelle libere di muoversi nel microambiente è dunque di fondamentale importanza in questo lavoro di acustica applicata.

La polidispersione delle particelle determina la distribuzione granulometrica delle particelle.

Particelle che hanno una grande polispersione tendono ad assumere una stretta distribuzione. Ciò significa un'ampia distribuzione di particelle che consente più spazio libero di muoversi,

con una viscosità inferiore ed una maggiore penetrazione della luce, in presenza di un numero minore di aggregati cellulari.

Ammesso che si riesca a mantenere la dimensione delle particelle costante, introducendo nel sistema un numero sempre maggiore di particelle, il comportamento del flusso passerà generalmente da newtoniano (presenza di poche particelle che non interagiscono tra di loro) a un livello di shear maggiore in cui le particelle iniziano a interagire, ma le forze sono così piccole che assumono una certa rilevanza sotto l'effetto di perturbazioni meccaniche come quella che si vuole fornire con l'onda acustica. Cambierebbe quindi lo stress shear.

A causa della particolare morfologia, le cellule di *Scenedesmus obliquus*, nelle interazioni tra particelle, sembrerebbero non comportarsi come altre cellule a struttura sferica, in quanto la loro forma determina un particolare tipo di allineamento, che fa ridurre il gradiente della viscosità prodotto dalle forze di taglio.

Queste particelle allungate hanno quindi una maggiore possibilità di orientarsi nella direzione del flusso e consentono di mantenere un valore complessivo di viscosità inferiore rispetto alla dimensione sferica equivalente.

2.2.3 Le caratteristiche idrodinamiche della Scenedesmus obliquus

In un lavoro di Le et al., 2011 indirizzato a determinare il consumo di energia legata allo scorrimento della biomassa nei fotobioreattori tubolari, sono state studiate le proprietà idrodinamiche legate alle cinetiche di crescita e si è visto come il comportamento della *Scenedesmus obliquus*, all'aumentare della concentrazione cellulare, si comporta come un fluido Newtoniano.

Il consumo di energia, infatti, non sembra dipendere dalla concentrazione cellulare, ma dal comportamento del mezzo di coltura impiegato. Inoltre, la concentrazione di biomassa (espressa in densità delle cellule), conferma quanto è stato detto in precedenza (paragrafo 2.2.2) in merito ad una minore viscosità osservata anche alle più elevate concentrazioni di cellule.

2.3 Sedimentazione e turbolenza nella colonna d'acqua

I microorganismi fitoplanctonici, sono piccoli organismi che vivono sospesi nei mari, nei laghi e nei fiumi e quindi soggetti al trasporto passivo e al moto di mescolamento turbolento (Margalef, 1978; Pedley e Kessler, 1992; Lauga et Powers, 2009) prodotto dal vento, dalle onde e dalle correnti.

Le caratteristiche idrodinamiche di questi ambienti, regolano la distribuzione lungo la colonna d'acqua di questi microorganismi e dei composti organici e inorganici disciolti e in sospensione.

Anche la stratificazione termica gioca in tutto ciò un ruolo chiave e consente alle masse di acqua in movimento di creare delle zone (termoclino) con un particolare gradiente di temperatura che oltre a creare le condizioni ideali per alcuni di questi microorganismi, permette loro di rimanere sospesi e di fluttuare in balia delle correnti.

Questi microorganismi nel corso dei millenni si sono evoluti mettendo in atto sistemi diretti e indiretti che gli hanno permesso di vincere le resistenze idrodinamiche gravitazionali modificando la propria densità cellulare rispetto all'ambiente esterno accumulando nei vacuoli sostanze lipidiche o semplicemente ossigeno e altri gas presenti in atmosfera che gli consentono di risalire lungo la colonna d'acqua e di rimanere in sospensione.

Le microalghe che non sono dotate di moto proprio, hanno generalmente una densità maggiore di quella dell'acqua e per questo motivo affondano.

La morfologia in queste dinamiche assume un ruolo fondamentale e da essa dipende la velocità di sedimentazione che è direttamente proporzionale al quadrato del diametro della sfera e alla differenza tra la densità del mezzo e delle particelle in immersione e inversamente proporzionale alla viscosità del mezzo stesso (Reynolds, 1984).

Ad esempio una delle cause per le quali la microalga *S. obliquus* è incline a formare cenobi di tre, quattro individui potrebbe essere proprio questa. Un considerevole aumento del rapporto superficie/volume, determina un importante rallentamento nella velocità di sedimentazione.

Ma a tale proposito questi microorganismi mettono in campo anche altre soluzioni come quella di una minore densità nella composizione della parete cellulare sempre con lo scopo di assumere valori di densità inferiori a quelli dell'ambiente in cui si trovano a fluttuare, al fine di guadagnare una certa galleggibilità che gli consente di avvicinarsi alla superficie e quindi alla cattura della luce necessaria per l'attivazione dei processi di conversione fotochimica da cui questi microorganismi traggono energia per attivare i processi fotosintetici.

Anche la temperatura e l'illuminazione assumono un ruolo chiave nel metabolismo, nella crescita cellulare e nell'attivazione dei processi di conversione fotosintetica.

Per questo motivo si è ritenuto di approfondire le metodiche di agitazione delle colture cellulari che consentono una migliore penetrazione della luce negli strati più interni della coltura.

2.3.1 Scattering e ombreggiamento delle cellule

Nella Figura 7 (Mitra et al., 2008) è rappresentato l'assorbimento fotonico dai pigmenti cellulari in una coltura ad alta densità. Le singole cellule in sospensione nella parte sovrastante della coltura assorbono una quantità di luce in eccesso rispetto a quanta ne possono utilizzare nei processi fotosintetici, e attivano il processo di limitazione al trasporto elettronico dei fotoni (García-Camacho et al., 2012) dissipando calore, limitando la produttività della coltura.

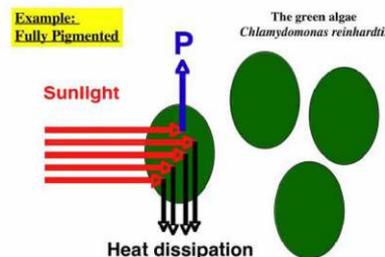


Figura 7: dissipazione termica del contenuto energetico della radiazione luminosa in eccesso.

A seconda della concentrazione di cellule microalgali, diminuisce la probabilità che il singolo raggio fotonico possa attraversare la coltura senza subire variazioni in quanto le cellule che istantaneamente si frappongono tra loro nel cammino ottico della luce provocano il fenomeno dell'ombreggiamento.

Una parte della radiazione luminosa che va a collidere con la superficie della cellula, può essere riflessa e questo fenomeno, in particolare per le cellule microalgali di *Spirulina* è stato stimato nel valore inferiore al 2% del totale della radiazione luminosa disponibile sulla coltura microalgale (Mitsunori, 1987).

2.3.2 Degasamento dell'ossigeno e fenomeni di adesione cellulare alle superfici con la formazione di colonie e biofilm cellulari

Le colture microalgali, durante la loro crescita scambiano con l'esterno ossigeno liberato dalle reazioni fotosintetiche di fissazione del carbonio. Per questo motivo, nella fase di progettazione dei fbr, si deve tenere conto dei fenomeni di biofotolisi diretta e occorre equipaggiarli di sistemi che possano consentire uno scambio continuo e agevole con l'esterno. In questo modo si evita la formazione di specie reattive dell'ossigeno che possono bloccare se non danneggiare le reazioni fotosintetiche.

In un lavoro di tesi di Irving, 2010 sono stati analizzati in particolare sulla *S. obliquus* i principali fattori che influenzano la formazione e lo sviluppo di biofilm microalgali. Questi fenomeni dipendono per grande misura dalle condizioni di sterilità e dalla presenza o meno di una o più specie microalgali in competizione tra loro. La capacità di produrre biofilm potrebbe dipendere anche dalla capacità del ceppo microalgale di produrre sostanze polimeriche extracellulari di aggregazione.

Altri fattori secondari quali la idrofobicità influenzano la formazione e lo sviluppo di biofilm di microalghe. In particolare su questo studio sono stati esaminati i diversi biofilm formati dalla *S. obliquus* su diversi materiali costituenti fbr, e senza dubbio la superficie di vetro è quella che risulta meno affetta da questa fenomenologia, particolarmente gravosa nelle coltivazioni industriali per la forte limitazione nella trasmissione della luce e per la propagazione di forme batteriche. Un elevato flusso e movimento delle colture microalgali previene la formazione di questi biofilm.

Queste considerazioni si sono rivelate preziose nella fase di progettazione della geometria del fotobioreattore e del sistema di agitazione, che come si vedrà più avanti, è stato opportunamente caratterizzato con uno studio sulla disposizione dei filetti fluidi e dei microvortici.

2.3.3 Stress meccanico tollerato dalle alghe e sistemi di agitazione

Il fotobioreattore accelera il metabolismo dei microorganismi mettendoli in agitazione, impedendo la stratificazione termica, aiutando la distribuzione dei nutrienti, favorendo lo scambio dei gas. È necessario conoscere a priori quanta agitazione serve, perché si rischia di danneggiare le alghe a causa delle forze di taglio. In un recente lavoro di Scarsella et al., 2011 è stata ribadita l'importanza di questo stress prodotto sulle microalghe.

Per le analisi e gli approfondimenti sugli impatti provocati da questo stress, sono state apprese in bibliografia le problematiche inerenti la circolazione dei fluidi nei fotobioreattori, i sistemi avanzati denominati airlift ed i fenomeni di flocculazione spontanea. E' stata valutata anche la possibilità di "estendere" gli esperimenti di acustica anche a matrici di cellule microalgali immobilizzate, al fine di studiarne il comportamento, nel tentativo di massimizzare l'efficienza e la velocità dei processi fotosintetici.

L'azione limitante delle forze di taglio è stata evidenziata con una coltura di *Scenedesmus quadricauda* (Hondzo et al., 1998) e con colture di *Phaeodactylum tricornutum* e *Porphyridium cruentum* (Mazzuca et al., 2005), in cui si è riscontrata inibizione della crescita cellulare dovuta alla movimentazione del terreno di coltura che causava una evidente distruzione cellulare.

La bioflocculazione spontanea, ovvero l'aggregazione spontanea di grandi fiocchi di cellule algali che si depositano sul fondo alla velocità proporzionale alla legge di Stokes, (Benemann et al., 2006), è promossa dalla formazione di polimeri aggregatori.

2.4 La meccanotrasduzione sulle cellule microalgali

In un recente lavoro di Hartmann et al., 2005, è stato studiato lo stress meccanico provocato sulle strutture cellulari di un lievito sottoposto ad elevata pressione idrostatica, mettendo in evidenza non solo le deformazioni strutturali di membrana, ma anche l'inattivazione di proteine di membrana e la trasmissione indotta di queste perturbazioni al doppio strato lipidico (Kilimann et al., 2005; Ulmer et al., 2002; Knorr, 2004).

Non si hanno informazioni sulle deformazioni della cellula vegetale, ma anche qui Hartmann et al., 2005 riconoscono come particolarmente sensibili a questi effetti le geometrie cellulari allungate delle cellule tipo *Scenedesmus obliquus* caratterizzata dalla forma geometrica di uno sferoide prolato. La forma astiforme di *E. coli* e di *P. aeruginosa* sembrano essere più sensibili all'applicazione di pressione idrostatica. Ciò darebbe ulteriore conferma alle precedenti osservazioni relative alla particolare morfologia della *Scenedesmus obliquus* e alle particolari caratteristiche reologiche e di viscosità.

In un'interessante lavoro Miyoshi, 1972, descrive le proprietà meccaniche della parete cellulare della microalga *Chlorella* una sotto l'effetto di suoni ad alta frequenza, determinandone l'attenuazione e le caratteristiche di viscosità e il rapporto di compressione della parete cellulare. Un altro interessante modello è stato prodotto da Krasovitski et al., 2011 per chiarire gli effetti indotti da una bolla di gas sferica in un campo di ultrasuoni che pulsa costantemente su di una parete cellulare.

2.5 Le caratteristiche spettrali della luce

Nella conversione fotochimica dell'energia luminosa, le microalghe sfruttano una porzione limitata rispetto allo spettro elettromagnetico della radiazione solare (Figura 8), intervallo compreso nello spettro di assorbimento delle lunghezze d'onda λ [nm], da 400 a 700 nm detto PAR (Photosynthetically Active Radiation).

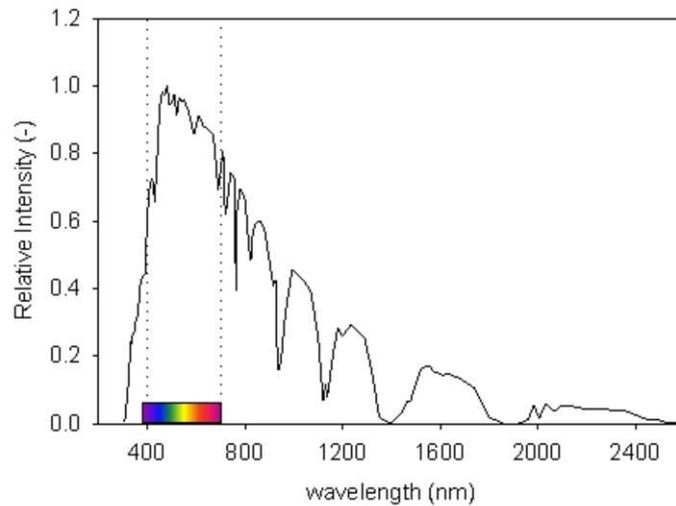


Figura 8: La PAR costituisce una piccola zona dello spettro delle lunghezze d'onda della luce solare.

Ma, come si vedrà in seguito, è abbastanza agevole riprodurre artificialmente le lunghezze d'onda comprese in questo intervallo, con la possibilità di poter incrementare le radiazioni nel blu e nel rosso con i valori massimi di intensità in corrispondenza delle lunghezze d'onda di 430 e 680 nm in cui si ha il massimo assorbimento da parte dei fotosistemi I e II.

Come si vede in Figura 9 le bande maggiormente interessate sono quelle del blu e del rosso.

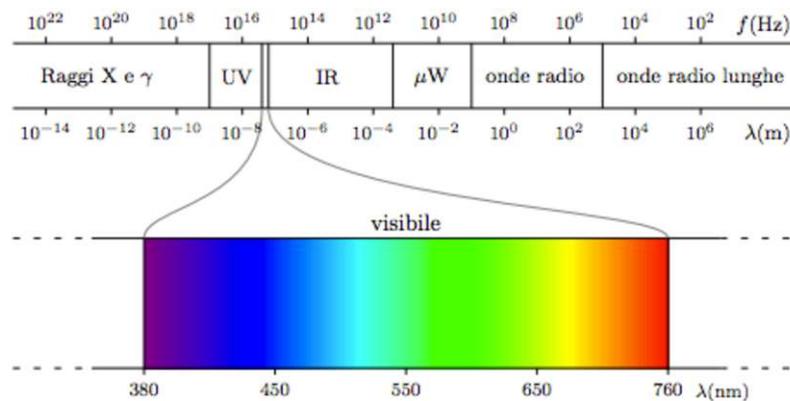


Figura 9: Spettro elettromagnetico e range nel visibile.

Nella scelta delle fonti artificiali di illuminazione, devono però essere considerati i parametri di dissipazione termica del calore prodotto dalle lampade, e quindi della loro distanza dalle colture microalgali e dell'intensità della radiazione luminosa per evitare di generare gli effetti della fotoprotezione.

Sistemi sempre più tecnologici prevedono poi l'impiego di fonti artificiali a luce pulsata e trasmessa con fibra ottica per allontanare sempre più la fonte luminosa e limitare quindi il trasferimento e la dissipazione del calore.

2.6 Il Suono e le Onde acustiche

Il suono è una componente fondamentale che avvolge il nostro pianeta dalle profondità marine, alle cavità del sottosuolo e nell'atmosfera. Con livelli energetici inferiori è presente nei legami intermolecolari i quali hanno proprie caratteristiche e frequenze di risonanza. In natura quindi anche a livello di materia infinitesimale il suono è un mezzo di trasporto di informazioni.

Un tipico esempio ricorrente di propagazione del suono è il sasso gettato sul pelo d'acqua di uno stagno in quiete. Subito dopo l'impatto, si osservano infatti una serie di onde concentriche (Figura 10) che dal punto di collisione si propagano radialmente verso l'esterno, formando cerchi concentrici.

Sembrerebbe ovvio pensare ad un trasporto di materia, ma non è esattamente così. Il suono si propaga per contiguità tra le molecole. In pratica ognuna di esse, spinge quella accanto. Un po' come accade nel gioco del biliardo quando una volta impressa una forza ad una palla, questa nelle collisioni con altre palle imprime loro una quantità di moto, dissipando parte della propria energia cinetica, e così le une con le altre.

Per avere una prima idea sul numero degli impatti con cui queste molecole si avvicinano e si allontanano, definiamo questa periodicità con il termine: frequenza.

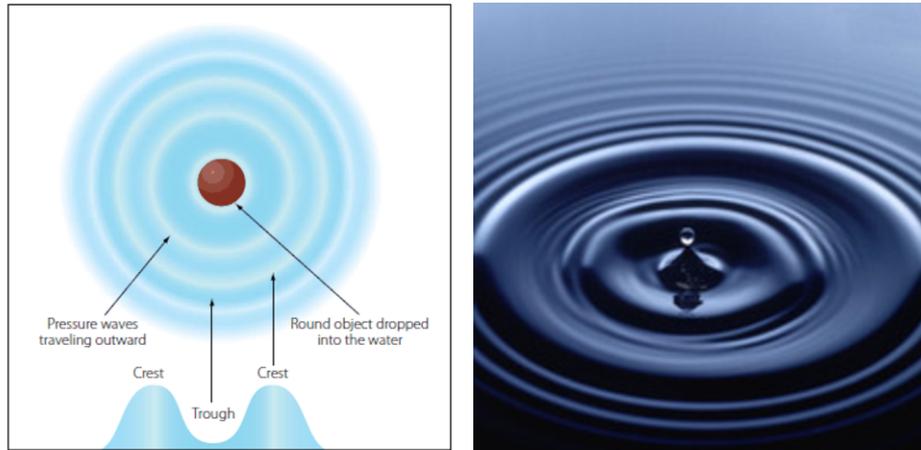


Figura 10: Diffusione delle Onde di pressione a partire dalla perturbazione centrale verso l'esterno con anelli concentrici in cui le creste rappresentano le onde di max pressione (Crest) e gli avvallamenti (Trough) le zone di depressione. (foto tratta da: http://www.openfisica.com/fisica_ipertesto/openfisica3/lambda.php)

Il suono viaggia attraverso la materia in forma di moti ondosi longitudinali. Queste onde sono chiamate onde longitudinali perché le particelle del mezzo vibrano avanti e indietro longitudinalmente nella direzione di propagazione.

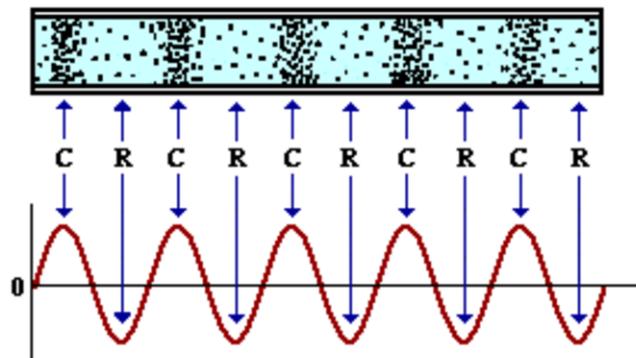


Figura 11: Nella propagazione di un suono si generano onde di compressione (C) e rarefazione (R) con una oscillazione della particelle attorno ad un punto di equilibrio che consente il trasferimento di energia innescando un moto ondulatorio senza il trasferimento di massa.

Nel tubo cavo rappresentato nella Figura 11, un pistone posto all'estremità aperta del tubo (alla sua sinistra), viene fatto scorrere con moto alternativo avanti e indietro. Di conseguenza le particelle immediatamente adiacenti alla superficie interna del pistone, trasmettono la quantità di moto (energia) a quelle accanto provocando un'oscillazione avanti e indietro, e

nella direzione destra e sinistra. Istantaneamente ci saranno quindi particelle che una volta ricevuta una quantità di moto assumeranno una propria velocità vettoriale ben definita.

Ci sono poi alcune particelle che istantaneamente vanno a posizionarsi in un punto chiamato nodo, in cui l'ampiezza dello spostamento è sempre pari a zero.

In realtà, il nodo è una linea o un piano che si estende attraverso l'intera sezione trasversale del tubo. In quel punto le particelle tenderanno a spostarsi a destra e a sinistra di esso pur di sfuggire a tale conformazione. Le particelle che muovendosi verso il nodo, diventano più vicine tra loro determinano un aumento della densità e provocano una compressione. Al contrario, muovendosi verso l'esterno, la densità delle particelle diminuisce e si ha la rarefazione.

Nel movimento oscillatorio del trasporto di energia tra le molecole adiacenti, nell'unità di tempo si osservano diverse configurazioni di compressione e rarefazione. La trasmissione di questa energia sonora è dunque assimilabile ad una variazione di pressione che si propaga in un mezzo fisico elastico, come l'aria o l'acqua. La propagazione di un'onda acustica è un meccanismo in cui si ha il trasporto di energia meccanica. Essa dipende dal modulo di compressione K , espresso in Pascal (Pa) e descrive, a livello macroscopico, la forza dei legami intermolecolari nel mezzo ed è inversamente proporzionale alla sua densità espressa in Kg/m^3 .

2.6.2 Le grandezze fisiche del suono

La frequenza assimilabile al numero di cicli per secondo di azioni di compressione e rarefazione nel moto alternativo compiuto dalle molecole che oscillano intorno ad un proprio asse ipotetico, trasferendo queste piccole quantità di moto, ovvero trasmettendo le proprie informazioni alle molecole vicine, rendendo così possibile la trasmissione del suono a questo punto univocamente determinato nei suoi caratteristici parametri di frequenza e intensità, ovvero il valore di energia da trasferire. Vedremo quindi come questi due parametri sono correlati e che le basse frequenze riescono a percorrere un maggiore tragitto rispetto a ciò che accade per le alte frequenze.

La frequenza (f) è dunque pari al numero di cicli (oscillazioni) che avvengono nell'unità di tempo. Poiché il tempo che un'onda impiega per compiere un ciclo completo si chiama periodo (T)

vale la relazione:

$$f = \frac{1}{T}$$

La frequenza si misura in Hertz e multipli di esso KHz e MHz.

Ma a questo punto, visto che la trasmissione del suono dipende essenzialmente dalla coesione tra le molecole si può facilmente intuire come nei vari stati della materia ciò accada in maniera diversa. Ad esempio i gas, che sono allo stato aeriforme sono cattivi conduttori di questi segnali sonori a causa della distanza tra le molecole.

Nel mezzo acqua, la velocità di trasmissione viene triplicata. Nel vetro e in altri mezzi in cui la materia assume un'elevata densità molecolare, a condizione che questa abbia particolari strutture, il suono si trasmette a velocità ancora superiori.

Il fenomeno del suono è rappresentato quindi da un trasferimento di energia che determina variazioni estremamente piccole nei parametri di densità, pressione e temperatura rispetto ai valori medi misurabili in sua assenza.

La velocità con cui una perturbazione sonora si trasmette in un fluido dipende da alcune caratteristiche intrinseche dello stesso mezzo. La proprietà elastica associata ad un fluido, al momento della perturbazione sonora, determina il trasferimento energetico tra le molecole con una deformazione volumetrica istantanea che è proporzionale alla variazione di pressione che si è determinata nel punto di contatto e che quindi si trasmette per contiguità nel mezzo.

La velocità di propagazione dell'onda (velocità acustica v) rappresenta lo spazio percorso dal fronte d'onda nell'unità di tempo; normalmente è espressa in metri/secondo e nei riguardi dei vari materiali è ben definita per ciascun tipo di onda. La velocità di propagazione dipende solo dalle costanti elastiche e dalla densità del materiale ed è indipendente dalla frequenza.

La velocità di propagazione si calcola come:

$$v = \sqrt{\frac{E}{\rho}}$$

dove E è il modulo elastico del materiale e ρ è la densità.

L'impedenza acustica caratteristica (Z) è un parametro relativo alla propagazione delle onde elastiche nei mezzi omogenei, dipendente soltanto dalle caratteristiche del mezzo stesso.

$$Z = \rho v$$

dove ρ è la densità del mezzo e v la velocità acustica nel mezzo.

E' sempre stato oggetto di studi e curiosità l'interazione dei suoni sulle piante e sugli organismi vegetali, talvolta con rappresentazioni avveniristiche e prive di fondamento scientifico. Piante superiori che crescono con i suoni, ma poi approfondendo l'argomento si comprende che non si tratta di una influenza diretta sulla crescita delle piante, ma più semplicemente in un'azione di disturbo alla comunicazione sonora tra gli organismi predatori che, disorientati, non sono in grado di comunicare tra loro. L'azione di disturbo impedisce la formazione di pericolose colonie e rende libere le piante da questi solerti attacchi riuscendo così a mantenere più a lungo una vegetazione più rigogliosa.

Ma a livello di colture batteriche, lieviti e alghe sono state individuate correlazioni positive sull'incremento delle loro cinetiche di crescita sotto l'effetto di stimolazioni acustiche.

2.6.3 Le misure del suono

Nei controlli sulle emissioni sonore generalmente non si eseguono misure assolute, ma solo dei raffronti tra il segnale attuale e un segnale di riferimento di dato livello (in pratica si confrontano fra loro le ampiezze di due echi); poiché tali rapporti sono suscettibili di variare da 1 a 100.000, usualmente si ricorre all'espressione della misura in decibel (dB)

Il decibel (dB), esprime il rapporto fra due potenze su scala logaritmica con base 10. Tipicamente si ricorre all'utilizzo della scala logaritmica per esprimere grandezze i cui valori si distribuiscono su intervalli molto estesi, ma la motivazione per la quale viene usata in acustica, consiste nel fatto che presenta un andamento più prossimo a quello delle scale percettive.

Si definisce livello di pressione (Pressure Level) il logaritmo del rapporto tra la pressione misurata e una pressione di riferimento p_{ref} :

$$PL = 20 \log_{10} \frac{p}{p_{ref}}$$

dove si fa implicitamente riferimento alla pressione efficace.

Per le misure in acqua, l'unità di misura ottenuta dopo una serie di conversioni che tengono conto della temperatura e delle caratteristiche del mezzo è il dB re 1 mPa.

2.6.4 L'idrofono

Gli idrofoni sono sensori che rilevano segnali acustici, e vibrazioni in genere, in acqua e altri fluidi. Sono, in sostanza, microfoni subacquei. Sono costruiti con materiali piezoelettrici, sferici, cilindrici o piatti, preamplificati o non preamplificati, generalmente incapsulati in resina poliuretana o in altro isolante, adatti a funzionare immersi in un fluido, a pressioni che possono arrivare a oltre 100 bar.

Nel campo dello studio e della tutela dell'ambiente, gli idrofoni vengono utilizzati anche per valutare la quantità di rumore (e a volte anche di fluidi) che le attività dell'uomo scaricano in mare, nei fiumi o nei laghi. Questo rumore può avere effetti nocivi non solo sui mammiferi marini, ma anche su altre forme di vita.

Negli studi faunistici e zoologici, oltre che per rilevare le vocalizzazioni dei Cetacei, gli idrofoni vengono utilizzati per ricevere e identificare i segnali prodotti da Anfibi e Pesci.

2.6.5 L'attuatore acustico

Il trasduttore acustico, così come l'altoparlante, sfruttando gli effetti della piezoelettricità tra due materiali particolari, produce una deformazione meccanica istantanea, proporzionale al quadrato del campo elettrico applicato. Queste deformazioni sono molto piccole nei dielettrici ordinari, divengono invece apprezzabili nelle ceramiche di titanato di bario. Le ceramiche sono ottenute macinando insieme cristalli di titanato di bario con altri sali e portando il composto ad una temperatura di $1300 \div 1400$ °C.

2.7 La velocità del suono nei diversi mezzi

Come detto la velocità del suono è la velocità di propagazione delle onde sonore attraverso un dato mezzo. Tale velocità non deve essere confusa con la velocità media di traslazione v delle particelle a cavallo dell'onda sonora, che dipende dalla potenza sonora della sorgente.

La velocità con la quale un suono si propaga dipende dalla natura del mezzo e non dalle caratteristiche del suono. E' stato sperimentalmente provato che essa aumenta al crescere

della temperatura e all'aumentare della densità. In particolare, i valori trovati per la velocità del suono nei mezzi con caratteristiche fisiche diverse quali l'aria, l'acqua e l'acciaio sono i seguenti:

- in aria a 20° C $v=340\text{m/s}$
- in acqua a 20°C $v=1480\text{m/s}$
- nell'acciaio a 20°C $v=5980\text{m/s}$

Le equazioni secondo cui la velocità del suono varia al variare della temperatura sono:

- $v(\text{aria}) = 340\text{m/s} + 0,6T$
- $v(\text{acqua}) = 1480\text{ m/s} + 4,2 T$

Le perturbazioni, se il mezzo di propagazione è un solido, possono essere longitudinali e trasversali. Se in un mezzo coesistono entrambi le perturbazioni, allora la velocità delle onde longitudinali è superiore a quella di propagazione dell'onda trasversale.

In generale, la velocità con cui una perturbazione si propaga, dipende dai parametri elastici del mezzo di propagazione in quanto è proprio dal gioco di deformazione e reazione elastica che trae origine il meccanismo della propagazione.

2.7.1 le Onde acustiche in acqua

Per descrivere come le onde acustiche si trasmettono in acqua occorre stabilire una relazione tra la pressione e la densità . Questa relazione è detta equazione di stato. In generale, ci si riferisce a tre grandezze fisiche: la pressione, la densità del fluido e la sua temperatura assoluta.

A parte rare eccezioni può assumersi che l'alternarsi di compressioni e rarefazioni nel mezzo si susseguono talmente rapidamente da non consentire scambio termico tra le molecole adiacenti.

La variazione di temperatura però ha effetto sulla densità del mezzo: un aumento di temperatura, infatti, produce l'espansione del volume d'acqua e, di conseguenza, la diminuzione della densità. Se la temperatura diminuisce la densità, al contrario, aumenta allontanandosi dalla superficie.

Di conseguenza, gli strati superficiali sono meno densi, e quindi più leggeri, degli strati sottostanti e si generano moti convettivi incontrollabili. Per questo motivo, in ragione alle

applicazioni sonore delle onde acustiche in questo progetto di ricerca, particolare attenzione è stata posta a questa fenomenologia di distribuzione della temperatura nei fotobioreattori.

L'assenza di moti convettivi si traduce in un valore positivo della stabilità, grandezza che rappresenta la misura del lavoro necessario per spostare una particella d'acqua verticalmente, in direzione della superficie.

2.7.2 Intensità e densità di energia

Le particelle che trasportano un'onda sonora hanno un contenuto di energia per unità di volume che si chiama appunto densità di energia. Poiché nel caso studio, l'onda viaggia attraverso il medium, (terreno di coltura in cui sono presenti le microalghe), trasporta con se l'energia contenuta in esso. Questo flusso di energia è caratterizzato dall'intensità del suono, a volte chiamato anche densità del flusso di energia.

2.7.3 Trasmissione del suono nei tubi

Solitamente, il campo sonoro di un'onda che si propaga in un fluido non viene disturbato dalle superfici rigide disposte parallelamente alla direzione di propagazione del suono. Ciò accade a causa della trasmissione delle onde longitudinali.

Le particelle immerse nel fluido vibrano e trasmettono il moto le une alle altre nella direzione di propagazione scorrendo tra le pareti e senza alcuna interferenza.

L'unica porzione di tubo che partecipa al fenomeno trasmissivo delle onde acustiche è il sottile strato limite di contatto della struttura interna di scorrimento del tubo, dove le particelle nel loro propagarsi ricevono una leggera attenuazione di segnale dovuto ad un incremento dell'attrito che causa quindi una perdita di energia sonora.

Come si vedrà più avanti, questo strato limite è fortemente influenzato dal gradiente di temperatura che amplifica questo effetto di attenuazione.

2.7.4 Cinematica e particle motions

La cinematica è lo studio della geometria del movimento delle particelle senza alcun riguardo alle cause che lo hanno generato.

L'analisi cinematica è lo studio della distribuzione delle velocità vettoriali istantanee delle particelle di un fluido.

I tassi di cambio di velocità delle particelle sono legati alle forze totali che agiscono su di loro in conformità con la seconda legge del moto di Newton.

Anche se le forze viscosse possono significativamente influenzare il movimento fluido molto vicino a superfici solide, e anche dissipare energia sonora in calore durante la propagazione del suono.

Come visto in precedenza, il movimento di traslazione delle molecole è alla base della relazione che lega la temperatura alla pressione che agisce nel punto considerato, dove si verifica la collisione tra le particelle.

Quando però su una superficie si verifica lo scorrimento tra le molecole a velocità diverse si ha una discontinuità nel moto tangenziale in cui l'equilibrio di pressione esiste ancora, ma le molecole passando attraverso la superficie dal flusso a velocità più elevata vanno a collidere con altre molecole del fluido si muovono più lentamente.

Queste collisioni, trasferiscono un maggiore slancio con uno spostamento diretto nella direzione opposta. Alle basse velocità questo fenomeno diviene autoadattativo per il sistema, ma a velocità superiori si determinano moti turbolenti incontrollati con particolari sforzi di taglio meglio definiti come viscosità.

In un liquido queste forze attrattive e repulsive, in parte incrementate dall'attrazione molecolare sono indebolite dall'aumento di temperatura.

In un lavoro di Leckey et Hinders, 2011 è stata meglio illustrata l'importanza degli effetti viscosi sulle manipolazioni acustiche di cellule algali.

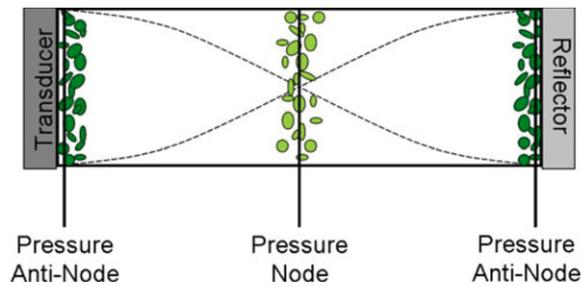


Figura 12: Effetti viscosi sulla manipolazione delle cellule microalgali. Particolare del posizionamento assunto nello spazio acustico dalle microalghe spinte verso un nodo di pressione acustica.

Con l'impiego di particolari fasci di onde acustiche focalizzate è possibile far orientare in un volume noto piccole cellule come in Figura 12 e sfruttare questi principi ad esempio per la raccolta delle microalghe con costi energetici davvero ridotti. Le microalghe manipolate acusticamente, seguiranno le linee di forza del campo acustico disponendosi lungo le direttrici dei relativi nodi di pressione e di rarefazione (antinodi) nella foto generati con un trasduttore e un riflettore posti in posizione diametralmente opposta.

2.7.5 *Attenuazione del suono nei liquidi*

In acqua la componente molecolare ha una tendenza alla associazione per formare complessi più grandi con carattere di polarità che favorisce un certo ordine un po' come accade nel vetro.

La costante di attenuazione è tipicamente pari da due a tre volte il valore classico e un coefficiente di temperatura negativo. L'ordine molecolare determina quindi la densità e la disposizione delle molecole. Per questo motivo, nella trasmissione di un'onda di pressione l'acqua risponde a questa perturbazione dovuta a fasi di compressione e rarefazione con una riorganizzazione della struttura del liquido. Il fenomeno di adattamento, seppure estremamente veloce, ha un suo tempo di realizzazione che si può osservare nello shift sulle frequenze di attenuazione, quale risposta del riarrangiamento molecolare che comporta tale assorbimento di energia.

Questo fenomeno si complica in presenza dei gas. Ad esempio in aria questo rilassamento è prodotto dalla componente vibrazionale delle molecole di Ossigeno e di Azoto. Ma ancora più sensibile è l'effetto della presenza di aria disciolta in acqua. Per questo motivo, l'attenuazione del suono in aria mostra effetti marcati in presenza di umidità.

Anche il diverso rapporto nella composizione dei sali disciolti in acqua determina delle diverse risposte in attenuazione, un po' come accade nel mare a diverse profondità.

Nelle applicazioni qui proposte, nell'intervallo tra 5 e 30 kHz, l'attenuazione è in ogni caso davvero moderata e la risoluzione resta ancora sufficiente.

2.7.6 Propagazione del suono nelle colture microalgali

Dopo aver illustrato le differenze nella struttura molecole nei vari stati della materia, può assumersi che la sua velocità e propagazione dipenderà dall'interazione tra inerzia e sollecitazioni elastiche prodotte dalle caratteristiche dell'acqua e dei sali disciolti oltre che da quelle idrodinamiche e volumetrico ceppo microalgale presente.

In un recente lavoro (Le et al., 2011) sono state studiate le proprietà idrodinamiche legate alle cinetiche di crescita e si è visto come il comportamento della *Scenedesmus obliquus*, all'aumentare della concentrazione del numero di cells/mL, si comporta come un fluido Newtoniano, in particolare il predetto studio era indirizzato a determinare il consumo di energia legata allo scorrimento della biomassa nei fotobioreattori tubolari.

Si è visto come il consumo di energia non sembra dipendere dalle concentrazioni della popolazione cellulare, ma in definitiva dal comportamento del mezzo di coltura impiegato.

L'acqua essendo meno comprimibile di un gas, a causa della relativa vicinanza delle molecole, ha un suo determinato modulo di massa frutto delle azioni di repulsione intermolecolare e che a sua volta dipende dalle caratteristiche chimico fisiche pressione idrostatica e temperatura, oltre che dalla quantità di sali disciolti.

La presenza di sali disciolti in soluzione aumenta leggermente la velocità del suono in acqua. Alla luce di ciò in questa ricerca di acustica applicata, era assolutamente necessario eliminare qualsiasi perturbazione al mezzo di coltura ivi incluso far fluire gas quali O₂ o CO₂ e limitando quindi la presenza unicamente all'ossigeno molecolare prodotto dalle microalghe che in qualche modo bisognava far defluire fuori dal fbr per evitare la formazione di specie reattive dell'ossigeno che avrebbero potuto fermare la crescita e i processi fotosintetici delle microalghe.

Materiali e Metodi

3.1 Disegno Sperimentale per la preparazione dei terreni di coltura, le colture di mantenimento e gli inoculi starter

Le microalghe *Scenedesmus obliquus* sp., impiegate in questa sperimentazione, sono state acquistate insieme al protocollo sperimentale e ai sali in stock necessari per la preparazione dei terreni di coltura dallo Spin off dell'Università di Tor Vergata "Algaes".

In fase di progettazione degli esperimenti, è stata concordata con i laboratori Algaes la concentrazione di sali, vitamine e oligoelementi necessari nel terreno affinché quest'ultimo fosse sufficientemente arricchito e adeguato alla durata delle repliche sperimentali da eseguirsi con le colture cresciute in fotobioreattori in batch.

3.1.1 Preparazione del terreno di coltura BG11 modificato e sua sterilizzazione.

Il terreno di coltura impiegato nelle attività sperimentali, BG11 modificato, è un terreno minerale specifico per la crescita di cianobatteri e microalghe (Stainer et al., 1971; Guzzon et al., 2005). Per la preparazione del terreno, le soluzioni stock, direttamente preparate dallo Spin-off Algaes, sono state gestite con le indicazioni fornite nel Protocollo Sperimentale Algaes da cui è stata tratta la Tabella 1.

Stock	Sale	[Stock] g L ⁻¹	Aggiunta mL L ⁻¹	Elementi
1	NaNO ₃	150	1	N
2	KH ₂ PO ₄	16	1	P
3	K ₂ HPO ₄	17	1	P
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	36	1	Ca
5	Acido Citrico	6	1	C
6	FeCl ₃ ·6H ₂ O	6	1	Fe
7	EDTA-Na ₂	6	1	
8	NaHCO ₃	16	1	C (inorg)
9	Oligoelementi		1	
	H ₃ BO ₃	2,86		B
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81		Mn
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22		Zn
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,39		Mo
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08		Cu
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,05		Co
10	Vitamine		1	
	Cyanocobalamina (vit B12)	0,04		
	Tiamina HCL (vit B1)	0,04		
	Biotina (vit H)	0,04		
11	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	57	1	Si

Tabella 1: Formulazioni delle 11 soluzioni stock utilizzate per la preparazione del terreno di coltura BG11 modificato, tratto dal Protocollo Algarès.

Le 11 soluzioni stock costituenti il terreno di coltura sono state quindi così impiegate nella preparazione dei terreni, con le modalità di sterilizzazione di seguito indicate.

Nella preparazione dei terreni, sia per le colture di mantenimento che per le attività sperimentali con i 12 fbr e per tutte le operazioni routinarie di laboratorio (lavaggi di contenitori e provette, diluizioni ecc.) e dove non altrimenti specificato è stata utilizzata “acqua Milli-Q” preparata col sistema Milli-RO/Milli-Q (Millipore, Milano, Italia), con una resistività pari a 18 microOhm.

Tutte le soluzioni stock dei sali e dei complessi vitaminici sono stati microfiltrati con filtro Mdl Syringe Filter Type SY25NN Nylon Pore 0,2 um, diametro 25 mm, e trattate come da protocollo fornito per la metodica di realizzazione del BG11 modificato.

I contenitori utilizzati per lo stoccaggio, la conservazione e l'estrazione dei campioni e delle soluzioni erano in vetro Pyrex e polietilene e prima dell'uso sono stati preventivamente lavati e sterilizzati con la medesima procedura impiegata per la sterilizzazione sotto riportata dei fbr.

Per i prelievi di aliquote di soluzioni sono state utilizzate pipette in vetro; nel caso di volumi ridotti sono state utilizzate micropipette Gilson (20-1000 µl).

In una bottiglia di vetro pyrex è stata riempita con 9.890 mL di acqua milli-Q cui a cui è stato in seguito aggiunto 1 mL di ciascuna delle 10 soluzioni stock. Tale soluzione è stata tenuta in autoclave per 40 minuti a 121 °C.

Dopo raffreddamento, sono state aggiunte le vitamine filtrate (1 mL di soluzione stock per ogni litro di terreno) filtrate con siringa e filtro con pori da 0,2 micron e misurato il pH del terreno di coltura che è risultato essere pari al valore di 7,5, come da protocollo Algarès.

In seguito 3,7 L di ciascun terreno sterilizzato sono stati versati in ciascuno dei 12 fbr, preventivamente lavati con acqua e sapone, risciacquati con abbondante acqua ultra pura, ed infine trattati con etanolo al 70 %, per eliminare la carica batterica.

Prima dell'aggiunta del terreno di coltura, i fbr sono stati sciacquati con 400 mL di terreno di coltura sterile al fine di eliminare eventuali tracce di etanolo e successivamente ciascun fbr è stato riempito con 3,7 L di terreno di coltura sterile a cui sono stati aggiunti 300 mL della coltura starter per un volume complessivo pari a 4 L ed una altezza di livello in ciascun tubo pari a 68 cm.

Le misure di pH sono state eseguite con pHmetro digitale della Hanna Instruments Microprocessor-based pH/mV/°C Bench Meters mod 210.

3.1.2 Preparazione degli inoculi starter e delle colture di mantenimento

Sono stati preparati 2 L di terreno di coltura (vedi paragrafo 3.1.1) e prelevati, in condizioni sterili sotto una cappa ventilata, con guanti e becco bunsen acceso circa 100 mL dell'inoculo, che sono stati inseriti in una fiasca ventilata dalla capienza di 750 mL a cui sono stati aggiunti circa 400 mL di terreno sterilizzato.

La coltura così preparata è stata monitorata attraverso la costruzione di curve di crescita secondo le indicazioni riportate al punto 3.1.4.

Quando la curva di crescita raggiungeva la fase stazionaria (fase che segue lo stadio di crescita esponenziale), la soluzione di crescita veniva nuovamente smistata per la preparazione di sub-colture atte al mantenimento della specie per tutta la durata degli esperimenti.

Allo stesso modo, ulteriori aliquote di terreno sono state preparate ed impiegate per le colture di mantenimento che sono state gestite in due diversi laboratori: il laboratorio di fisiologia delle alghe del Prof. Mario Giordano e della Dott.ssa Alessandra Norici dell'Università Politecnica delle Marche e la società Ambios di Corciano (PG) dell'Ing. Giancarlo Strani e della Dott.ssa Vincenza Nardicchi, che hanno monitorato le fasi di crescita e realizzato le sub colture di mantenimento al raggiungimento della fase di crescita stazionaria.

Le colture sono state cresciute in camera acclimatata alla temperatura di 22 °C circa con una illuminazione a fotoperiodo 14 h luce – 10 ore buio, ad una intensità di illuminazione artificiale pari a 25 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Sono state prelevate con cadenza bisettimanale un' aliquota di 10 mL da ciascuna bottiglia, ed è stata monitorata la crescita con la camera burker e microscopio ottico. Solo successivamente è stato impiegato il contacellule automatico per la sua rapidità e affidabilità nelle misure.

Le colture sono state mantenute in fase esponenziale, operando diluizioni con rabbocchi di terreno di coltura fresco in modo da ottenere un volume idoneo per l'inoculo pari a 3,600 L di coltura microalgale per ciascuna sessione sperimentale (300 mL x 12 fbr = 3,6 L).

3.1.3 Inoculo microalgale nei fbr per l'avvio delle attività sperimentali

Con le procedure di mantenimento delle colture starter in camera acclimatata, prima dell'inizio di ciascuna replica sperimentale come descritto nel paragrafo 3.1.2, sono state prelevate aliquote pari al volume di 300 mL di microalghe, mantenute in fase esponenziale, misurando con il contacellule Scepter il numero di cellule presenti per mL e operando diluizioni con terreno di coltura fresco per riportare il valore della concentrazione di cellule a volume (4 L) pari a circa 5×10^5 cells/mL.

Nella fase di avvio di ciascun esperimento, dopo aver introdotto un volume di terreno di coltura pari a 3,7 L in ciascun fbr, si è proceduto con l'inoculo di 300 mL portando il volume delle colture nei fbr a 4 L. Attesa circa 1 ora dall'inoculo degli starter, è stato nuovamente verificato il valore del pH e mantenuto un basso valore di irradianza (circa $15 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) e a alla temperatura di 22 °C per la durata di 24 ore per consentire l'acclimatazione delle colture prima di dare avvio al fotoperiodo del disegno sperimentale.

3.1.4 I prelievi di campioni di microalghe per le analisi di laboratorio

Per eseguire i prelievi di coltura microalgale da destinare agli esami di laboratorio, sono state costruite (nelle officine della Steroglass di Perugia) pipette in vetro lunghe 80 cm necessarie ad effettuare in modo idoneo i prelievi sulla intera colonna d'acqua in ciascuno dei 12 fbr del banco sperimentale.

Il setup sperimentale è stato perfezionato tenendo conto di dover aggiungere al termine di ciascun prelievo di biomassa il corrispondente volume di terreno di coltura per evitare che la specie algale andasse incontro a condizioni di limitazione da nutrienti. Si riportano qui di seguito le rispettive condizioni sperimentali:

1. Esperimento pilota: preliminare analisi sperimentale di riscontro sul presupposto teorico di impiego delle onde acustiche sulla crescita delle microalghe della durata di 22 giorni.
Durante le attività sperimentali, sono stati effettuati prelievi di aliquote di biomassa pari a 50 mL con cadenza di 48 ore, riportando le colture nei fbr a livello (68 cm) con una pari aliquota di terreno di coltura, per non alterare le caratteristiche del campo acustico nei fbr stimolati acusticamente per evitare carenze di nutrienti (Strainer et al., 1971). Il reintegro non è stato superiore a 1/80 del volume complessivo delle colture microalgali pari a 4 Lt.
2. Design of experiment (Doe): attività sperimentali di ottimizzazione degli effetti osservati nell'esperimento Pilota condotta in due separate repliche in cui sono stati testati diversi programmi di stimolazioni acustiche. Ciascun esperimento ha avuto una durata pari a 8 – 10 giorni.

Nelle due sperimentazioni del Doe, sono stati eseguiti prelievi di aliquote di biomassa pari a 100 mL giornalieri, riportando le colture nei fbr a livello (68 cm) con una pari aliquota di terreno di coltura, per non alterare le caratteristiche del campo acustico nei fbr stimolati acusticamente. Il reintegro non è stato superiore a 1/40 del volume complessivo delle colture microalgali pari a 4 Lt.

I campioni di biomassa, così come indicato nelle rispettive condizioni sperimentali sono stati raccolti in provette Falcon sterili da 50 mL ciascuna, e a seconda del tipo di analisi da effettuarsi, da queste sono state prelevate aliquote con le micropipette Gilson (20-1000 ul) utilizzando provette Eppendorf da 1 ml (sempre sterili).

3.1.5 La conservazione dei campioni in frigo a 4°C

La numerosità dei campioni delle colture microalgali come descritto nelle distinte metodologie di analisi non ha permesso di effettuare in tempo reale tutte le attività di misura previste nei protocolli sperimentali. Aliquote pari a 50 mL di coltura microalgale è stata riposta nelle provette di plastica Falcon e conservate in frigo e al buio alla temperatura di + 4 °C.

3.2 Il monitoraggio chimico fisico delle colture microalgali

Durante la crescita le colture microalgali sono state monitorate giornalmente con l'ausilio di una sonda multiparametrica, di un Phmetro e di un Ossimetro laser con il quale è stata rilevata anche la temperatura dei fbr.

3.2.1 Il monitoraggio chimico fisico con la sonda multiparametrica e le misure del pH

Il monitoraggio dei parametri chimico-fisici è stato eseguito con la sonda multiparametrica CyberScan PCD 650 con campo di misura, accuratezza e risoluzione di pH, T e Ossigeno disciolto rispettivamente pari a 0-14 e accuratezza nella misura +/- 0,001 e campo di misura nell'intero range da 0 a 14; Temperatura con un campo di misura da -10 a +110 °C con risoluzione 0,1 °C e accuratezza +/- 0,5 °C; Ossigeno disciolto con campo di misura da 0,00 a 90,00 mg/L, risoluzione 0,01 mg/L e accuratezza +/- 0,2 mg/L.

Per brevità non si descrivono le procedure di calibrazione d'uso dello strumento, che sono state scrupolosamente osservate durante l'effettuazione di ciascuna misura. Le misure del pH nella sperimentazione del Doe sono state invece eseguite con il Phmetro pH 211 della HANNA Instruments con una accuratezza nelle misure pari a +/- 0,01.

3.2.2 Il monitoraggio delle temperature di funzionamento dei fbr e le prove di evoluzione dell'ossigeno

Il monitoraggio della temperatura delle colture microalgali è stata invece effettuata con lo strumento Presens Fibox 3 Fiber-Optic Oxygen meter, utilizzato parzialmente anche nel monitoraggio dell'ossigeno disciolto mediante lo specifico sensore posto all'interno di ciascun fbr. Queste misure, con l'impiego dei sensori SP-PSt3-NAU-D5-YOP consentono di acquisire con notevole precisione, l'evoluzione dell'ossigeno nel tempo all'interno delle colture microalgali, ma la difficoltà di gestire in contemporanea 12 fbr, ha penalizzato in questa attività di ricerca il suo impiego in continuo, limitando così l'acquisizione di valori istantanei solo in corrispondenza dei prelievi di biomassa per le analisi di laboratorio.

Originariamente non erano disponibili informazioni concernenti l'impiego di questa sonda a fibra ottica nel monitoraggio dell'ossigeno disciolto nelle colture microalgali. E' stato eseguito quindi un esperimento per la messa a punto del protocollo operativo di misura, omettendo in questa fase di descrivere le procedure di calibrazione del dispositivo regolarmente eseguite come da manuale.

Con la collaborazione della Steroglass di Perugia, proprietaria dello strumento, concesso in uso a titolo gratuito per l'esecuzione delle attività di ricerca, è stato dimensionato e realizzato un utensile in vetro su cui far aderire il sensore (in immersione nella coltura microalgale) che, in trasparenza, dall'esterno del fbr e quindi in modo non invasivo veniva illuminato da flash di luce emessi dal dispositivo di misura Fibox e trasmessi in fibra ottica.

E' stato impiegato in un fbr un volume pari a 1,8 L di acqua bidistillata e progressivamente sono state aggiunte aliquote pari a 50 mL di microalghe di una precedente coltura in quattro distinte riprese fino a portare a volume di 2 L la coltura nel fbr. E' stata quindi misurata l'evoluzione dell'ossigeno prima e dopo ciascuna operazione di rabbocco per determinare i tempi di risposta del sensore alle modificazioni dell'ambiente al fine di comprenderne

l'efficienza nel monitoraggio della coltura durante l'agitazione meccanica. Il sistema ha mostrato un'ottima risoluzione e velocità di risposta, anche nel monitoraggio giornaliero delle colture e pertanto se corredato di un dispositivo multicanale, è in grado di monitorare in continuo i 12 fbr del banco sperimentale fornendo misure di ossigeno in $\mu\text{mol/L}$ e in % e di temperatura.



Figura 1: Il particolare dell'esperimento di messa a punto del protocollo operativo di impiego dell'ossimetro in fibra ottica Presens Fibox 3 Fiber-Optic Oxygen meter. E' stato cerchiato il particolare dell'asta di vetro che si aggancia sul profilo interno del fbr, costruita dalle officine Steroglass di Perugia su cui è stato sistemato il sensore dell'ossigeno.

3.3 Curve di crescita

Le curve di crescita con i metodi standard sono state ottenute mediante la registrazione di 3 parametri: la densità ottica, la conta cellulare e il peso secco. Per seguire in maniera ottimale la crescita della coltura sono stati impiegati questi 3 diversi parametri allo scopo di individuare la misura più affidabile per la misura della concentrazione cellulare attraverso il confronto tra questi tre metodi.

3.3.1 Densità ottica

La crescita della coltura è stata determinata spettrofotometricamente registrando la variazione nel tempo della densità ottica. Su 1 mL di sospensione algale, prelevato in triplicato ogni 2 giorni e inserito in apposite cuvette, sono state effettuate letture turbidimetriche alla lunghezza d'onda di 678 nm (Sorokin, 1973). Le misure sono state effettuate con l'ausilio dello Spettrofotometro Agilent 8453 UV-Visibile della Agilent Technologies, Germania.

E' stata fatta una retta di calibrazione dello spettrofotometro (vedi Figura 2) partendo da un campione di microalga *Scenedesmus obliquus* ad una concentrazione iniziale pari a 15×10^6 . Tale aliquota è stata diluita con i rapporti di diluizione indicati in ascissa nel grafico allegato,

portando ad 1 mL ciascun campione di analisi in triplicato mediante l'aggiunta della relativa frazione di acqua ultrapura milli-Q.

I campioni così preparati in triplicato, sono stati letti allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 678 nm e i risultati, caratterizzati da una deviazione standard inferiore all'1 % sono stati graficati con la formula $\log_2(\text{OD}) + 10$.

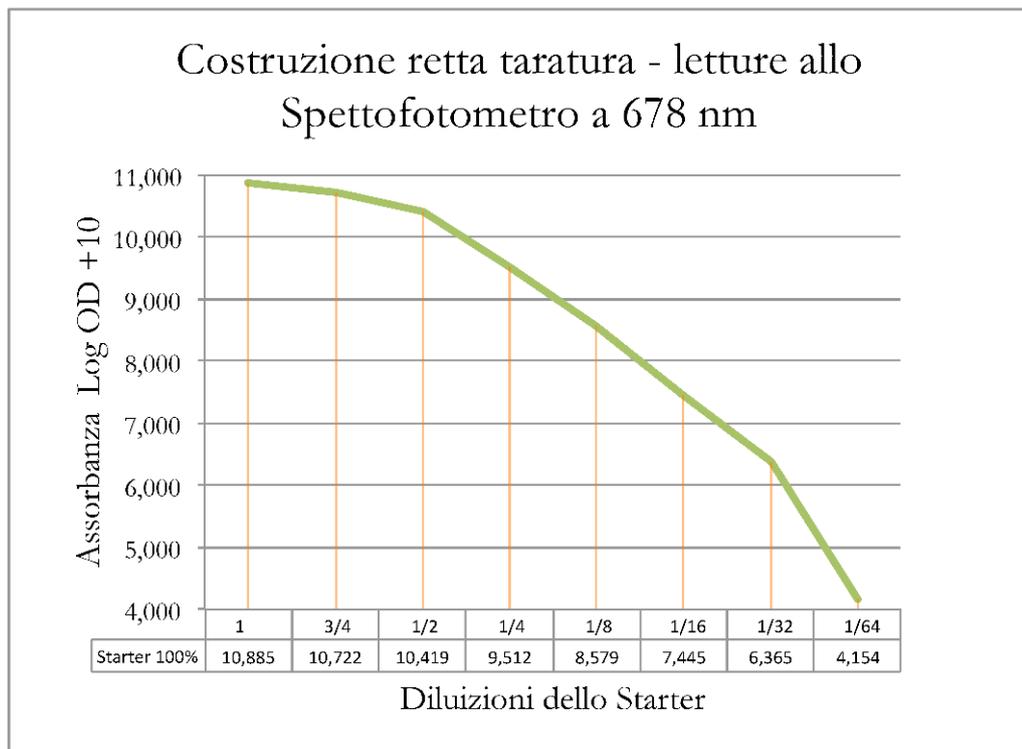


Figura 2: Retta di calibrazione dello Spettrofotometro, ottenuta mediante la lettura in triplicato di 8 campioni in rapporto di diluizione decrescente di coltura microalgale di *Scenedesmus obliquus*.

Le curve di crescita sono state ottenute graficando l'andamento della densità ottica (OD) media, espressa come $\log_2(\text{OD}) + 10$, in funzione del tempo (giorni). Con questo metodo sono state costruite le curve di crescita dell'esperimento Pilota.

3.3.2 Le misure di assorbanza con la sonda Li-Cor

Il sensore Licor 190 SA⁴, accoppiato al data logger I.I 250A Light Meter, è uno strumento

⁴ Caratteristiche tecniche della sonda Li-Cor 190 SA: Absolute Calibration: $\pm 5\%$ traceable to the National Institute of Standards and Technology (NIST). Sensitivity: Typical $5 \mu\text{A}$ per $1000 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Linearity:

caratterizzato da estrema semplicità d'uso, versatilità e rapidità nelle misure: E' una sonda radiometrica ad alta risoluzione in grado di rilevare la densità del flusso fotonico Photon Flux Density (PPFD) che va ad impattare in un tempo e superficie unitari.

La radiazione misurata in questa gamma è generalmente definita Photosinteticamente Active Radiation (PAR) è compresa nella regione dello spettro elettromagnetico 400-700 nm e viene misurata in $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

$$\text{Unità di misura: } 1 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \equiv 1 \mu \text{E s}^{-1} \text{m}^{-2} \equiv 6,022 \cdot 10^{17} \text{ fotoni s}^{-1} \text{m}^{-2}.$$

La sonda Licor di Figura 3 (Biggs et al., 1971) è stata impiegata nelle misure del PAR di ciascuna postazione dei fbr, nelle varie condizioni durante le fasi di validazione del banco sperimentale, al fine di verificare il corretto funzionamento delle lampade e valutare la densità del flusso fotonico realmente disponibile per le colture microalgali.

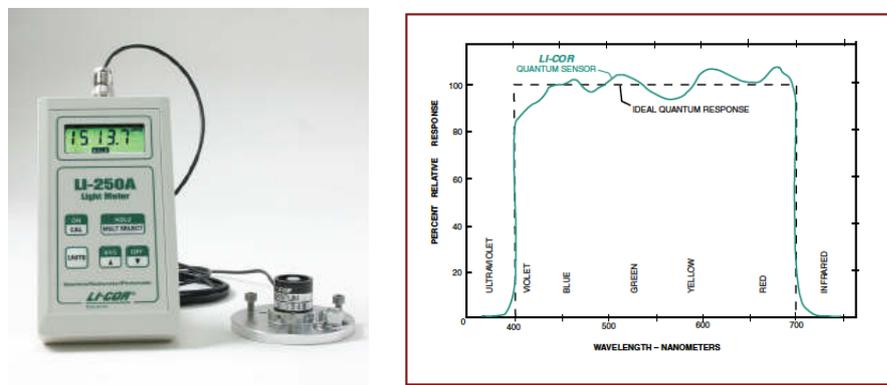


Figura 3: Il particolare del sensore Licor 190 SA e del data logger Li-250 A. A lato la curva di risposta del sensore nella regione del PAR rispetto al Quantum di risposta ideale.

L'illuminazione artificiale, ottenuta con due tubi al neon di diverso grado di colore, è stata infatti l'unico parametro fisso e la scelta di tutti gli altri parametri sperimentali legati alla progettazione dei fbr doveva tenere conto della disponibilità massima di circa $60 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Maximum deviation of 1% up to $10,000 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Stability: Typically $< \pm 2\%$ change over a one-year period. Response Time: 10 μs .

Dalle misure PPF_D mediate, eseguite sulla superficie dei 12 fbr esposta alla sorgente luminosa (alla distanza di 20 cm), è stato rilevato un valore pari a 50,9 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ e i rispettivi valori di illuminanza e irradianza pari a 3169,4 lux e 1072,5 $\mu\text{W /cm}^2$.

Sono state eseguite numerose prove sperimentali di impiego del sensore, anche in immersione nei fbr (mediante un tubo di vetro ottico al quarzo), ma questa soluzione è stata poi subito scartata per la difficoltà nell'esecuzione di una misura che oltre a risultare invasiva (a causa dell'immersione del sensore nei 12 fbr), non era riproducibile e affidabile a causa dei fenomeni di sedimentazione delle colture.

La soluzione ottimale è stata ottenuta con la costruzione di un sostegno mobile scorrevole su un binario di alluminio (vedi Figura 4), parallelo ed equidistante ai fbr, che ha permesso di rendere rapida e affidabile la misura su due punti univocamente determinati dei fbr, che non sono stati mediati.

Dalla standardizzazione del protocollo di misura (tempo intercorso tra la misura sul punto superiore e inferiore del fbr, effettuate a partire dal cessare di un ciclo di agitazione), sono state collezionate le misure nel corso di entrambi gli esperimenti del Doe, i cui risultati sono descritti e commentati nel paragrafo 4.5.4.



Figura 4: Il particolare del sistema di ritenzione della sonda Licor, scorrevole su binario che ha permesso di effettuare rapidamente misure a due diverse altezze sul banco sperimentale dei 9 fbr stimolati acusticamente e sulla linea dei 3 fbr di controllo collocata sul lato opposto.

3.3.3 Peso secco

Il Peso secco della biomassa, nell'Esperimento Pilota è stato determinato essiccando in triplicato 10 mL di campione overnight a 105 °C e pesato tramite bilancia di precisione.

Nelle due sperimentazioni del Doe, il peso secco è stato determinato essiccando in triplicato 25 mL di campione overnight a 105 °C e pesato tramite bilancia di precisione.

I campioni in triplicato, sono stati filtrati con una pompa a vuoto e filtri del diametro di 47 mm. di porosità pari a 0,45 µm Mdi Membrane Filter Advanced Micro-devices (P) Ltd. I filtri, dopo essere stati essiccati in stufa a 105 °C per oltre un'ora prima dell'utilizzo, sono stati pesati prima e dopo aver filtrato la biomassa e mediamente dopo 12 ore per la determinazione del peso secco. I filtri, contenenti la biomassa fresca, sono stati gestiti nelle operazioni di essiccazione con l'ausilio di piattini di alluminio (vedi Figura 5) preventivamente tenuti in stufa a 105 °C per oltre un'ora e manipolati con l'uso di pinzette.



Figura 5: Il particolare dei piattini di alluminio su cui sono stati riposti i filtri contenenti la biomassa da essiccare.

Come nel precedente paragrafo 3.3.1 anche per la determinazione del peso secco è stata eseguita una retta di calibrazione (vedi Figura 6) partendo dallo stesso campione di microalga *Scenedesmus obliquus* ad una concentrazione iniziale pari a 15×10^6 . Tale aliquota è stata diluita con i rapporti di diluizione indicati in ascissa nel grafico allegato, portando ad 1 mL ciascun campione di analisi in triplicato mediante l'aggiunta della relativa frazione di acqua ultrapura milli-Q.

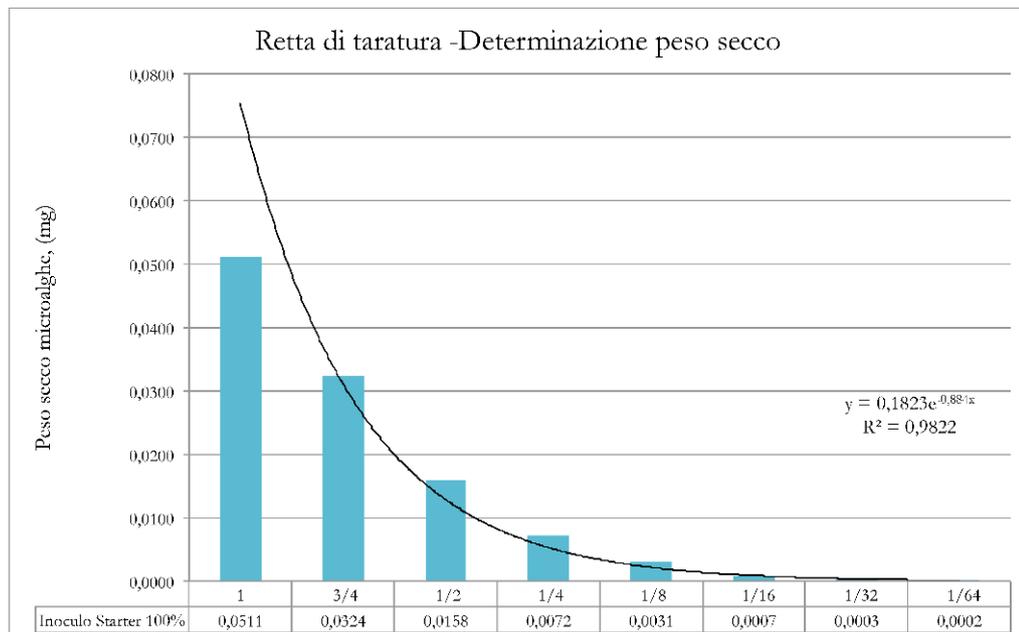


Figura 6: Retta di calibrazione del peso secco ottenuta mediante le misure in triplicato di 8 campioni in rapporto di diluizione decrescente di coltura microalgale di *Scenedesmus obliquus*.

Le curve di crescita nella determinazione del peso secco nei due esperimenti del Doe (paragrafo 4.5.2.2) sono state ottenute graficando l'andamento del peso secco medio in funzione del tempo (giorni).

3.3.3 Conta Cellulare

Nel corso della sperimentazione sono stati studiati diversi sistemi di conta cellulare, con i quali monitorare le cinetiche di crescita delle colture cellulari di *Scenedesmus obliquus*. Partendo dalle misure al microscopio con la camera di burker, era stata rilevata la difficile operazione di analisi in triplicato di campioni di biomassa microalgale prelevati per ciascun giorno di avanzamento delle colture nei 12 fbr.

Con un approfondito studio sulla morfologia della microalga in esame, è stato possibile come indicato nel paragrafo 2.2.1, ottenere le informazioni dimensionali e la deviazione standard della *Scenedesmus obliquus* al fine di poter interpretare correttamente i valori misurati da un granulometro laser presente nel laboratorio di Chimica e Tecnologia del Farmaco dell'Università di Perugia che ha ospitato buona parte delle attività di questa ricerca di dottorato.

3.3.3.1 Analisi in camera di Burkner

Per le misure di conta cellulare effettuate con la camera di burker Camera di Burkner TIEFFE THOA 0,0025 mm² Fortina W.G.C. Opticolor, è stata impiegata la seguente procedura: da un campione di 10 mL, risospeso da una leggera agitazione al Vortex sono stati posti per capillarità 10 µl di campione microalgale sulla camera superiore e 10 µl su quella inferiore e successivamente effettuata la conta al microscopio conteggiando solo le cellule contenute su 20 riquadri della camera di burker, 10 posizionati nella parte superiore della camera di Burkner e 10 di quella inferiore, scegliendo gli stessi in maniera randomica.

Per calcolare il numero di cell/ml è stata utilizzata la seguente formula: $X \text{ mean} * 25 * 10000 = \text{cell/ml}$ in cui “X mean” corrisponde alla media matematica di tutti i 20 valori ottenuti; 25 è il fattore di diluizione relativo al terreno; $10000 = 10^4$, il fattore di diluizione della camera di Burkner. Il risultato ottenuto esprime il valore della concentrazione del campione rapportato al numero di cellule per millilitro.

Questo metodo, si è rivelato poco affidabile e fortemente dipendente dalla manualità e interpretazione del dato da parte dell'operatore a causa degli aggregati cellulari che sono stati rinvenuti nelle colture cellulari starter.

E' stato quindi studiato un protocollo per la risospensione dei campioni di microalghe a causa del numero elevato di campioni da esaminare (un prelievo in ciascuno dei 12 fbr esaminato in triplicato generava 36 distinte operazioni di conta cellulare al microscopio).

A partire dal campione microalgale appena prelevato dal fbr in esame, sono state suddivise tre diverse aliquote di campione e, su una di esse, a distanza di tempo 2, 4, 6 ore sono state effettuate le conte cellulari con le modalità descritte con la camera di burker.

Da ciascuna delle altre due aliquote di campione, allo scadere dei medesimi intervalli, prima di effettuare la conta cellulare in camera di burker, sono state sotto campionate sempre in triplicato 3 distinte aliquote da 1 mL.

- Tre triplicati da 1 mL (9 provette eppendorf da 1 mL ciascuna) sono stati sonicati con il bagnetto ad ultrasuoni (Branson 2510) a tre diversi programmi di durata a partire da 30 secondi, 6 secondi e 1 secondo;

- Altri tre triplicati sono stati risospesi con il vortex a velocità intermedia con gli stessi tempi della sonicazione.

Le conte cellulari in camera di burker, sono state ripetute con il granulometro laser, (meglio descritto nel paragrafo seguente 3.3.3.2) con il quale è stato possibile apprezzare la variazione della distribuzione dimensionale degli aggregati cellulari nei diversi programmi e modalità di risospensione dei campioni utilizzate.

Da queste prove è stata uniformata la procedura di risospensione dei campioni con il vortex sempre ad una velocità intermedia e per un periodo massimo di 3 secondi per garantire, l'attendibilità delle informazioni e la riproducibilità e l'affidabilità nelle misure.

3.3.3.2 Analisi al Granulometro Laser 780/AD Autodiluter

Dallo studio sulla morfologia della microalga *Scenedesmus obliquus* meglio descritta nel capitolo 2.2.1 è stato successivamente perfezionamento il protocollo sperimentale per la misura delle dimensioni delle alghe (singole cellule e aggregati) nelle sospensioni mediante analisi dimensionali. Tali analisi sono state eseguite con un Accusizer 780/AD Autodiluter (Figura 7). Tale strumento conta e analizza le dimensioni delle particelle in una sospensione, utilizzando il sistema Single-Particle Optical Sensing (SPOS).

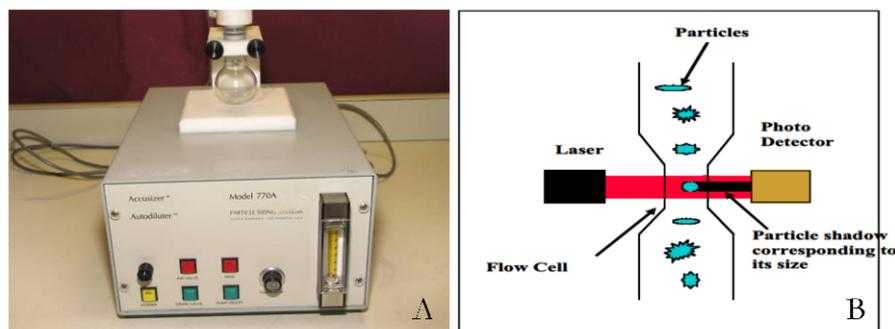


Figura 7: (A) Granulometro Accusizer 780/AD Autodiluter e (B) Principio di funzionamento.

In pratica, lo strumento misura l'area dell'ombra proiettata dalla cellula (che passa davanti ad un raggio laser che illumina una porzione del detector di 400 micron x 400 micron), misurando la diminuzione dell'intensità luminosa, pari alla superficie proiettata dall'oggetto.

Lo strumento fornisce quindi il diametro della sfera (sfera equivalente) che produce lo stesso oscuramento.

E' stata quindi eseguita una prima analisi in triplicato su un campione di *S. obliquus* prima dell'inizio della crescita ottenendo così sia il numero di particelle per millilitro di sospensione che il loro diametro medio che ovviamente includeva il diametro medio delle singole cellule che quello degli aggregati. In Figura 8 è possibile osservare la distribuzione dimensionale della sospensione.

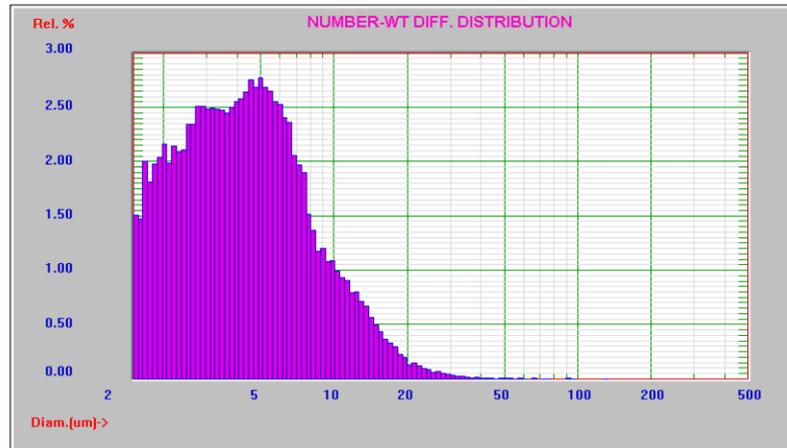


Figura 8. Risultati dell'analisi al granulometro per la determinazione del valore del diametro medio delle cellule di *S. obliquus*.

Nello screenshot del Granulometro di Figura 8, lo strumento ha analizzato le dimensioni di 83.010 particelle stimando una concentrazione del campione di 128.081 particelle per mL.

Per quanto riguarda le dimensioni, il diametro medio misurato è stato di 5,26 microns.

Per paragonare le dimensioni ottenute dallo strumento alle foto della microscopia ottica, le misure effettuate dell'asse maggiore e asse minore (paragrafo 2.2.1 - Tabella 1) sono state elaborate in modo da ottenere la superficie proiettata dell'ellissoide nelle due posizioni limite (asse maggiore perpendicolare al laser, figura piana ellisse; asse maggiore parallelo al laser, figura piana cerchio) (Hillebrand et al., 1999).

Una volta ottenuta l'area proiettata delle due figure geometriche piane è stato calcolato il diametro della sfera equivalente. Come si può vedere in Tabella 2 e Tabella 3 le dimensioni medie sono paragonabili a quelle rilevate con il granulometro, considerando anche le deviazioni standard della misura dell'asse maggiore e asse minore. Per avere dimensioni più plausibili è stata calcolata anche l'area dell'ellisse sottraendo o aggiungendo al valore medio la deviazione standard.

Campione	Area proiettata ellisse (μm^2)	Diametro sfera equivalente (μm)	Area proiettata ellisse, medie assi – Dev. St. (μm^2)	Diametro sfera equivalente (μm)	Area proiettata ellisse, medie assi + Dev. St. (μm^2)	Diametro sfera equivalente (μm)
1	11,1	3,7	5,9	2,7	18,0	4,8
2	11,3	3,8	6,7	2,9	17,0	4,6
3	12,8	4,0	7,0	3,0	20,2	5,0
Media	11,7	3,8	6,5	2,9	18,4	4,8

Tabella 2: Valori della superficie proiettata dall'ellisse asse maggiore parallelo al piano e diametro della sfera equivalente.

Campione	Area proiettata cerchio (μm^2)	Diametro sfera equivalente (μm)	Area proiettata cerchio, media asse minore – Dev. St. (μm^2)	Diametro sfera equivalente (μm)	Area proiettata cerchio, media asse minore + Dev. St. (μm^2)	Diametro sfera equivalente (μm)
1	7,2	3,0	3,5	2,1	12,1	3,9
2	7,8	3,1	4,5	2,4	12,1	3,9
3	9,9	3,5	5,4	2,6	15,5	4,4
Media	8,3	3,2	4,5	7,1	13,2	4,1

Tabella 3: Valori della superficie proiettata dall'ellisse (asse maggiore ortogonale al piano) e diametro della sfera equivalente.

Tali esami hanno evidenziato una morfologia simile a quanto presente in letteratura, e le dimensioni misurate sono in accordo con quelle rilevate con l'esame al microscopio ottico e al granulometro laser (Vedi Figura 4 paragrafo 2.2.1).

3.3.3.3 Analisi con lo Scepter Coulter Counter della Millipore

Lo strumento contacellule automatico Scepter coulter counter di Figura 9, con le due configurazioni di sensori con pista microfluidica monouso, consente di effettuare in modo rapido, preciso ed affidabile misure sulle concentrazioni delle microalghe, e seguirne quindi fedelmente le cinetiche di crescita.

Nella sua configurazione, lo strumento restituisce in un periodo di tempo che va dai 30 ai 45 secondi il valore di cellule per mL impiegando una piccolissima frazione di campione microalgale (circa 50 μl).

Con lo studio del protocollo sperimentale di analisi è stato individuato per la *Scenedesmus obliquus* l'impiego di una aliquota di campione pari a 100 μ l e 900 di NaCl per garantire la specifica funzionalità dello strumento.

Riguardo alle misure ottenute con lo Scepter sono state costruite delle rette di taratura in modo da verificare l'errore compiuto dallo strumento rispetto agli altri metodi di conta, utilizzando i protocolli sperimentali citati per la risospensione dei campioni come indicato nel paragrafo 3.3.3.1.

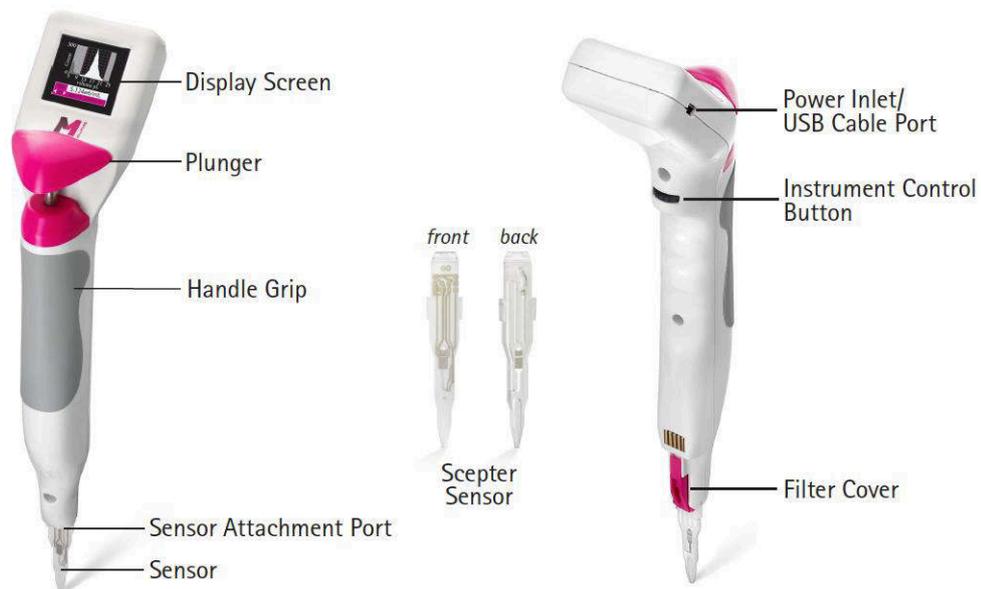


Figura 9: Il contacellule automatico Scepter della Millipore con una vista fronte e retro dei sensori monouso da 40 e 60 μ m.

E' stata quindi eseguita una retta di calibrazione Figura 10 partendo dallo stesso campione di microalga *Scenedesmus obliquus* ad una concentrazione iniziale pari a 15×10^6 . Tale aliquota è stata diluita con i rapporti di diluizione indicati in ascissa nel grafico allegato, portando ad 1 mL ciascun campione di analisi in triplicato mediante l'aggiunta della relativa frazione di acqua ultrapura milli-Q.

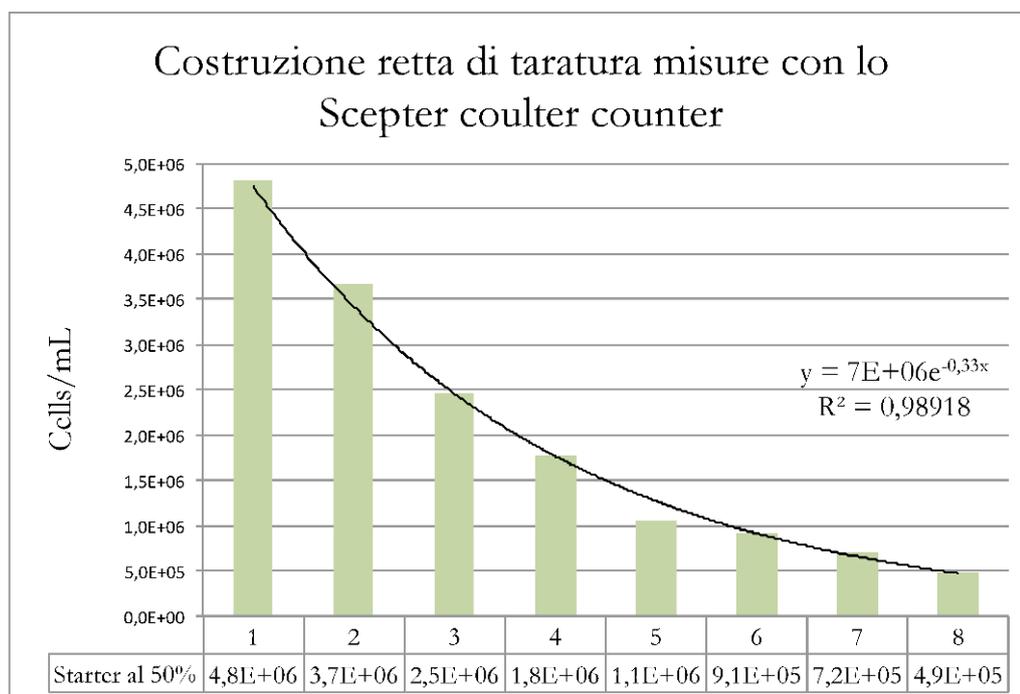


Figura 10: Retta di calibrazione delle misure allo Scepter, su una aliquota di 8 campioni in triplicato, ottenuti con un rapporto di diluizione decrescente di coltura microalgale di *Scenedesmus obliquus*. Il campione di origine era composto da 9 mL di NaCl e 1 mL di microalghie in modo da garantire, nei successivi rapporti di diluizione, la funzionalità dello strumento.

3.3.4 La retta di taratura dei metodi di analisi impiegati

Sono state visualizzate in forma grafica le correlazioni tra i valori misurati sulla stessa aliquota di campioni microalgali impiegata nelle operazioni calibrazione dei metodi e degli strumenti di cui ai precedenti paragrafi 3.3.1 – 3.3.3.

Sono stati confrontati i valori ottenuti con lo Scepter e il peso secco con le misure allo spettrofotometro e, successivamente anche i valori ottenuti delle concentrazioni di cellule di *Scenedesmus obliquus* misurate con lo Scepter e il peso secco misurato su aliquote di campioni di microalghie pari a 25 mL, preparati con le medesime procedure e rapporti di diluizione utilizzati per le calibrazioni degli strumenti di misura.

Nonostante la piccola aliquota di campione analizzato dallo Scepter coulter counter (50ul) nei rapporti di diluizione decrescenti, è stato ottenuto un elevato indice di correlazione di Pearson R^2 pari a 0,95 (vedi Figura 11).

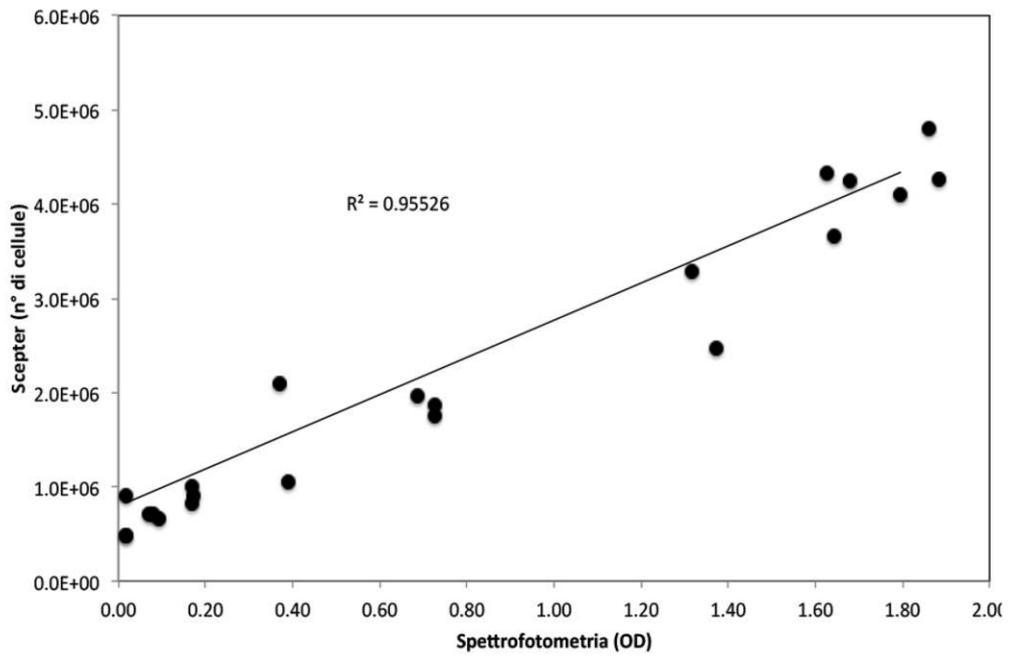


Figura 11: Retta di correlazione tra i valori di concentrazione di cellule per mL misurati con lo Scepter e le misure allo Spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 678 nm.

La stessa misura è stata ripetuta con un' aliquota maggiore di campioni (25 mL) in modo da poter apprezzare il contenuto in peso secco della biomassa contenuta nelle frazioni così piccole di coltura microalgale. Anche questo confronto ha restituito un alto valore di coefficiente di correlazione pari a 0,86 circa (Figura 12).

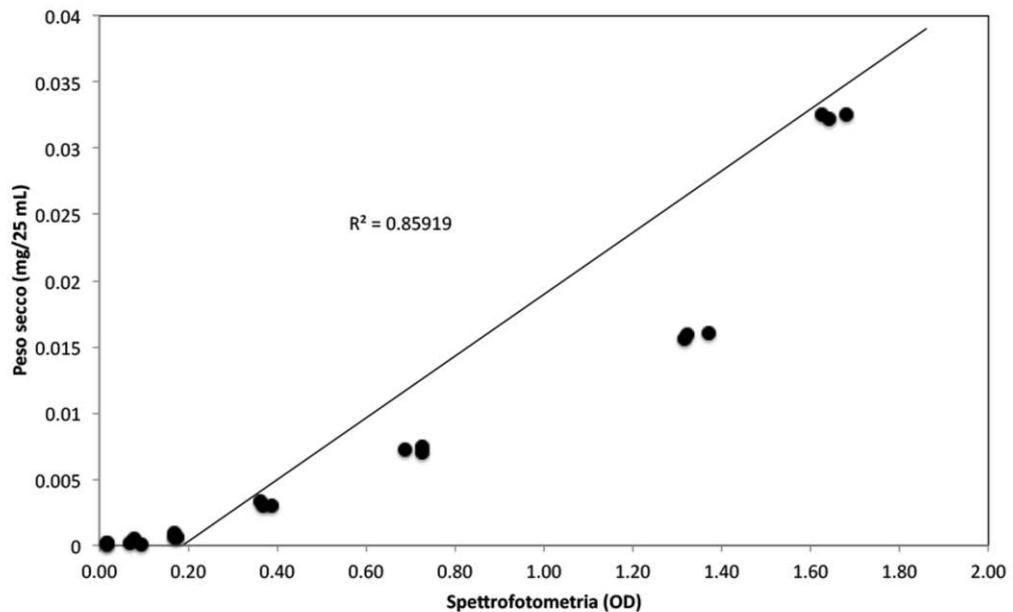


Figura 12: Retta di correlazione tra i valori di peso secco della biomassa e le misure allo Spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 678 nm.

E' stato rilevato poi anche il coefficiente di correlazione di Pearson dal confronto tra il valore di cellule per mL di microalghe *Scenedesmus obliquus* misurate con lo Scepter ed il contenuto di biomassa in peso secco rapportato sempre al campione di 25 mL di campione fresco (Figura 13).

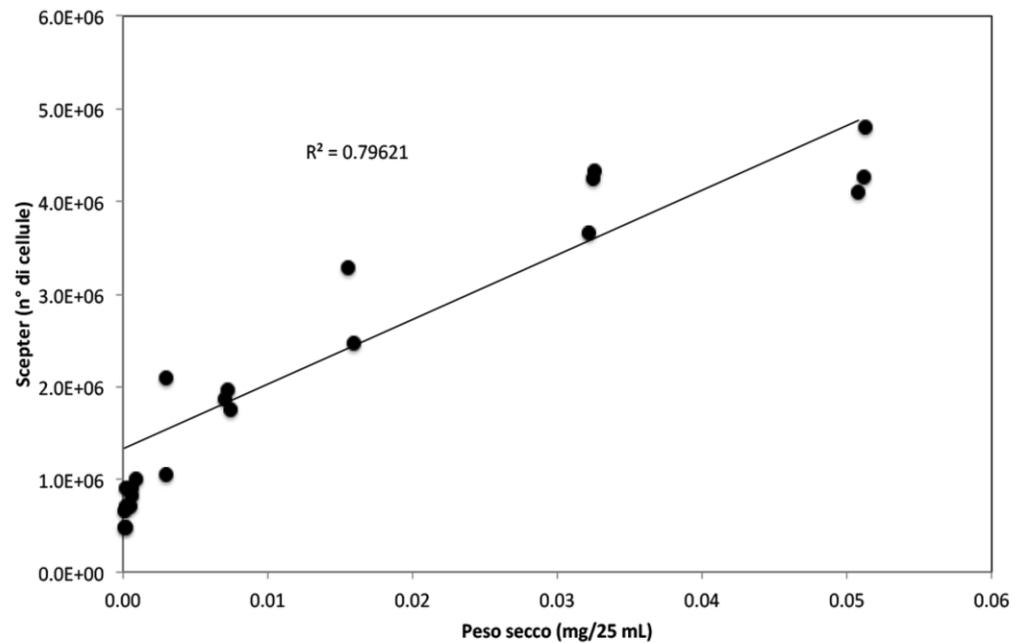


Figura 13: Retta di correlazione tra i valori di concentrazione di cellule per mL misurati con lo Scepter e le misure del peso secco delle frazioni di biomassa rapportate al campione fresco pari a 25 mL

Dal confronto tra i due metodi di analisi si è ottenuto un discreto valore di indice correlazione pari a 0,80 circa (Figura 13).

3.3.5 Misure di correlazione tra lo Scepter e il Granulometro laser

In questa sezione, sono state eseguite le misure di correlazione tra le letture effettuate dagli strumenti di misura utilizzati: lo Scepter coulter counter e il Granulometro Laser.

Lo Scepter nella sua configurazione di sensori da 40 um, ha una escursione operativa di misura compresa tra i 3 um e i 18,72 um, mentre il Granulometro Laser ha una maggiore risoluzione, riuscendo a contare particelle a partire dal diametro di 0,51 um fino a 483,42 um. Nella Figura 14 viene riportata la distribuzione dimensionale delle cellule di *Scenedesmus*

obliquus misurata al granulometro laser, escludendo le code destra e sinistra, poco significative. Dal confronto della Figura 14 con la Figura 15 è possibile osservare la medesima distribuzione dimensionale delle cellule, rilevata da entrambi gli strumenti di misura contacellule Scepter e Granulometro.

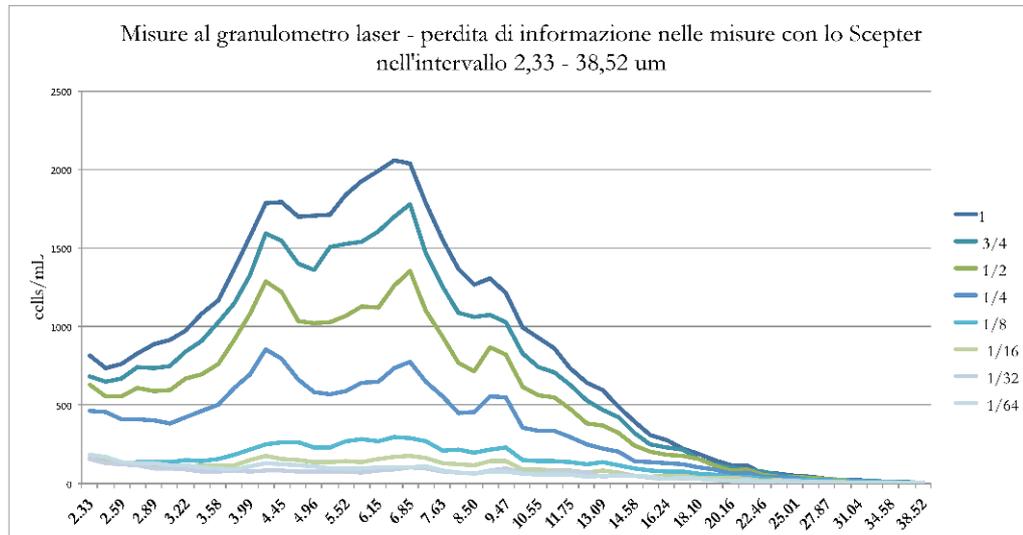


Figura 14: Misure al granulometro laser di un'aliquota di campione in rapporto di diluizione come da legenda a colori indicata, nel range di misura dello Scepter Coulter Counter.

Fra dunque necessario, per quanto riguarda le misure effettuate con lo Scepter verificare la perdita di informazioni nel range da 0,51 a 3,00 μm e quella superiore a 18,10 per l'eventuale presenza di aggregati cellulari.

Dalle analisi di morfologia e dalle numerose prove di misura effettuate sempre al granulometro laser, è emersa una dimensione media delle cellule di *Scenedesmus obliquus* pari a 5/7 μm .

E' stata quindi impiegata la stessa procedura con cui è stata realizzata la retta di taratura per le misure di assorbanza, peso secco ecc., partendo dal medesimo campione di microalghe di 100 μl e 900 μl di soluzione Na Cl e diluito 8 volte con acqua bidistillata (1- 3/4 - 1/2 - 1/4 - 1/8 - 1/16 - 1/32 - 1/64).

Nel grafico di Figura 15, è rappresentata la misura degli 8 campioni effettuata al Granulometro Laser nel medesimo Range operativo dello Scepter Coulter Counter.

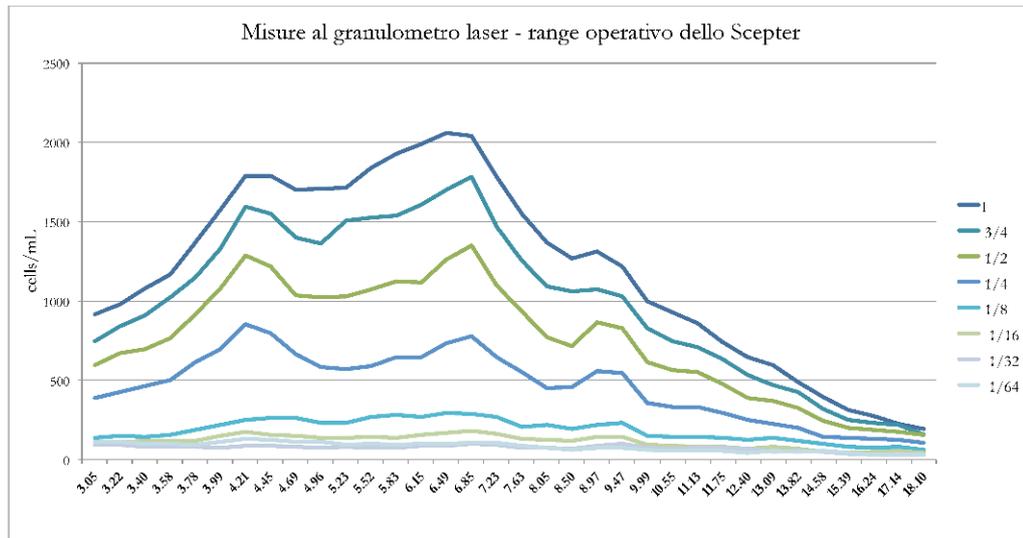


Figura 15: Misure al granulometro laser di un'aliquota di campione in rapporto di diluizione come da legenda a colori indicata, nel range di misura dello Scepter Coulter Counter.

Sono poi rappresentate le due code della distribuzione destra e sinistra in cui il Granulometro Laser ha rilevato informazioni sulla distribuzione di particelle che sembrerebbero prive di significato.

Com'è possibile osservare in Figura 16, la progressività nelle misure dei campioni più concentrati da 1 fino ad 1/8, nel range da 0,51 a 0,79 um seguono tutti lo stesso andamento con valori inferiori alle 15.000 particelle, che invece risultano raddoppiate nel campione contenente 1/64 della concentrazione microalgale di partenza, pari a 100 ul.

Ciò significa che in questo range delle osservazioni, non si hanno informazioni utili in merito al numero di cellule microalgali, o quanto meno la loro presenza in rapporto alle altre particelle presenti risulta ininfluyente, e questo andamento rimane confermato fino al range dimensionale di 3,05 um.

Con buona approssimazione, si conferma quindi la validità della misura dello Scepter con i sensori calibrati con l'apprezzamento del limite inferiore pari a 3.00 um.

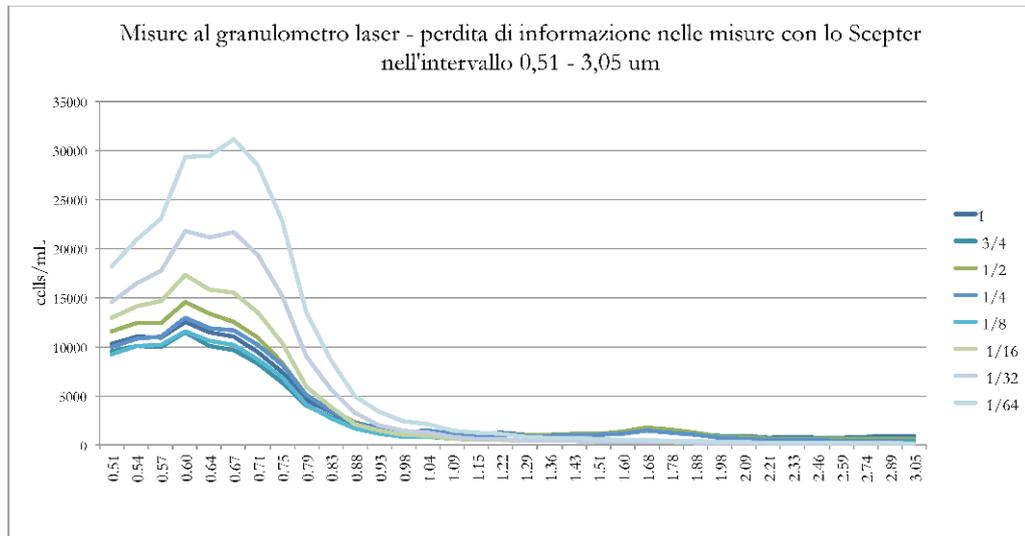


Figura 16: Misure al granulometro laser di un'aliquota di campione in rapporto di diluizione come da legenda a colori indicata. Perdita di informazione del contattelle automatico Scepter nel range da 0,51 μm a 3,05 μm .

La stessa analisi è stata fatta per il limite superiore di misura dello Scepter Coulter Counter (Figura 17).

Le particelle misurate dal Granulometro laser, a partire dal limite superiore, fuori dalla scala di misura dello Scepter coulter counter, non sembrano contenere informazioni utili in quanto il numero massimo di particelle mL, presenti già a 18,10 μm non supera le 200 unità e prive di significato.

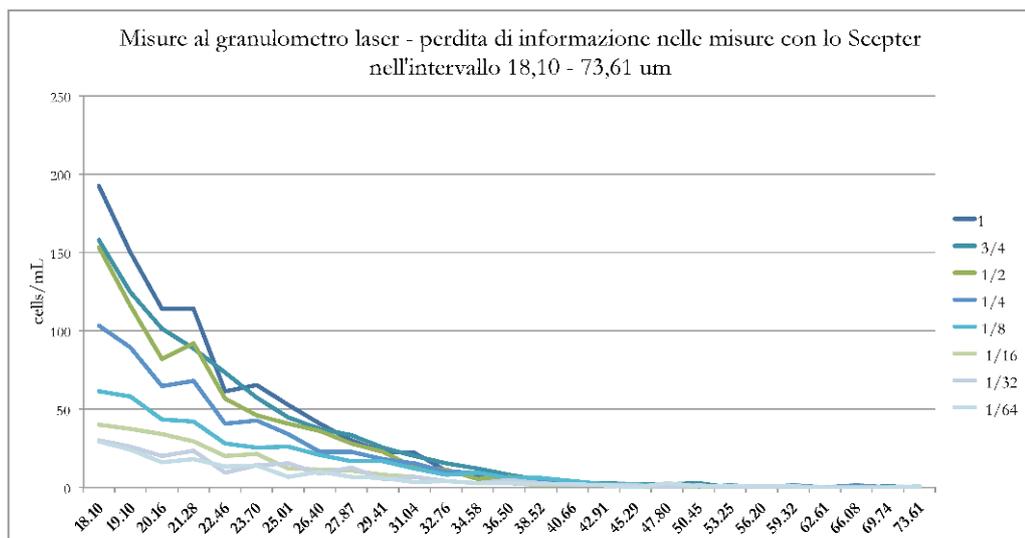


Figura 17: Misure al granulometro laser di un'aliquota di campione in rapporto di diluizione come da legenda a colori indicata, nel range di misura fuori dall'apprezzamento dello Scepter Coulter Counter, oltre 18,10 μm .

3.4 Le analisi fluorimetriche e di microscopia ottica ed elettronica

Lo studio sugli effetti prodotti dalle stimolazioni acustiche sulle colture microalgali di *Scenedesmus obliquus*, è stato coadiuvato dall'impiego di tecniche fluorimetriche con le quali si è cercato di ottenere importanti informazioni sulle modificazioni del profilo biochimico cellulare di tipo dinamico e di composizione.

Al fine di rendere più agevole e comprensibili le metodologie di analisi impiegate, si riassumono brevemente nei sotto paragrafi qui di seguito riportati le funzionalità delle strumentazioni di analisi impiegate e i protocolli di misura che sono stati predisposti per questo specifico lavoro di analisi sulle stimolazioni acustiche.

L'impiego del fluorimetro portatile AquaPen ha permesso di ottenere informazioni sull'efficienza quantica dei fotosistemi e sulla fluorescenza della clorofilla per valutare lo stato fisiologico delle colture sotto l'azione dello stress indotto dalle onde acustiche a diversa frequenza e intensità di stimolazioni acustiche.

Per la preparazione dei diversi campioni da esaminare è stata impiegata la centrifuga Universal 32 Hettich Lentrifugen.

3.4.1 Lo Spettrofluorimetro

L'assorbimento di un fotone da parte di una molecola provoca il trasferimento di un elettrone ad un livello energetico superiore, che tenderà poi a ritornare allo stato fondamentale riemettendo il fotone assorbito. Il fluorimetro rileva e misura l'emissione di fluorescenza, che è un'emissione che avviene in una scala di tempi che va da 10^{-12} a 10^{-6} s.

Un fluorimetro è costituito da una sorgente continua (lampada allo Xenon che emette tra i 200 e i 900 nm) il quale emette una radiazione che, dopo aver attraversato un monocromatore, viene inviata sul campione. La radiazione emessa dal campione viene raccolta ad un angolo di 90° (modalità Right Angle) o di $22,5^\circ$ (Front Face) ed inviata ad un secondo monocromatore (monocromatore di emissione) che la trasmette al rivelatore.

E' possibile raccogliere spettri sia di emissione e sia di eccitazione.

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato uno Spettrofluorimetro SPEX-Fluorolog-2 modello F112A1 connesso a un elaboratore, che attraverso il software "Datamax" è in grado di visualizzare ed analizzare gli spettri di fluorescenza (vedi Figura 18).

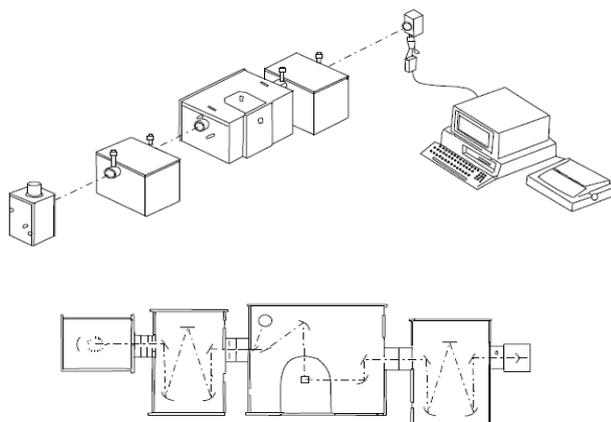


Figura 18: Composizione strutturale di uno Spettrofluorimetro

Le misure sono state ottenute ponendo il campione in una cuvetta da 4 mL e lo spettrofluorimetro è stato settato con una frequenza di eccitazione pari a 600 nm; spettro di acquisizione da 620 nm a 750 nm; assorbanza a 680 nm. Spettri di eccitazione: emissione a 685 nm; spettro acquisito da 380 nm a 650 nm.

Gli spettri ottenuti sono stati normalizzati per il numero di cellule, ottenuto tramite la conta cellulare con lo Scepter e sono stati confrontati sovrapponendoli per notare gli eventuali shift nelle lunghezze d'onda e le differenze nelle intensità. Infine, è stata normalizzata la banda a 685 nm, portandola a intensità pari ad 1 al fine di ottenere informazioni riguardo la variazione di intensità delle bande a 645 nm.

I risultati ottenuti sono riepilogati nel paragrafo 5.3 e seguenti.

3.4.2 Il fluorimetro portatile AquaPen AP 100 (Photon System Instruments)

Il fluorimetro AquaPen-C di Figura 19 è un dispositivo portatile, leggero molto comodo per misure rapide, affidabili e facilmente ripetibili per la misura della fluorescenza. Esso è dotato di un emettitore LED blu e rosso di luce filtrata e concentrata capace di produrre intensità di illuminazione nelle sospensioni fino a 3.000 micromoli fotoni $m^{-2}s^{-1}$.

La sorgente di eccitazione a luce blu (455 nm) è destinata a rilevare la fluorescenza emessa dalle clorofille (Chl), presenti nelle microalghe. La sorgente rosso-arancio (620 nm) è impiegata per l'eccitazione delle ficobiline e quindi adatta nelle misure dei cianobatteri.

Ha elevata sensibilità pari a 0,5 mg/L di Chl, quindi è in grado di misurare l'emissione in fluorescenza a basse concentrazioni di clorofille. Il funzionamento dello strumento è davvero semplice e impiega aliquote ridotte di coltura microalgale (4 mL) da riporre in una cuvette di plastica trasparente.

Il trasferimento dei dati acquisiti dallo strumento avviene tramite le porte USB o Wireless Bluetooth. Lo scaricamento dei dati è avvenuto con il Software in dotazione FluorPen 1.0.

I parametri di misura dell'AquaPen-C includono F_T , QY, NPQ, Analisi OJIP, curva di luce, e anche la densità ottica a 680 e 720 nm.

In merito all'impiego di questo fluorimetro portatile, e per gli approfondimenti sui settaggi e sullo studio del protocollo di misura si ringrazia il Prof. Fabio Polonara e l'Ing. Matteo Moglie del Dipartimento di Energetica dell'Università Politecnica delle Marche.



Figura 19: Il fluorimetro portatile AquaPen AP 100. E' possibile osservare l'estrema semplicità di impiego con le cuvette di plastica trasparenti (da 4 mL) in dotazione allo strumento. I tempi di attesa nelle misure dipendono dal protocollo impiegato e vanno da un tempo minimo pari a 40 secondi a circa 7 minuti.

3.4.3 Le analisi all'Infrarosso Fourier Transform Infrared (FTIR)

La spettroscopia IR si basa sull'assorbimento da parte della molecola del campione di radiazione infrarossa, che provoca transizioni tra i suoi livelli vibrazionali. Affinché si verifichi l'assorbimento la molecola deve presentare una variazione del momento dipolare di transizione; solo in questo caso, infatti, il campo elettrico della radiazione può interagire con la molecola e causare cambiamenti nell'ampiezza di uno dei suoi moti.

La spettroscopia IR viene utilizzata prevalentemente per l'analisi delle vibrazioni molecolari nel range di frequenze del medio infrarosso (400 cm^{-1} - 4000 cm^{-1}), che permette l'identificazione di composti organici, mediante il riconoscimento dei gruppi funzionali che assorbono a frequenze caratteristiche.

Apparato strumentale FTIR

Le misure IR sono state effettuate utilizzando uno spettrofotometro Bruker mod. Tensor27 a trasformata di Fourier, schematizzato in Figura 20.

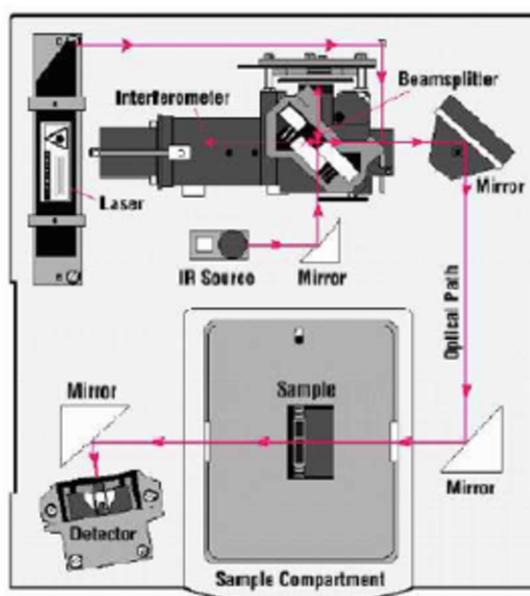


Figura 20: Apparato strumentale Bruker Tensor 27 e suoi componenti

L'apparato strumentale consente di utilizzare una sorgente GLOBAL per lavorare nel medio infrarosso (MIR) (è il caso del presente lavoro di tesi). La radiazione emessa dalla sorgente passa attraverso una fenditura di ampiezza regolabile, la cui apertura è direttamente proporzionale alla sensibilità della misura, ma inversamente proporzionale alla risoluzione. L'interferometro utilizzato è quello di Genzel, simile a quello di Michelson e il beam splitter

per la regione spettrale del medio infrarosso è in KBr. Sono presenti, inoltre, due detector: un rivelatore di tipo DTGS supportato su germanio per il MIR e un rivelatore DTGS su polietilene per il FIR. La strumentazione è interfacciata ad un PC tramite il software OPUS 6.5 Bruker Optik che consente l'impostazione dei parametri di misura e la visualizzazione, registrazione e manipolazione degli spettri.

Spettroscopia infrarossa ATR (riflettanza totale attenuata)

Quando un fascio di luce si propaga da un mezzo otticamente più denso ad uno otticamente meno denso esiste un angolo di incidenza, detto angolo critico, superato il quale si verifica il fenomeno della riflessione totale interna. In questo caso, nel mezzo con indice di rifrazione minore si crea una regione in cui è presente un'onda elettromagnetica, detta onda evanescente, che penetra nel mezzo per una frazione della sua lunghezza d'onda. Per aumentare la sensibilità di tale tecnica si utilizzano dispositivi che permettono riflessioni interne multiple. Il fenomeno della riflessione totale interna è estremamente sensibile alle variazioni dell'indice di rifrazione complesso dei materiali, e questa caratteristica è sfruttata per misurare l'assorbimento mediante l'attenuazione della riflessione totale interna (ATR), dovuta all'interazione del campo elettromagnetico con il materiale ad indice di rifrazione minore. Il fatto che la lunghezza di penetrazione dell'onda evanescente sia una frazione della lunghezza d'onda conferisce a questa tecnica una specifica sensibilità per l'analisi della superficie del campione.

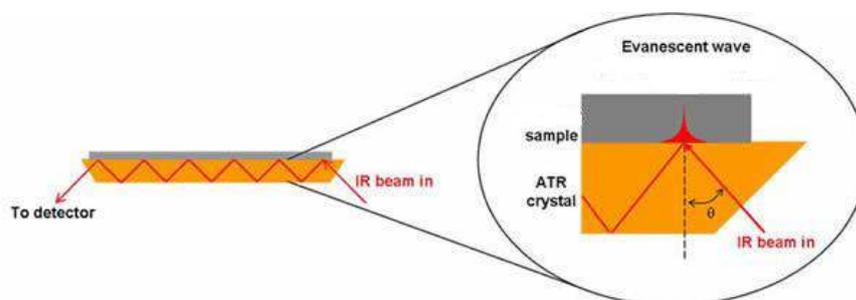


Figura 21: Il particolare del detector su cui va posizionato il campione da analizzare che viene analizzato con la tecnica ATR a riflessione totale interna per mezzo di onde evanescenti.

La tecnica ATR di Figura 21 si basa sulla misura dei cambiamenti che si verificano nel raggio infrarosso, riflesso internamente e totalmente quando entra in contatto con il campione.

Un raggio infrarosso viene diretto in un cristallo otticamente denso e con un alto indice di rifrazione, ad un certo angolo. Il raggio viene riflesso più volte attraverso la superficie in contatto con il campione. Questa riflessione interna crea un'onda evanescente che si estende attraverso la superficie del cristallo, raggiungendo il campione posto in contatto con il cristallo stesso. Di conseguenza, è opportuno che ci sia un buon contatto tra il campione e la superficie del cristallo. Nelle regioni dello spettro infrarosso in cui il campione assorbe energia l'onda evanescente risulterà attenuata o alterata. Il raggio infrarosso viene raccolto dal detector dalla parte opposta del cristallo, con la conseguente generazione di uno spettro IR.

Analisi vibrazionale e assegnazione delle bande

<i>Frequenza (cm⁻¹)</i>	<i>Assegnazioni bande</i>
2918	Stretching antisimmetrico CH ₂ (lipidi, carboidrati)
2850	Stretching simmetrico CH ₂ (lipidi, carboidrati)
1735	Stretching CH ₂ (cellulosa, acidi grassi)
1650	Stretching C=O (amide I)
1545	Bending N-H e Stretching C-N (amide II)
1450	Bending CH ₂ e CH ₃ (proteine)
1250	Stretching >P=O (acidi nucleici)
1150	C-O-C (Carboidrati)
1078	C-O-C (Carboidrati) Stretching >P=O (acidi nucleici)
1020	C-O-C (Carboidrati)

Tabella 4: assegnazione delle bande di assorbimento negli spettri IR delle cellule di *Scenedesmus obliquus* (Giordano et al., 2001; Duygu et al., 2012; Kim et al., 2009)

Preparazione e procedura di analisi dei campioni di microalghe.

Sono state depositate le alghe su celle IR e lasciate essiccare tutta la notte. Sono state utilizzate celle KRS5 ed è stato inserito nel supporto solo il vetrino con il campione essiccato, senza formare il sandwich. È seguita poi la preparazione dei campioni freschi da analizzare con ATR (100 microlitri): prelievo, vortex e sonicazione.

E' stata deposta una goccia di campione microalgale sul cristallo ATR (SeZn). L'acqua è evaporata dopo un'ora. I campioni sono stati centrifugati, per avere una maggiore quantità di cellule sul cristallo ATR. Centrifugazione: 5 ml a 4000 g per 5 minuti circa. Sono poi state effettuate le misure preliminari al tempo zero, dopo 10 minuti circa, su campione seccato (con aiuto del phon) e dopo 30 minuti da quando il campione è stato steso sul cristallo ATR.

Sono state poi seguite le procedure per il protocollo di lavaggio dei campioni di *Scenedesmus obliquus*.

Una aliquota del medesimo campione, precedentemente analizzato è stata sotto campionata in ulteriori in quattro campioni, ciascuno dei quali è stato sottoposto ai seguenti passaggi di laboratorio:

1. Un lavaggio + centrifuga
2. Due lavaggi (due centrifughe)
3. Tre lavaggi (tre centrifughe)
4. Controllo (solo pellet senza risospensione)

I lavaggi delle alghe sono stati effettuati con acqua bidistillata. Sono state prelevate 20 ml di sospensione microalgale, centrifugati a 4000 g per 5 minuti a $T = 20^{\circ}\text{C}$ (suddivisi in due provette da 10 ml) Successivamente, i 20 ml sono stati trasferiti in un'unica provetta, e vortexati per risospendere il pellet ottenuto nella centrifugazione.

Sono state prelevati per ciascuna delle prove da effettuare aliquote da 80 μl , mentre il campione di controllo non è stato sottoposto a lavaggi.

Gli altri tre campioni sono stati preparati per la centrifugazione nell'ultracentrifuga: sono stati trasferiti in cuvette e portati a volume di 4,5 ml, con l'aggiunta di acqua bidistillata, e centrifugati per 8 minuti a 16000 rpm a $T = 20^{\circ}\text{C}$. L'operazione di lavaggio con l'acqua bidistillata e la successiva centrifugazione è stata effettuata complessivamente una volta per il campione 1, due volte per il campione 2 e tre volte per il campione 3. Le cellule dei 4 campioni (vedi Figura 22) sono state analizzate con la tecnica spettroscopica ATR per determinare dal confronto degli spettri se la presenza del terreno di coltura può influenzare

l'analisi infrarossa, ed eventualmente il numero di lavaggi necessario per rimuoverlo in maniera efficace. Il pellet di ciascun campione è stato montato (tramite stesura) sul cristallo di Seleniuro di Zinco (ZnSe) ed è stato lasciato a disidratare, in modo che si potesse osservare il segnale non disturbato da quello dell'acqua.

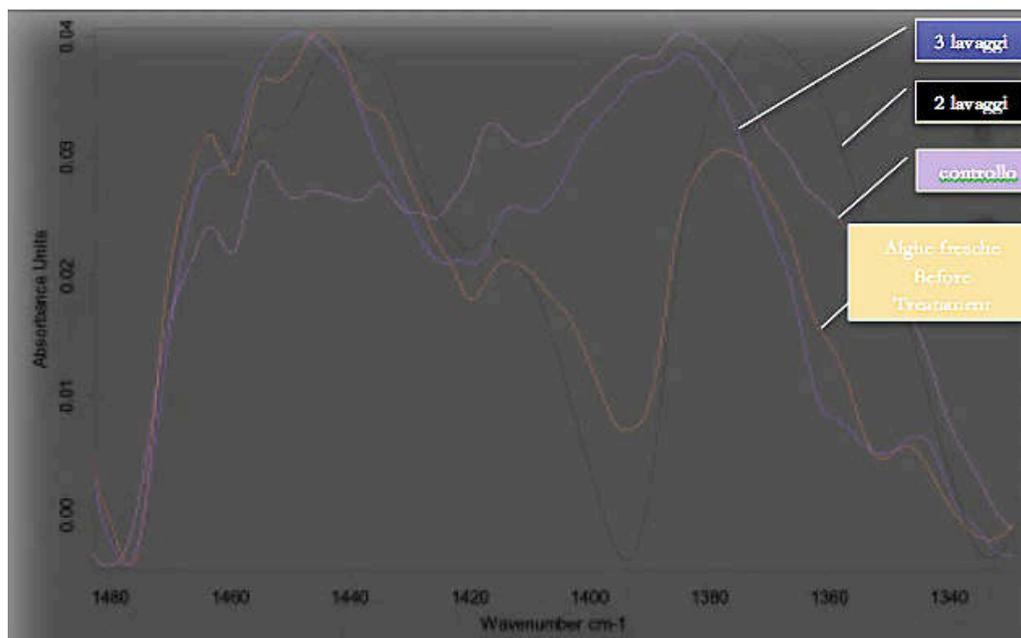


Figura 27: Esito delle misure sui campioni di microalghe analizzate con la tecnica spettroscopica ATR. Dal confronto è stato possibile determinare il protocollo di preparazione dei campioni da analizzare con la tecnica infrarossa e l'impatto provocato dalla maggiore e minore presenza di sali e composti residui presenti nel terreno di coltura.

I parametri di acquisizione nelle 4 misure è stato il seguente: Risoluzione: 2 cm^{-1} ; Tempo di scansione del campione (sample scan time): 30; Background: 30; Save data from 5000 cm^{-1} to 600 cm^{-1} Sono state eseguite misurazioni di spettri del campione ancora idrato con una serie di scansioni: 10×120 secondi (10 spettri, 1 ogni 120 secondi) (Prima serie)

È stato osservato che il **campione 1** era disidratato a sufficienza, e si è proceduto con una serie di scansioni: 50×300 secondi. Il campione è stato lasciato overnight e dopo è stato registrato l'ultimo spettro) (Seconda serie) Tra la prima e la seconda serie sono trascorsi 10 minuti.

E' stato osservato che il **campione 2** si è disidratato in tempi molto più lunghi rispetto al campione 1. Inoltre, non si sono verificate significative differenze tra gli spettri registrati durante la di disidratazione e quelli del campione secco. Pertanto il campione 3, il controllo e il campione del terreno di coltura sono stati analizzati in condizione di disidratazione.

In merito quindi al **campione 3** è stato misurato lo spettro a disidratazione completata, avvenuta circa dopo 50 minuti dal caricamento del campione. È stato misurato un altro spettro dopo 80 minuti dall'ultima misurazione.

In merito quindi al **campione 4** è stato misurato lo spettro a disidratazione completata, avvenuta circa 50 minuti dopo il caricamento del campione. È stato misurato un altro spettro, dopo aver lasciato il campione overnight.

Con le procedure sperimentali eseguite, si è giunti alla conclusione che non sono consigliati 3 lavaggi per le cellule microalgali per evitare che le stesse possano danneggiarsi a causa della forza esercitata dalla centrifuga e che 2 lavaggi, dalle analisi degli spettri ottenuti hanno dato le migliori informazioni con una chiara indicazione delle bande vibrazionali delle molecole osservate.

Con questo protocollo sperimentale, sono state effettuate le analisi sui campioni microalgali nei diversi giorni di avanzamento, riportando gli esiti delle misure ottenute nel capitolo 5 Risultati e discussione al paragrafo 5.

3.4.4 Le analisi di Microscopia ottica a fluorescenza

Con la Microscopia ottica a fluorescenza, grazie alla proprietà delle molecole di clorofilla assorbire la luce a particolari lunghezze d'onda e, successivamente, di emettere luce dopo un breve intervallo di tempo, si è cercato di impiegare il bagliore fluorescente per acquisire informazioni sull'eventuale cambiamento della morfologia cellulare delle microalghe stimulate acusticamente e sulla presenza o meno di aggregati nelle aliquote di campioni opportunamente selezionati tra i diversi tempi di avanzamento.

Il fenomeno della fluorescenza consente di osservare le cellule con una buona risoluzione spaziale quasi come se si osservasse un'immagine tridimensionale.

Inoltre tale tecnica di analisi si è rivelata di semplice impiego visto che non necessita della preparazione del campione come invece è stato fatto per gli esami di microscopia ottica ed elettronica.

I campioni di microalghe ottenuti nelle repliche sperimentali del Doe, sono stati osservati con il microscopio a fluorescenza Zeiss Axioplan con obiettivo a 100 ingrandimenti, (vedi paragrafo 4.7) illuminando il campione con una lampada a vapori di mercurio della potenza

di 100 W. Davanti alla sorgente luminosa sono stati posti una serie di filtri di eccitazione a diverse lunghezze d'onda. Come da protocollo impiegato da Suo et. al., 2012, è stata impiegata la frequenza di eccitazione a 480 nm ed è stata osservata poi, l'emissione a 527 nm. Le immagini digitali riportate nel paragrafo 4.7, sono state acquisite con una fotocamera Digitale Olympus DP/= digital camera con DP Controller Software (Olympus, Japan).

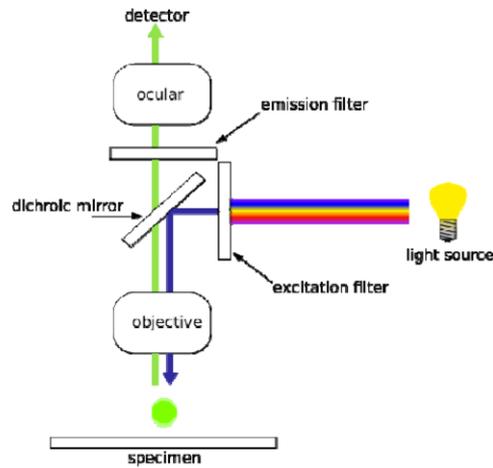


Figura 23: schema di funzionamento del microscopio a fluorescenza.

Come è possibile osservare in Figura 23, la luce di eccitazione prodotta dalla lampada ai vapori di mercurio viene collimata da una lente e un diaframma per poi giungere ad un filtro di eccitazione con il quale si è ottenuta la lunghezza d'onda di 480 nm e poi riflessa verso l'obiettivo che illumina il campione.

La fluorescenza nel campione viene focalizzata sul detector dallo stesso obiettivo usato per l'eccitazione. Un filtro tra l'obiettivo e il detector va a separare la luce di eccitazione dalla luce di fluorescenza; quindi l'obiettivo porta sull'oggetto un fascio di luce incidente a lunghezza d'onda pari a quella della luce eccitante e, in senso inverso, raccoglie la luce fluorescente prodotta dal campione e veicolata dall'oculare.

3.4.5 Le analisi al Microscopio elettronico TEM

I campioni di *Scenedesmus obliquus* sono stati infine caratterizzati morfologicamente mediante microscopia elettronica a trasmissione (transmission electron microscopy, TEM) usando un microscopio Philips EM 400T (Eindhoven, NL).

Le aliquote dei campioni da destinare agli esami di microscopia ottica ed elettronica sono state trattate come di seguito indicato, su indicazioni fornite nel protocollo Algares.

Per gli esami di Microscopia ottica, i campioni sono stati conservati in formaldeide 2,5 % in tampone fosfato (PB) 0,2 M pH 7,2* solo dopo aver eliminato il terreno di coltura. Partendo quindi da un campione di 2 mL, è stato centrifugato a 3500 rpm per 15 minuti ed eliminare il surnatante, ottenendo solo il pellet. In seguito si è aggiunta una quantità di formaldeide tale da ricoprire perfettamente il pellet e garantire la penetrazione del fissativo.

Per la microscopia elettronica i campioni sono stati conservati in glutaraldeide 2,5 in PB 0,2 M pH 7,2. Anche in questo caso è stato eliminato il surnatante con la medesima procedura indicata per la preparazione dei campioni destinati agli esami di microscopia ottica.

* Il tampone fosfato PB 0,2 M pH 7,2 è stato preparato con due distinte soluzioni: la soluzione A preparata con una soluzione 0,2 M di sodio fosfato bibasico con 28,39 g di Na₂HPO₄ (sol A), portando a 1000 mL con acqua distillata; la soluzione B ottenuta dalla preparazione di una soluzione 0,2 M di sodio fosfato monobasico con 27,6 g di NaH₂PO₄ * H₂O (sol B), portando a 1000 mL con acqua distillata. Sono stati quindi prelevati 36 mL della soluzione A e mescolati a 14 mL della soluzione B. Sono stati così ottenuti 50 mL di PB 0,2 M pH 7,2.

3.5 Il sistema d'illuminazione artificiale e il fotoperiodo e le analisi di termografia

Una ricerca approfondita ha permesso di individuare le caratteristiche di irradianza delle sorgenti luminose più idonee alla crescita della *Scenedesmus obliquus*. Lo studio ha riguardato anche sistemi più efficienti per illuminare artificialmente i fotobioreattori, ma si è ritenuta valida la soluzione di impiegare l'illuminazione con tubi al neon con diverso grado di colore. La luce, in questa attività di ricerca, è stata l'unico parametro fisso, per cui sono state effettuate numerose prove sulle caratteristiche di emissione della radiazione luminosa sempre

compresa nel range del PAR (Photosynthetic Active Radiation) da 400 a 700 nm, al fine di trovare tubi al neon la cui emissione fosse la più intensa possibile in questo range.

La banda spettrale delle lunghezze d'onda più efficienti per le attività fotosintetiche è stata ottenuta mediante l'impiego di due tubi al neon con diverso grado di colore:

- Mazda TF Prestiflux /Serie 80 BRL 18 watt di potenza e flusso luminoso pari a 1350 lumen (vedi Figura 24);
- Sylvania Gro Lux F18 T8 - 18 watt di potenza e flusso luminoso 8500 °Kelvin (vedi Figura 25);

su una plafoniera General Electric N-Pack NPP218L disposta verticalmente e essenzialmente alla distanza di 20 cm del relativo fbr.

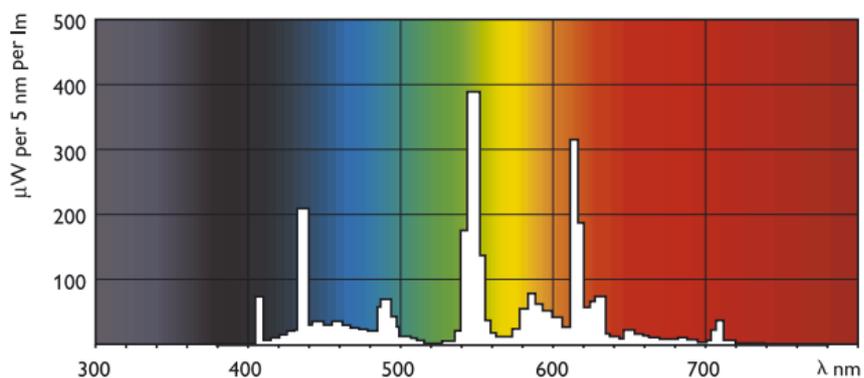


Figura 24: Spettro di emissione del tubo al neon Mazda TF Prestiflux /Serie 80 BRL 18

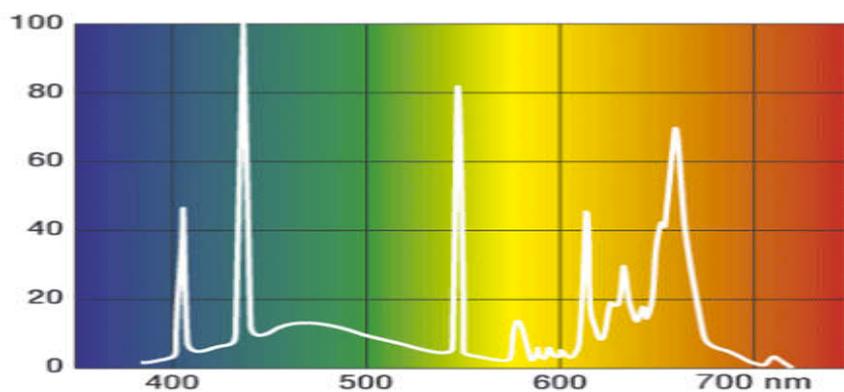


Figura 25: Spettro di emissione del tubo al neon Sylvania Gro Lux F18 T8

A questa distanza, il valore della radiazione luminosa da non superare è pari a 60 micro moli fotone $m^{-2}s^{-1}$ per evitare l'instaurarsi da parte delle microalghe di fenomeni di fotoprotezione dei sistemi di conversione dell'energia luminosa.

In questo modo è stato possibile ottenere uno spettro luminoso con maggiore densità di potenza nella regione del PAR e in corrispondenza alle lunghezze d'onda più efficienti per le clorofille, Chl *a* e Chl *b*.

Grazie alla collaborazione con il Prof. Aldo Romani e Dott.ssa Chiara Grazia del Dipartimento di Chimica dell'Università di Perugia, è stato possibile misurare l'irradianza e le caratteristiche spettrali di ciascuna delle 12 postazioni dei fbr.

I profili spettrali delle 12 lampade al neon sono stati registrati raccogliendo la luce con una fibra in quarzo del diametro di 200 micron collocata in posizione centrale e ad una distanza di 43 cm dalla parete di supporto delle lampade. Il rivelatore CCD Avantes AvaSpec-2048 ad alta sensibilità ha risoluzione spettrale di 8 nm. Gli spettri normalizzati sono mostrati nel grafico seguente di Figura 26 (a sinistra in scala lineare, a destra in scala logaritmica).

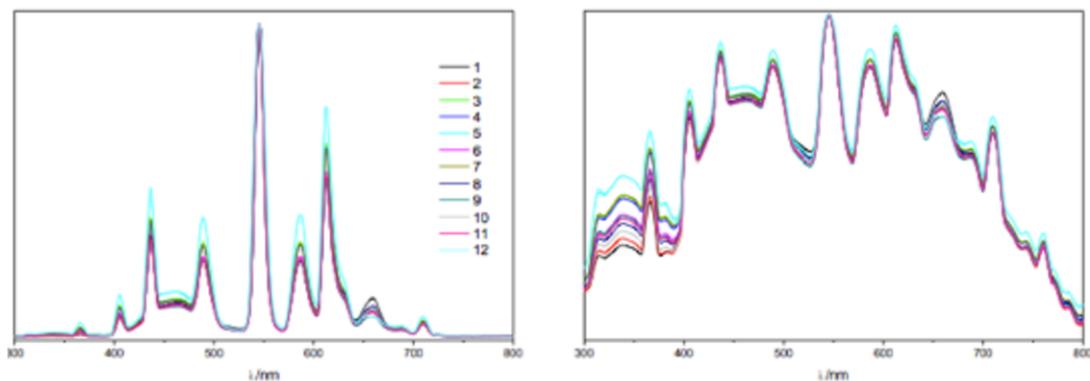


Figura 26: Profili spettrali dell'illuminazione prodotta in ciascuna postazione di fbr dalle lampade al neon. Nell'immagine di destra, in scala logaritmica è possibile osservare la diversa stratificazione delle curve spettrali dovuta alle diverse intensità di irradianza rilevate, ma non misurate con questo strumento.

I sensori utilizzati sono tre fotodiodi (BPW 34B, with Enhanced Blue Sensitivity, OSRAM) montati su un supporto a distanza costante dalla sorgente (43 cm dalla parete di supporto delle lampade). Per una sorgente a spettro ampio ogni componente spettrale contribuisce alla corrente totale *I* misurata dal fotodiodo secondo la risposta del sensore a quella lunghezza d'onda. I valori di corrente totale misurati dai fotodiodi sono mostrati nella seguente Tabella 5:

Lampada	I Fd1 (μA)	I Fd2 (μA)	I Fd3 (μA)
1	52,6	52,3	51,7
2	48,0	47,7	47,4
3	48,8	48,6	48,1
4	51,9	51,6	51,2
5	51,3	51,1	50,5
6	50,8	50,3	49,9
7	50,8	50,8	50,3
8	50,1	49,8	49,4
9	30,7	30,6	30,1
10	46,7	46,3	46,0
11	45,8	45,4	45,5
12	48,9	48,6	48,1

Tabella 5: Valori misurati di corrente elettrica (micro Ampere) sulle celle (fotodiodi) da cui è stata successivamente determinata l'irradianza spettrale.

$(r(\lambda))$: risposta normalizzata

$R_o = 0.64 \text{ A/W}$ a 850 nm

quindi:

$$I = A \cdot I_{r_o} \cdot R_o \cdot \int i(\lambda) \cdot r(\lambda) d(\lambda) \quad [\text{A}] \quad \text{corrente totale}$$

$$I_{r_o} = I / (A \cdot R_o \cdot \int i(\lambda) \cdot r(\lambda) d(\lambda)) \quad [(\text{W/m}^2)/\text{nm}] \quad \text{fattore di normalizzazione dell'irradianza spettrale}$$

$$D = \int I_{r_o} \cdot i(\lambda) d(\lambda) \quad [\text{W/m}^2] \quad \text{densità di potenza}$$

Per il calcolo della densità di potenza sono stati utilizzati i valori di corrente registrati con il fotodiodo 1.

$$I = A \cdot J \quad [\text{A}] \quad \text{fotocorrente misurata}$$

dove:

$$A: \text{area sensore} = 7.45 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2$$

$$J = \int I_{r_o} \cdot R(\lambda) d(\lambda) = I_{r_o} \cdot R_o \cdot \int i(\lambda) \cdot r(\lambda) d(\lambda) \quad [\text{A/m}^2] \quad \text{densità di corrente sul sensore}$$

dove:

$$I_{r_o} = I_{r_o} \cdot i(\lambda) \quad [(\text{W/m}^2)/\text{nm}] \quad \text{irradianza spettrale}$$

$(i(\lambda))$: spettro lampada normalizzato

$$R(\lambda) = R_o \cdot r(\lambda) \quad [\text{A/W}] \quad \text{risposta sensore}$$

Dalla elaborazione dei parametri misurati con il fotodiodo 1 è stato possibile determinare i valori della densità di potenza espressi in W/m^2 indicati nella colonna D della Tabella 6.

Lampada	I Fd1 (μA)	$\int i(\lambda) \cdot r(\lambda) d(\lambda)$	$\int i(\lambda) d(\lambda)$	$I r_0$	D
1	52,6	27,67	42,00	0,40	16,75
2	48,0	26,55	40,38	0,38	15,31
3	48,8	30,82	47,43	0,33	15,75
4	51,9	30,04	46,16	0,36	16,73
5	51,3	36,42	56,43	0,30	16,67
6	50,8	27,13	41,54	0,39	16,31
7	50,8	30,05	46,24	0,35	16,39
8	50,1	26,84	40,90	0,39	16,01
9	30,7	25,70	39,39	0,25	9,87
10	46,7	26,55	40,34	0,37	14,88
11	45,8	26,40	40,33	0,36	14,67
12	48,9	35,87	55,68	0,29	15,92

Tabella 6: Determinazione dei valori di densità di potenza delle 12 postazioni di fbr.

E' stata quindi operata la sostituzione delle lampade del fbr 9 il cui valore di densità di potenza è risultato essere del 40% circa inferiore del valore di radiazione luminosa prodotta nelle altre postazioni di fbr.

Dalle misure PPFD mediate, eseguite sulla superficie dei 12 fbr esposta alla sorgente luminosa (alla distanza di 20 cm), è stato rilevato un valore pari a $50,9 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ e i rispettivi valori di illuminanza e irradianza pari a 3169,4 lux e $1072,5 \text{ uW /cm}^2$.

3.5.2 Il fotoperiodo

Nelle attività sperimentali è stato scelto il fotoperiodo con 14 ore di luce e 10 ore di buio, consigliato dal protocollo Algares per la crescita ideale della *Scenedesmus obliquus* e in accordo alle fonti bibliografiche fin qui citate. Le plafoniere al neon dei 12 fbr sono state collegate in parallelo e azionate elettricamente da un temporizzatore analogico preimpostato che ha automatizzato tale funzione nel corso degli esperimenti.

3.5.3 Misure con termocamera per la verifica del calore dissipato dalle lampade al neon

Con la Termocamera Testo 882 con una sensibilità termica (NETD) minore di 50 mK, sono state eseguiti i rilevamenti termografici sulle 12 plafoniere del banco sperimentale, al fine di ottenere una conferma sperimentale sulla distribuzione delle temperature lungo le pareti dei fbr a contatto con le radiazioni luminose prodotte dalle lampade al neon.

Si riportano qui di seguito solo le immagini acquisite sul fbr 1 dopo 4 ore dall'accensione delle lampade. Dalla vista d'insieme della postazione del fbr 1 (vedi Figura 27), le due strisce di colore giallo, corrispondono alla dissipazione di calore lungo il profilo delle lampade al neon dove la temperatura misurata non ha superato il valore di 42 °C.

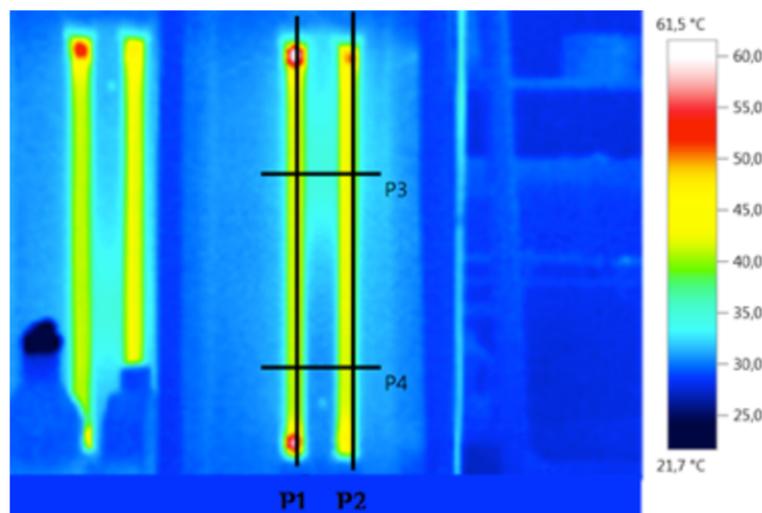
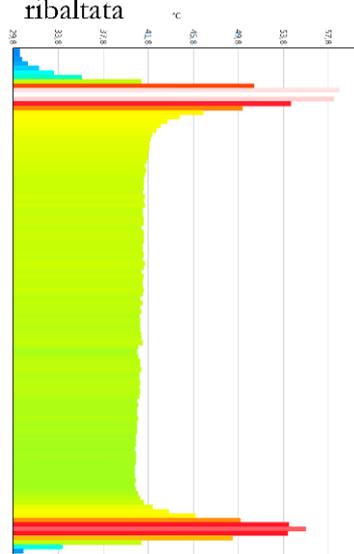


Figura 27: Immagine termografica delle lampade al neon. Sulla foto con le linee di colore nero sono evidenziati i due profili verticali (P1 e P2) e quelli orizzontali (P3 e P4) lungo i quali è stato sviluppato con il software Testo, la distribuzione termica dissipata dalle lampade.

Guardando l'immagine del profilo verticale P1 ribaltato a destra di 90°, è possibile scorgere (con l'ausilio della legenda termografica sulla distribuzione delle temperature), l'esatta distribuzione del calore dissipato in corrispondenza delle estremità dei due tubi al neon in corrispondenza dei contatti elettrici con la plafoniera, in cui è possibile osservare le temperature più elevate di poco superiori al valore di 57°C.

Profilo P1 –sezione longitudinale
ribaltata



Profilo P3 –sezione ortogonale in
pianta

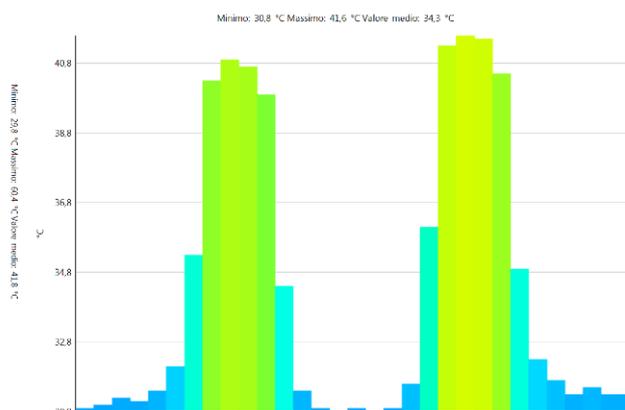


Figura 28: Nell'immagine di sinistra si osserva il profilo verticale P1 della lampada al neon, ribaltata a destra di 90°. L'immagine di destra è una vista della sezione ortogonale alle lampade in cui è possibile osservare il valore ridotto della dissipazione di calore sulla plafoniera e tra le due lampade al neon.

Lungo il profilo del tubo al neon la temperatura non supera il valore di 42°C e il profilo perfettamente nitido e definito disperdeva il calore già nei primi 10 cm dal bordo.

Nella Figura 28 a destra è rappresentata una vista della sezione ortogonale alle lampade in cui è possibile osservare il valore ridotto della dissipazione di calore sulla plafoniera e tra le due lampade al neon che è inferiore a 31 °C.

La prova è stata ripetuta dopo due e quattro ore dall'accensione delle lampade e le temperature di funzionamento si sono attestate sempre su questi valori. La prova è stata poi ripetuta sulla superficie di vetro del fbr esposta alla radiazione luminosa e anche in questa misura la temperatura non ha superato la soglia di 23°C che tra l'altro era la temperatura ottimale di crescita delle colture microalgali.

Le lampade al neon sono state montate su una plafoniera verticale a vista. Sono state effettuate le misure sul calore dissipato dopo circa 2 ore e 4 ore di funzionamento, alla distanza di 20 cm dal profilo stesso delle lampade per escludere un surriscaldamento sul tubo fbr che poteva interferire con alla crescita delle microalghe.

Alla distanza considerata, non è stata rilevata sulla superficie del fbr un sensibile incremento della temperatura. Sono state quindi verificate le condizioni di elevata replicabilità che hanno dato così il via alla realizzazione delle 12 postazioni di illuminazione artificiale, munite di pannelli separatori .

Distribuzione della temperatura nell'intorno delle lampade al neon. I vari colori dell'immagine di termografia indicano la distribuzione delle temperature da cui si evince che man mano che ci si allontana dalla superficie delle lampade la temperatura diminuisce rapidamente fino a raggiungere quella ambiente. Il profilo del calore dissipato è visibilmente confinato sulla sorgente di emissione come illustrato sulla legenda termografica in figura 27.

3.6 Il sistema di agitazione delle colture con astina e bolla d'aria microfiltrata.

Sono state esaminate diverse tecniche per l'agitazione le colture microalgali nei tubi fbr di vetro, avendo escluso sin dal principio la possibilità di impiegare, le ancorette magnetiche, per eliminare anche questa eventuale perturbazione (i campi magnetici, il rumore dovuto alla rotazione e strisciamento sul vetro e non ultimo le forze di taglio).

Dalle evidenze sperimentali di queste prime analisi di impiego di eliche, micromotori ad immersione, anche in questo secondo setup sperimentale, si è scelto di impiegare l'insufflazione di aria filtrata a 0,22 micron prodotta con delle pompe d'aquario con numero di bolle controllate che avesse consentito di far risospendere la biomassa che gravitualmente si deposita sul fondo. E' stato costruito per ciascun fbr un'astina in vetro, munita all'estremità di un piattello di vetro, che è rimasta per l'intero ciclo sperimentale all'interno di ciascun fbr. Le stesse sono state azionate al momento di ciascuna misura e prelievo biologico, quindi ogni 48 ore, mediante 5 azioni agitazione manuale delle colture con semplici movimenti di salita e discesa, con l'impiego di guanti in lattice per limitare le contaminazioni.

In proposito, per misurare l'impatto acustico prodotto dall'emissione di ciascuna bolla e dal suo fluire nella coltura, sono state effettuate delle misure di bioacustica come descritto nei paragrafi 4.2.5 e 4.4.

Da questa procedura impiegata, è stato fatto tesoro ed infine dopo un approfondito studio sull'argomento, è stato messo a punto un sistema misto, motorizzato che consentisse di mantenere il sistema di agitazione con moto alternativo longitudinale, eliminando del tutto le bolle d'aria.

3.7 Realizzazione del sistema di riproduzione dei segnali e di conversione analogico-digitale

Per la realizzazione del sistema di riproduzione dei segnali con 9 canali separati, è stata trovata sul mercato una valida soluzione di una scheda audio con le caratteristiche di avere un basso valore di latenza e la caratteristica di poter gestire (8+1) diversi canali audio separati (in mono) sui quale poter riprodurre distinte tracce audio con diversi programmi di lavoro. La scheda audio, dotata di ingressi amplificati alimentati a 48 V per dispositivi microfonic offri quindi la possibilità di effettuare anche le registrazioni audio su uno o più canali separati.

3.7.1 Software Nuendo – scheda audio Presonus e Amplificatori a canale separato

Con il Software Nuendo 4 di Figura 29 sono stati preparati i programmi di stimolazione acustica meglio descritti nella Sezione Risultati e Discussione. La frequenza di campionamento impiegata 44.100 campioni al secondo – 16 bit è stata ritenuta idonea considerata che la massima frequenza di lavoro testata nei programmi di stimolazione è pari a 10 kHz. Le caratteristiche della scheda Audio Presonus Fire Studio Project (vedi Figura 30), con un ridottissimo tempo di latenza ha garantito la miscelazione dei segnali e la loro rimodulazione su 9 canali separati senza produrre alcun tipo di interferenza. Dalle uscite separate della scheda audio, il segnale elettrico è stato amplificato ed inviato al corrispondente attuatore acustico, per consentire di riprodurre nei 9 fbr le tracce audio del relativo programma di stimolazione acustica.

Nella conversione analogica – digitale, l'elaborazione utilizzata per la gestione dei segnali a canali separati non consentiva di determinare univocamente il valore di intensità di riproduzione del segnale acustico, poi riprodotto nei fbr in quanto nei successivi passaggi tra amplificatore e attuatore acustico, ciascun dispositivo risponde con un suo determinato livello di efficienza, che non è possibile gestire.



Figura 29: Il Software Nuendo 4 e gli amplificatori utilizzati.



Figura 30: La scheda audio Presonus Fire Studio Project.

3.7.2 L'attuatore acustico Ottone

L'attuatore acustico Ottone di Figura 31 è stato scelto sul mercato per le sue caratteristiche innovative che, sfruttando il principio della magnetostrizione, ha la capacità di trasferire alle superfici di contatto una discreta forza vibrazionale proporzionale alla sua massa (840 gr), vincendo le resistenze degli oggetti e mettendoli in risonanza con frequenze acustiche comprese nell'intervallo del suono udibile (20 Hz – 20 kHz).

La particolarità e l'innovazione del prodotto, brevettato nel 2011, risiede in una particolare lega di ferro con componenti magnetiche: il Neodimio e Terfenol – D, che lo rendono unico in quanto a forza vibrazionale generata in rapporto alla ridotta potenza di esercizio.

Dalla collaborazione nel Progetto di Ricerca “Alghe” con la Esarc Hi Tech di Milano, in particolare con Nicolò Benassi, Matteo Cibelli e Andrea Minardo, è stata inizialmente ottenuto un attuatore acustico “in prova” con il quale sono stati effettuati i test e le misure meccaniche I.DV nel successivo paragrafo 3.8.2.



Figura 31: L'attuatore acustico Ottone.

Specifiche Tecniche:

Tecnologia: magnetostrittiva
Potenza massima: 20 W
Impedenza: 4 ohm
Potenza IP: 20
Raffreddamento: dissipazione naturale
Temperatura di funzionamento: 0 C° > + 70C°
Umidità%: 5 - 95

Dimensioni e peso:

Altezza: 50mm
Larghezza alla Base: 60 mm (sulla diagonale)
Larghezza al cilindro: 50 mm
Peso: 840 g
Prodotto: Made in Italy

3.7.3 Il sistema di registrazione audio con il microfono e con l'idrofono

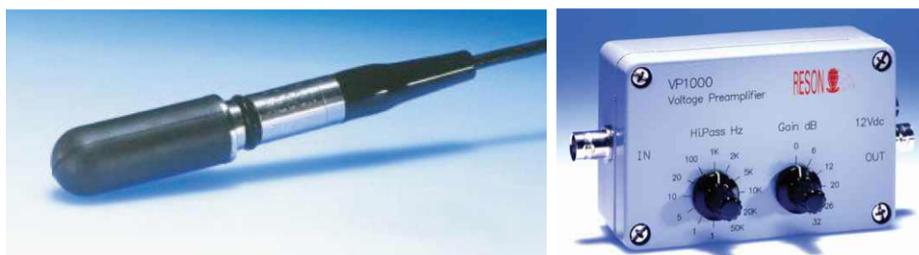


Figura 32: Idrofono Reason TC4013 e preamplificatore Reason EC6061 Vp1000

Il preamplificatore Reason EC6061 Vp1000 (Figura 32) ad alta impedenza d'ingresso consente di eseguire nel range delle basse frequenze misure più precise, a basso rumore con eccellenti prestazioni. Anche il microfono ha una elevata risoluzione con un'ottima risposta lineare nel range delle basse frequenze oggetto di questo studio.

3.8 La costruzione dei fbr, e le analisi dei materiali

I campioni di tubo in vetro borosilicato cilindrico ed ellittico a sezione ovale, sono stati chiusi alla base e unitamente ad altri due tubi di pari diametro e spessore di PVC, sono stati sottoposti ad una serie di test con finalità diverse al fine testare: per le superfici di vetro le caratteristiche di trasmittanza e riflessione della luce e per entrambi le caratteristiche di trasmissione delle onde acustiche.

3.8.1 Le misure spettrofotometriche del fotobioreattore di vetro

Le analisi spettrofotometriche sono state effettuate per mezzo di uno spettrofotometro Shimadzu, modello SolidSpec-3700 (Figura 33), con schema ottico a doppio raggio nel tempo. La strumentazione è a disposizione della Sezione di Fisica Tecnica del Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università degli Studi di Perugia. Lo strumento consente la misura di campioni di dimensioni fino a 700 X 560 X 40 mm (Altezza X Larghezza X Spessore).

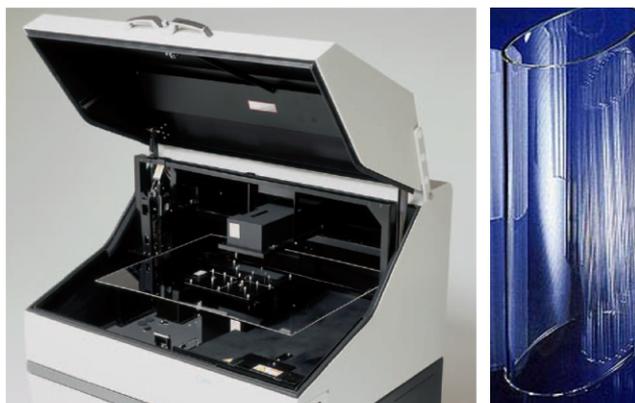


Figura 33: Spettrofotometro SolidSpec-3700 e il particolare del fbr tubo ovale a sezione ellittica esaminato.

Lo spettrofotometro è un dispositivo che consente la misura dell'intensità luminosa in funzione della lunghezza d'onda della radiazione luminosa. Tale strumentazione è solitamente costituita da quattro elementi principali:

- sorgente di radiazione;
- selettore di lunghezza d'onda (monocromatore);
- rivelatore di radiazioni (detector);
- sistema di elaborazione del segnale.

La sorgente ed il rivelatore si trovano alle due estremità del percorso ottico mentre il campione può seguire o precedere il monocromatore. Nel primo caso è colpito dalle singole lunghezze d'onda selezionate dal selettore, nel secondo caso invece viene colpito da tutte le lunghezze d'onda contemporaneamente. Al fine di migliorare la precisione e l'accuratezza delle misure si utilizzano almeno due sorgenti di radiazione, due monocromatori e due detector.

Le principali caratteristiche dello spettrofotometro utilizzato sono riassunte in tabella 7.

Intervallo spettrale	240-2600nm
Sistema Ottico	Schema a doppio raggio nel tempo
Risoluzione	<0.1 nm
Accuratezza lunghezza d'onda	UV/VIS: ± 0.2 NIR: ± 0.8 nm
Ripetibilità lunghezza d'onda	UV/VIS: inferiore a ± 0.08 nm NIR: inferiore ± 0.32 nm
Sorgenti di radiazione	Lampada a Deuterio (240-310 nm) Lampada a Tungsteno (310-2600 nm)
Detector	Sfera integratrice con: Tubo fotomoltiplicatore (240-870 nm) Fotodiodo all'arseniuro di Gallio ed Indio (870-1650 nm) Fotodiodo al solfuro di Piombo (1650-2600 nm)
Monocromatori	2 (ognuno dei quali con 2 reticoli di diffrazione)

Tabella 7: Principali caratteristiche dello spettrofotometro Shimadzu SolidSpec-3700

L'uso di una lampada a Deuterio rende possibile l'emissione di una radiazione significativa e stabile nel campo dell'UV, mentre quella a Tungsteno copre in modo adeguato tutte le restanti regioni dello spettro luminoso. L'alta sensibilità dello strumento è garantita da un sistema che integra 3 detector: un *tubo fotomoltiplicatore* per l'ultravioletto ed il visibile, un *fotodiodo all'arseniuro di Gallio ed Indio* per la prima porzione dell'infrarosso ed un *fotodiodo al Solfuro di Piombo* per la seconda porzione dell'infrarosso. I parametri direttamente misurabili con tale strumento sono i seguenti:

- coefficiente di trasmissione diretta assoluta (si considera solo l'energia che esce dal campione in esame in modo perpendicolare alla sua superficie);
- coefficiente di trasmissione diffusa assoluta (si considera solo l'energia che esce dal campione con un angolo rispetto alla normale della sua superficie superiore a 5°);
- coefficiente di trasmissione totale assoluta;
- coefficiente di riflessione speculare relativa ad uno specchio argenteo;
- coefficiente di riflessione diffusa e totale relativa ad un campione "bianco" di riferimento;
- assorbanza.

Come "bianco" di riferimento il laboratorio di Fisica Tecnica ha a disposizione due diversi campioni:

- Piastra con applicazione in superficie di Solfato di Bario;
- Piastra con applicazione in superficie di Spectralon.

Di entrambi i riferimenti sono disponibili i coefficienti di riflessione assoluta, pertanto è possibile ricavare una stima del coefficiente di riflessione speculare, diffusa e totale assoluto dei campioni in esame.

Lo spettrofotometro rende possibile la determinazione di alcuni degli indici sintetici riportati nella UNI EN 410:2011 ovvero:

- fattore di trasmissione luminosa;
- fattore di riflessione luminosa;
- fattore di trasmissione diretta dell'energia solare,
- fattore di riflessione solare diretta;
- fattore di riflessione UV;
- Resa del colore.

Le prove fotometriche sulla trasmissione della luce nel prototipo di fbr sono state circoscritte all'intervallo da 400 a 700 nm della radiazione luminosa fotosinteticamente attiva, al fine di verificare l'efficienza nella trasmissione della luce tenuto conto dell'assorbimento da parte delle due superfici laterali attraversate e soprattutto la riflessione che si supponeva essere inferiore per il minore raggio di curvatura.

I valori cercati in questo esperimento erano quelli relativi all'assorbimento della radiazione luminosa nella regione del PAR e della riflessione ipotizzata a causa della curvatura della superficie laterale esposta alla luce artificiale (vedi Tabella 8).

Il valore della trasmissione diretta al singolo strato di vetro (superficie laterale del fbr) è stato ottenuto rapportando il valore percentuale della trasmissione diretta rilevata su ciascuna superficie laterale del fbr di vetro per la frazione percentuale rapportata all'unità della riflessione speculare assoluta. Dal valore ottenuto è stata estratta la radice quadrata.

Si riportano qui di seguito i valori ottenuti dalla prova sul fbr.

Analisi allo spettrofotometro della superficie del fbr di vetro nell'intervallo del PAR 400-700 nm						
Lunghezze d'onda (nm)	Misure specchio di riferimento	Riflessione "assoluta" dello	Misura di riflessione speculare	Trasmissione e diretta del campione	Trasmissione diretta del singolo	Assorbimento Vetro
400	75,0	70,4	4,2	80,5	89,6	6,1
410	74,8	70,6	4,2	80,5	89,7	6,1
420	74,5	70,6	4,2	80,6	89,7	6,1
430	74,1	70,5	4,2	80,7	89,8	6,0
440	73,4	70,2	4,2	80,8	89,8	6,0
450	72,8	70,0	4,2	81,0	89,9	5,9
460	72,6	69,9	4,4	81,3	90,1	5,6
470	72,0	69,4	4,2	81,4	90,1	5,7
480	71,0	68,6	3,9	81,6	90,2	5,8
490	70,0	67,7	4,0	81,8	90,4	5,6
500	69,8	67,7	4,1	82,0	90,5	5,5
510	69,5	67,5	4,1	82,1	90,5	5,4
520	69,3	67,3	4,1	82,2	90,6	5,3
530	69,0	67,1	4,2	82,3	90,6	5,2
540	68,6	66,9	4,2	82,4	90,7	5,1
550	68,2	66,5	4,1	82,5	90,8	5,1
560	68,0	66,4	4,1	82,6	90,8	5,1
570	68,8	67,2	4,3	82,6	90,8	5,0
580	67,4	65,9	4,1	82,7	90,8	5,0
590	67,1	65,6	4,1	82,7	90,9	5,0
600	67,0	65,7	4,1	82,7	90,9	5,0
610	66,8	65,4	4,1	82,8	90,9	5,0
620	66,5	65,2	4,1	82,9	91,0	4,9
630	66,3	65,0	4,1	82,8	90,9	4,9
640	66,0	64,7	4,1	82,9	91,0	4,9
650	65,8	64,6	4,1	82,8	90,9	5,0
660	65,7	64,5	4,2	82,8	90,9	4,8
670	64,6	63,5	3,8	82,9	91,0	5,2
680	64,5	63,4	4,0	82,9	91,0	5,1
690	64,5	63,4	4,0	82,8	90,9	5,1
700	64,4	63,3	4,0	82,8	90,9	5,0

Tabella 8: Misura della trasmissione, assorbimento e riflessione della luce sulle superfici laterali del prototipo di fbr a sezione ovale nell'intervallo delle lunghezze d'onda fotosinteticamente attive PAR da 400 a 700 nm.

Questa particolare conformazione del tubo ovale di fbr con la diagonale minore pari al raggio del tubo cilindrico, incrementa del 12 % circa la superficie laterale esposta alla radiazione luminosa che tra l'altro presenta un leggero grado di curvatura, riduce la quantità di radiazione luminosa riflessa. La sezione del tubo ovale misura 140 x 68 mm (sp. 3 mm), quello cilindrico ha invece il diametro pari a 140 mm (sp. 3 mm).

E' stata osservata una certa linearità nella risposta nel range delle lunghezze d'onda osservate, con una riflessione della luce compresa in valore percentuale tra il 3,8 e il 4,2 % e un ridotto valore di assorbimento. Entrambi queste caratteristiche, hanno permesso in seguito di studiare e testare un metodo rapido di misura del valore di assorbanza con cui monitorare la crescita delle colture.

Le buone caratteristiche spettrali hanno permesso così di effettuare misure di irradianza direttamente sulla parete laterale del fbr diametralmente opposta alla fonte luminosa e di valutare le caratteristiche spettrali della luce uscente dal fbr, ricca di informazioni attribuibili a fenomeni di scattering e di ombreggiamento cellulare frapposti al cammino ottico della luce, che altrimenti non sarebbero state rilevate o sarebbero risultate alterate.

3.8.2 Le analisi Laser Doppler Vibrometer LDV

L'LDV è un trasduttore ottico usato per determinare la velocità di vibrazione e lo spostamento in un punto fissato. La tecnologia è basata sull'effetto doppler misurando lo spostamento di frequenza di una luce riflessa dalla superficie in movimento.

Effetto Doppler

Se l'onda è riflessa da un oggetto in movimento e rilevata da un sistema di misura (LDV), la misura dello spostamento in frequenza dell'onda può essere descritto dalla formula:

$$f_D = 2v/\lambda$$

Il vibrometro laser doppler (LDV) utilizzato di Figura 34 prodotto dalla POLYTEC è composto dall'ottica OFV-505 accoppiata al controller OFV-5000; questo sistema è della famiglia di vibrometri single point senza contatto e permette quindi di misurare frequenze, velocità e spostamenti in un punto. La lunghezza d'onda è di 633 nm.



Figura 34: PSV – 500 Scanning Vibrometer Polytec⁵

Analisi Modale

Con l'analisi modale si è cercato di descrivere le proprietà dinamiche in termini di frequenza, oscillazione e forme modali dei fbr di vetro e PVC. Dalle misure delle risposte in frequenza delle strutture sottoposte ad eccitazione, sono stati acquisiti i modi di vibrazione lungo la superficie dei fbr esaminati nonché le frequenze di risonanza del sistema.

Utilizzando i dati nel dominio del tempo e portandoli nel dominio della frequenza attraverso la FFT possiamo “creare” la FRF. Il dominio delle frequenze è un sistema di riferimento molto usato in queste applicazioni; il vantaggio analitico è che le equazioni differenziali nel dominio del tempo diventano equazioni algebriche nel dominio della frequenza. È possibile notare che ci sono dei picchi che si verificano in corrispondenza delle frequenze di risonanza del sistema; inoltre questi picchi capitano alle frequenze nelle quali, nel dominio del tempo, c'è il massimo della risposta, corrispondente alla frequenza di oscillazione dell'eccitazione in ingresso. Il grafico delle deformazioni a queste frequenze naturali assume una varietà di forme diverse, in base a quale frequenza che viene usata per la forza eccitante.

⁵ <http://www.polytec.com/eu/solutions/vibration-measurement/basic-principles-of-vibrometry/>

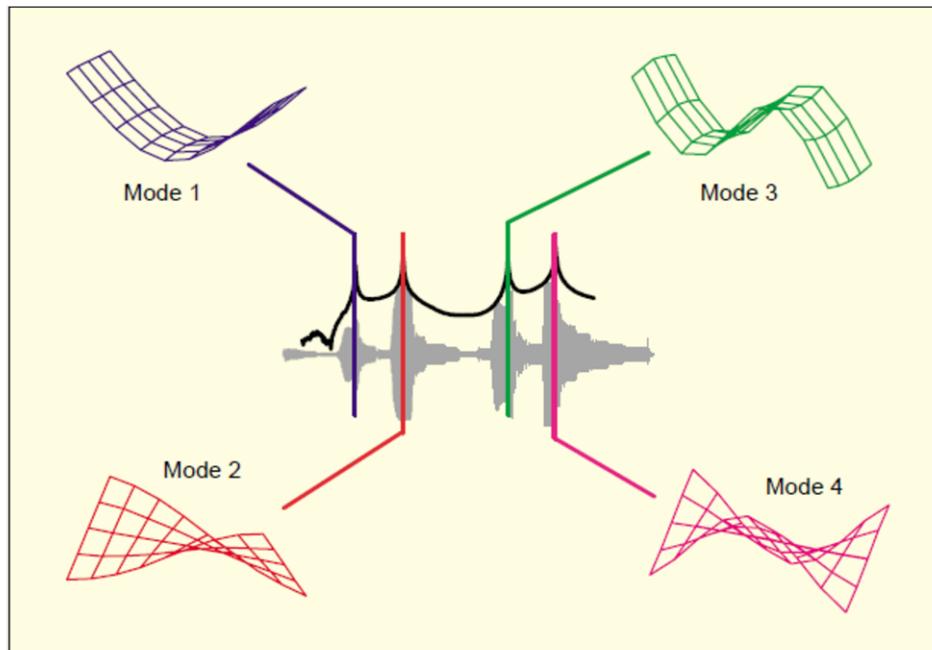


Figura 35: Forme modali di una lastra piana.

Così è possibile notare che, avvicinandosi con la frequenza di eccitazione alla frequenza modale, lo schema di deformazione arriva via via ad assomigliare sempre più alla forma modale corrispondente al modo stesso; invece, allontanandosi dalla frequenza modale, ed eccitando quindi la struttura ad una frequenza intermedia tra due modi successivi, si nota la vera differenza tra i dati modali e i dati operativi.

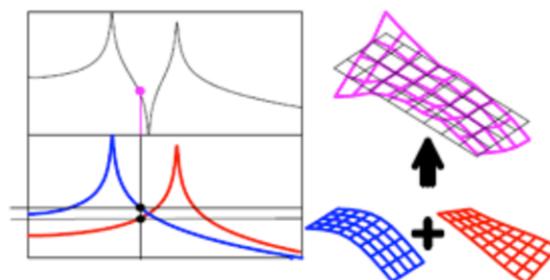


Figura 36. Diverse forme modali

Infatti, sembra che la deformazione non assomigli a nessuna delle 2 forme modali; questo avviene poiché i dati operativi sono una combinazione della prima e seconda forma modale e quindi la deformazione associata avrà alcune caratteristiche della prima ed altre della seconda forma.

Quando si va ad acquisire i dati operativi, non si ottiene la FRF ma di solito si acquisisce lo spettro in uscita. Considerando ciò non è molto chiaro perché i dati operativi assomiglino alle forme modali. L'ingresso applicato alla struttura di solito è molto ampio in frequenza e sono eccitati più modi contemporaneamente; ma, comprendendo come ognuno dei modi contribuisce ai dati operativi, è più facile vedere come tutti i modi contribuiscono alla risposta totale del sistema.

LMS Modal Analysis

La sezione LMS Test.Lab Modal Analysis ci permette di raccogliere e organizzare le FRFs per avere una visione comprensibile dei dati disponibili e per facilitare una selezione/de selezione delle stesse. Risulta immediato creare un grafico delle varie FRFs secondo varie scale, cambiare la risoluzione degli assi o confrontare più FRFs su uno stesso range di frequenza. Inoltre fornisce i parametri modali necessari per una corretta stabilizzazione del grafico della FRF in modo da facilitare la selezione dei picchi; tali picchi si possono utilizzare nella sezione PolyMax in cui ad essi sono associate i modi propri di vibrare della struttura, visualizzabili anche attraverso una specifica animazione della geometria.

Prove di laboratorio

Le prove di laboratorio sono state effettuate al fine di riuscire a caratterizzare il comportamento del tubo alla sollecitazione impulsiva data dal martello strumentato, prendendo in considerazione l'uscita dell'LDV e dell'idrofono quando il tubo è pieno d'acqua, mentre solo il vibrometro per il caso di tubo vuoto.

In prima analisi possiamo descrivere il cilindro cavo e aperto da un lato utilizzato per la nostra simulazione, partendo dalle caratteristiche geometriche dello stesso, dalle proprietà fisiche del vetro, entrambe riassunte nella tabella seguente.

Geometria	
Diametro Esterno	130 mm
Spessore	3 mm
Altezza	730 mm
Caratteristiche del materiale	
Densità	2400 – 4800 kg/m ³
Durezza Vickers	4,59 – 5,27 kN/mm ²
Modulo di Young	37 - 99 GPa
C. di Poisson	0.22
T. di fusione	2000° C

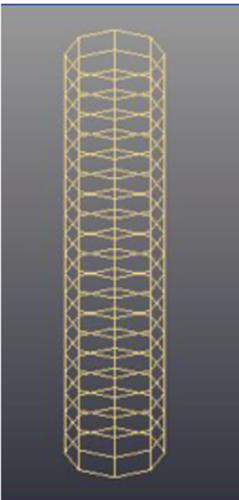


Figura 37: Proprietà e geometria del fbr di vetro a sinistra. Nella foto di destra la modellazione software LMS del cilindro di vetro.

Per la modellazione all'interno del software LMS si è scelto di suddividere il cilindro in 21 circonferenze equamente distribuite lungo l'asse con una distanza di 30 mm; su ogni circonferenza sono stati scelti 8 punti con una risoluzione angolare di 45 °, che sono la sede dei test d'impatto con il martello strumentato; un'immagine estratta direttamente dal software è riportata nella figura, in cui si evidenzia la discretizzazione effettuata.

I test sono stati eseguiti variando le condizioni operative della prova, in particolare sono state scelte 6 situazioni differenti per caratterizzare in maniera più completa possibile il test:

- Tubo vuoto
- Tubo pieno d'acqua fino ad un'altezza di 630 mm
- Tubo pieno con aggiunta di 100 mL di acqua
- Tubo pieno con aggiunta di 200 mL di acqua
- Tubo pieno con aggiunta di 100 mL di alghe
- Tubo pieno con aggiunta di 200 mL di alghe

3.8.3 La costruzione delle basi di appoggio per i fbr e smorzamento delle vibrazioni

Le basi di appoggio per i 12 fbr (Vedi paragrafo 4.1.5), sono state realizzate sulla scorta delle indicazioni ricevute al momento dell'effettuazione delle analisi LDV sul fbr e sull'attuatore acustico. L'esigenza primaria è stata quella di isolare acusticamente le vibrazioni prodotte in ciascun fbr durante i programmi di stimolazione al fine di non creare interferenze che avessero potuto invalidare i nostri test sperimentali.

Come regola generale per il dimensionamento, è stato scelto un doppio materiale (marmo /legno) in modo tale da fornire una buona massa inerziale che per garantire l'isolamento doveva essere di peso almeno cinque volte superiore alle masse inerziali in movimento che nel nostro caso erano pari al peso del fbr e dei 4 litri di coltura microalgale, oltre al peso dell'attuatore acustico.

Risultati e Discussione

Le attività sperimentali di questo progetto di ricerca, sono state articolate in quattro distinte sessioni suddivise in paragrafi.

Nella prima sessione vengono descritte analiticamente le attività di studio sulle geometrie di fbr da impiegare per la realizzazione del banco sperimentale seriale con 12 fbr e i risultati ottenuti con l'esperimento pilota.

Nella seconda sessione, sono illustrate le problematiche incontrate nelle attività sperimentali e le soluzioni tecniche adottate, risultate poi innovative per l'elevato grado di originalità introdotto. In particolare, (nella terza sessione) è stato ingegnerizzato un nuovo dispositivo di agitazione per le colture cellulari e sono stati introdotti metodi rapidi e non invasivi per il monitoraggio e lo studio delle cinetiche di crescita basate sulla distribuzione dimensionale nel tempo delle cellule e degli aggregati.

Sono state poi introdotte due nuove metodiche per il monitoraggio della crescita delle colture microalgali di tipo ottico e acustico, riuscendo così ad ottenere un sistema di misura rapido, automatizzabile e riproducibile con cui poter gestire una sperimentazione sincrona con 12 fbr.

Nella quarta e ultima sessione, con l'ausilio di un disegno fattoriale, sono state condotte due distinte sperimentazioni allo scopo di individuare i parametri acustici più efficienti per la crescita delle microalghe.

Prima Sessione

4.1 Studio e prove sui materiali da costruzione per la realizzazione di un banco sperimentale per lo studio della crescita microalgale in funzione delle stimolazioni acustiche.

Il primo problema affrontato nella realizzazione del banco sperimentale è stato la scelta del materiale più idoneo (PVC – vetro) per la costruzione del fotobioreattore che ha richiesto uno studio approfondito del comportamento dei diversi materiali disponibili in funzione del trasferimento del suono e della luce artificiale al mezzo di coltura.

In seguito sono state eseguite prove preliminari allo scopo di testare e ottimizzare la trasmissione del suono nel mezzo di coltura mediata dalle vibrazioni delle pareti del fotobioreattore. In questa fase si è rivelato importante ottimizzare la geometria del fbr anche in funzione della trasmissione delle onde sonore e delle radiazioni elettromagnetiche prodotte dalle fonti artificiali.

Una volta definita in maniera preliminare la geometria e i materiali del fotobioreattore ed il trasduttore acustico da impiegare, era necessario riuscire a valutare il comportamento dei materiali vetro e PVC con le diverse sezioni ellittica e circolare per quanto concerne il trasferimento al mezzo acqua dell'energia acustica vibrazionale prodotta dal trasduttore.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di prevedere gli effetti ed il comportamento vibrazionale di un fluido all'interno dei tubi di vetro e pvc chiusi alla base.

E' stato così messo a punto un set-up di misura e di analisi dei dati attraverso cui fosse possibile compiere diverse tipologie di prove in varie situazioni da mettere a confronto per comprendere a fondo il problema. Il punto focale del problema risiede nella previsione delle frequenze di vibrazione trasmissibili in maniera ottimale al fluido tramite eccitazione strutturale dei tubi, poiché tramite vibrazioni è possibile ottenere un incremento nelle funzioni biologiche delle alghe e da tale previsione sarà possibile stabilire il campo di funzionamento. L'elaborazione dei dati e l'analisi modale ha permesso di caratterizzare al meglio il comportamento del modello agevolando il confronto fra le varie prove e mettendo in risalto gli aspetti rilevanti che in questo modo possono essere facilmente estesi al funzionamento in campo industriale.

4.1.1 Analisi del fbr con la tecnica Laser Doppler Vibrometer (LDV)

Da questa sperimentazione è emerso che il tubo fbr che ha risposto meglio alla trasmissione delle onde sonore è stato quello a sezione ellittica rispetto a quello cilindrico dove, invece, sono stati osservati fenomeni di moti radiali che nella trasmissione delle onde sonore provocavano la dispersione dell'energia acustica rendendo irriproducibile le frequenze sonore impiegate.

Viceversa la geometria del tubo a sezione ellittica si è rivelata ottimale per la riproducibilità delle onde acustiche in acqua. Questa particolare conformazione presenta sulle estremità del diametro maggiore dell'ellisse un accentuato ispessimento del materiale che gli conferisce una rigidità tale da consentire il trasferimento della vibrazione sulle pareti laterali lungo la direttrice dell'asse minore.

Questa particolare conformazione geometrica, (vedi Figura 1) inoltre massimizza anche la trasmissione delle radiazioni luminose all'interno della coltura microalgale. Ciò è dovuto a due importanti effetti: la riflessione della luce a causa del raggio di curvatura della superficie laterale del tubo esposta alla fonte luminosa (minore è il raggio di curvatura del tubo, minore è la riflessione della luce), e il diverso grado di penetrazione della radiazione luminosa all'interno della coltura microalgale a causa dei fenomeni di scattering e ombreggiamento cellulare che si manifestano nel corso della crescita con l'aumento del numero di cellule.

4.1.1.1 Analisi dei risultati - Comportamento del tubo fbr vuoto e pieno

Dalla procedura descritta precedentemente abbiamo ricavato la funzione di risposta in frequenza complessiva (cioè calcolata sommando il contributo relativo a tutti i punti di misurazione) della struttura priva d'acqua.

Il grafico presenta in ascissa le frequenze operative misurate in Hz, mentre in ordinata è stata utilizzata una scala logaritmica per poter visualizzare meglio i picchi di risonanza e antirisonanza, in quanto andiamo a comprimere la scala; la formula utilizzata e ripetuta anche per gli grafici relativi all'FRF's dell'LDV è la seguente:

- $10 \log_{10} (a/arif)$

dove per a prendiamo l'ampiezza della FRF e per arif il valore 10^{-3} . Ovviamente l'unità di misura dell'ampiezza è quella FRF, ossia (m/s)/N (uscita/ingresso).

Tubo Vuoto [Hz]	Tubo Pieno [Hz]
508.693	263.544
1169.600	386.397
1431.701	760.862
1467.369	824.259
1878.034	977.15
2045.663	1127.824
2347.064	1500.400
2729.344	1566.097
2954.715	1696.033
3159.422	1837.346

Tabella 1: Frequenze proprie del tubo vuoto e del tubo pieno

Le frequenze proprie del tubo vuoto, e del tubo pieno deducibili dall'analisi grafica della FRF, sono:

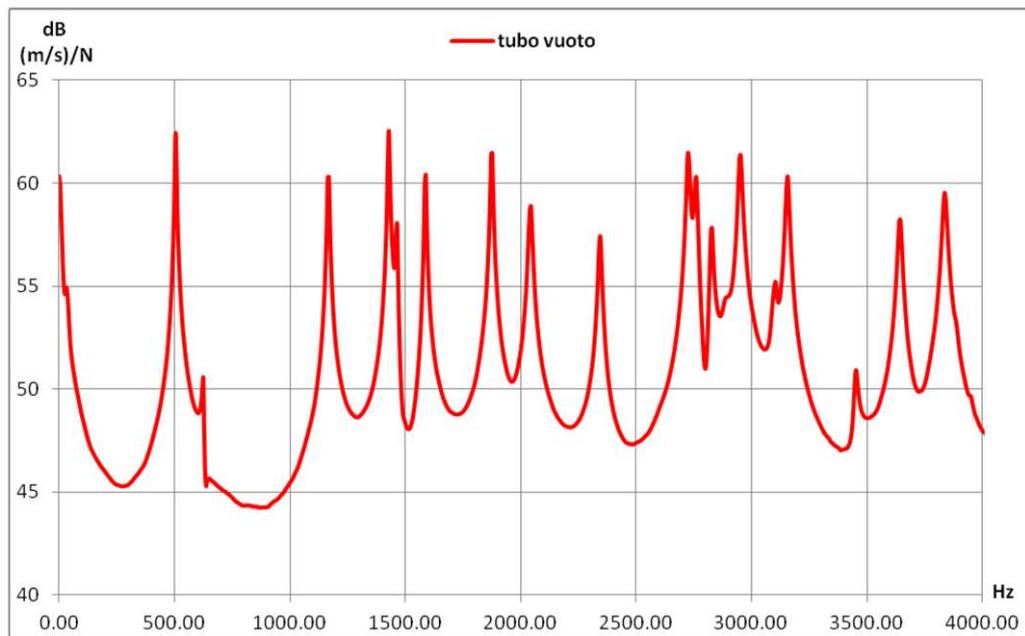


Figura 1: FRF del tubo vuoto.

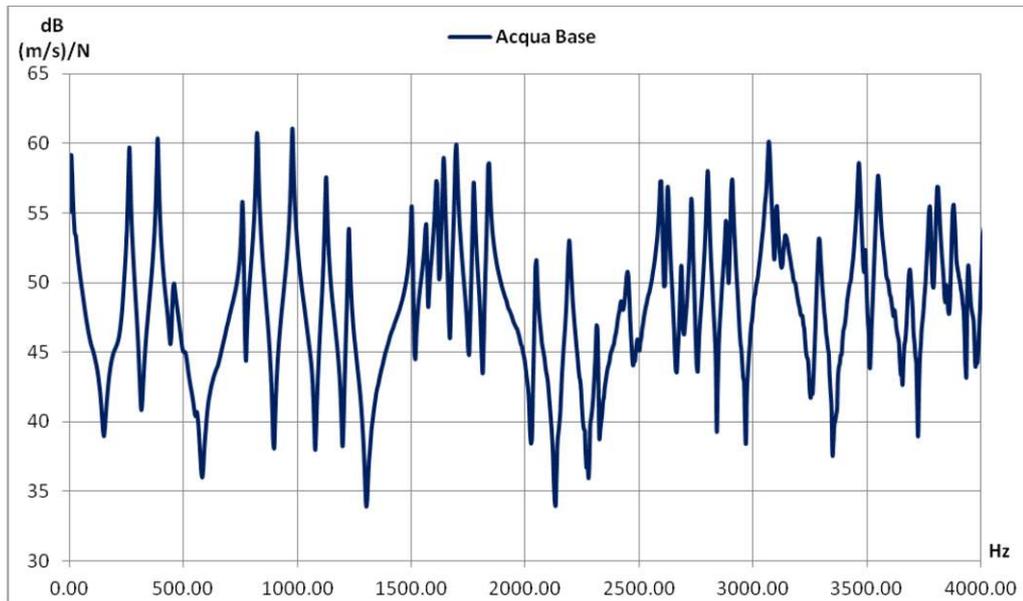


Figura 2: FRF del tubo pieno.

4.1.1.2 Confronto Tubo Vuoto e Tubo Pieno

Per poter visualizzare le differenze tra i comportamenti vibrazionali della struttura nei due casi considerati mostriamo ora una sovrapposizione delle FRF nel caso del tubo vuoto e del tubo pieno:

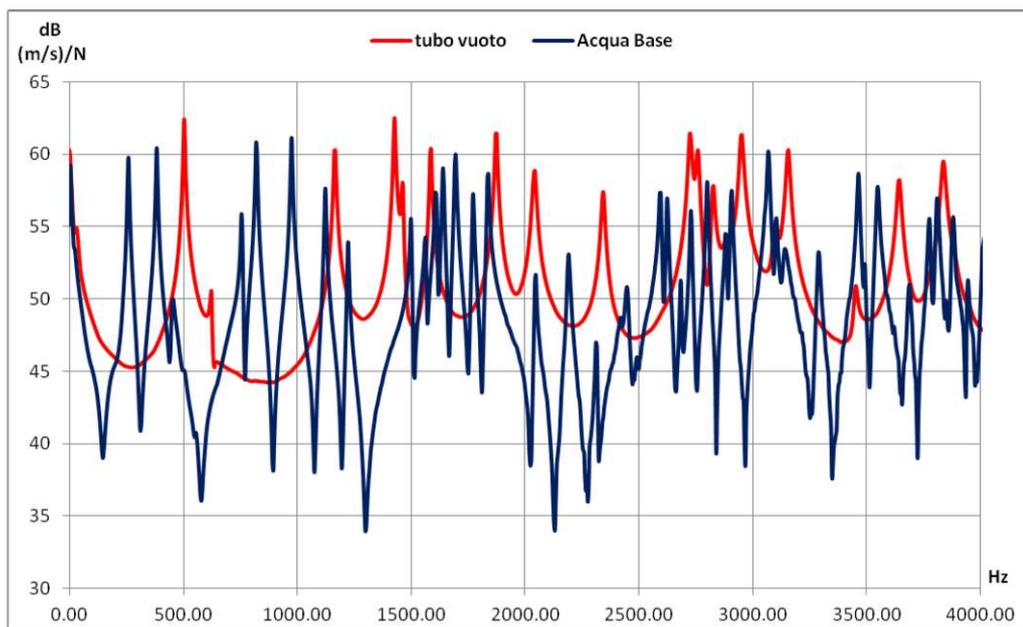


Figura 3: Confronto tra le FRF dei tubi fbr vuoto e pieno.

A prima vista si nota una diminuzione dei valori di quasi tutti i picchi delle ampiezze relative al tubo pieno d'acqua in quanto un aggiunta di massa all'interno della struttura provoca uno smorzamento delle vibrazioni trasmesse.

Ora analizziamo più in dettaglio le due funzioni: ciò che vogliamo ottenere è correlare i comportamenti della struttura nei due diversi casi studiati osservando a quali frequenze si hanno le stesse deformazioni strutturali, quindi a quali frequenze i modi di vibrare sono simili. Per fare ciò si effettua una comparazione grafica delle varie animazioni relative agli spostamenti della struttura, sviluppate direttamente dal programma LMS.

Tali considerazioni sono state riassunte nella tabella seguente:

Tubo Pieno [Hz]	Tubo Vuoto [Hz]	MODI
263.544	508.693	1A - 1C
386.397	1169.600	2A - 1C
760.862	1431.701	1A - 2C
824.259	1467.369	2A - 2C
977.15	1878.034	3A - 2C
1127.824	2045.663	3A - 1C
1500.400	2347.064	4A - 2C
1566.097	2729.344	3A - 3C
1696.033	2954.715	4A - 3C
1837.346	3159.422	1A - 3C

Tabella 2. Confronto frequenze proprie.

Si può notare facilmente come ci sia un dimezzamento della frequenza modale nel passaggio dalla configurazione da tubo vuoto a quella con tubo pieno; tale riduzione come già detto è da imputare all'aumento di massa della struttura dovuto all'aggiunta di acqua all'interno del cilindro. Tuttavia tale corrispondenza tra i due casi non è sempre precisa: questo può dipendere dalla forma modale stessa poiché l'aumento di massa influisce in maniera diversa sulle varie modal shapes.

A titolo di esempio riportiamo una parte del grafico tra 100 e 800 Hz in cui evidenziamo come per lo stesso comportamento modale ci sia una riduzione del livello in dB dell'ampiezza della FRF; per il tubo vuoto abbiamo un valore di circa 63 dB, mentre per quello pieno l'ampiezza risulta circa 60 dB.

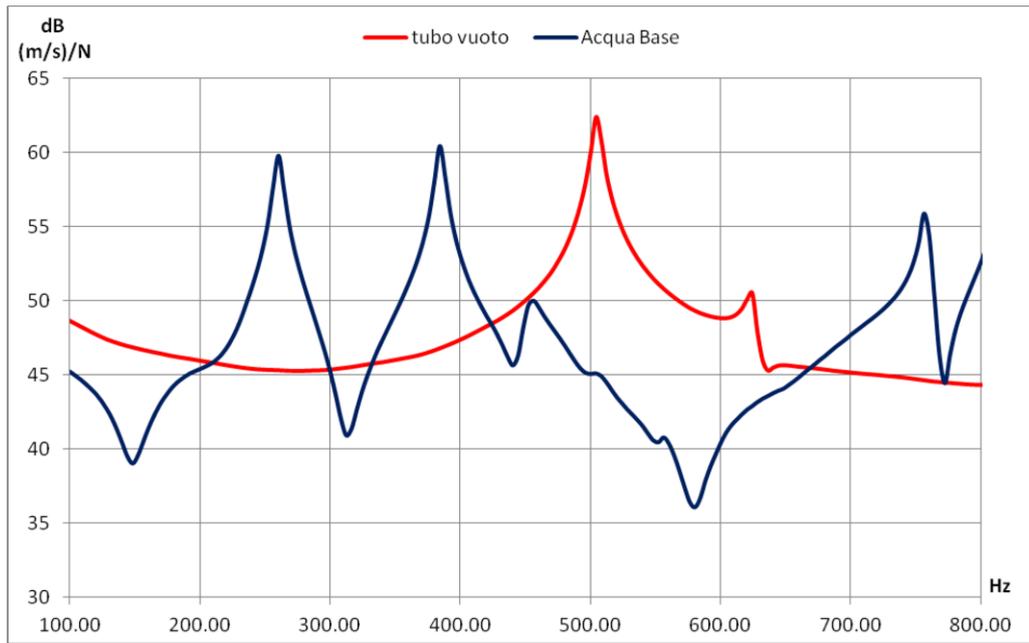


Figura 4: Ingrandimento grafico 100 - 800 Hz con evidenziati i livelli di ampiezza.

Qui di seguito sono state ingrandite le finestre FRF 200-1300; 0-600; 700-1500 e 1500-2900 Hz.

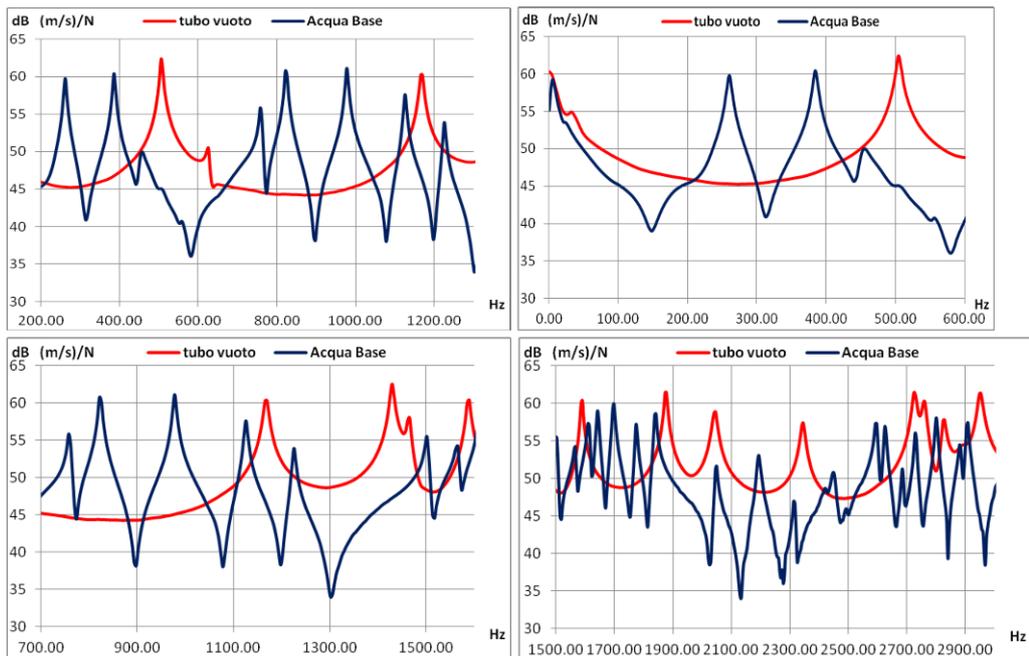


Figura 5: Il particolare delle FRF 200-1300; 0-600; 700-1500 e 1500-2900 Hz.

In seguito sono mostrati i confronti effettuati per alcuni modi caratteristici, affiancando le immagini del tubo pieno, del tubo vuoto e della porzione del grafico della FRF relativo a quel range di frequenza. Per rappresentare al meglio i comportamenti simili della struttura si è scelto di visualizzarla attraverso quattro differenti viste: i tre piani spaziali e l'assonometria. Grazie a questa funzione denominata "Quadgeometry" si riescono a notare immediatamente i modi circolari e assiali.

4.1.1.3 Confronto FRF's calcolate dall'Idrofono e dall'LDV

In questo paragrafo descriviamo il confronto tra le FRF's calcolate dagli ingressi relativi all'idrofono e al LDV nel caso del tubo pieno fino a 630 mm. Lo scopo è quello di riuscire ad individuare le frequenze per le quali la trasmissione delle vibrazioni risulta essere favorita: questo avviene quando, alla stessa frequenza, il picco di risonanza misurato con l'LDV va a sovrapporsi al picco di risonanza misurato con l'idrofono; fisicamente tale sovrapposizione comporta un miglioramento della trasmissione delle vibrazioni sia attraverso il vetro del tubo sia attraverso l'acqua al suo interno.

Allo stesso modo andremo a determinare a quali frequenze si riscontra un picco di risonanza misurato dall'LDV e contemporaneamente un'antirisonanza dall'uscita dell'idrofono; questo andamento opposto delle FRF comporta che la vibrazione esercitata in ingresso sul vetro non venga trasmessa in maniera ottimale anche dall'acqua, anzi quest'ultima va ad assorbire gran parte del segnale, comportamento assolutamente da evitare per l'obiettivo di questo studio.

Nel grafico seguente sono rappresentate le due FRF's rapportate a due scale di riferimento diverse: nell'ordinata sinistra i dB [(m/s)/N] relativi all'LDV, mentre nell'ordinata di destra i dB [Pa/N] dell'idrofono. Per semplificare la visualizzazione il grafico è stato diviso in due range di frequenza: 0 – 2000 Hz, 2000 – 4000 Hz.

Per quanto riguarda l'unità di misura della FRF relativa all'idrofono, come nel caso dell'LDV, abbiamo utilizzato una scala logaritmica in dB [Pa/N] ottenuti attraverso:

- $20 \log_{10} (a/arif)$ dove per a prendiamo l'ampiezza della FRF e per $arif$ il valore $2 \cdot 10^{-5}$ Pa.

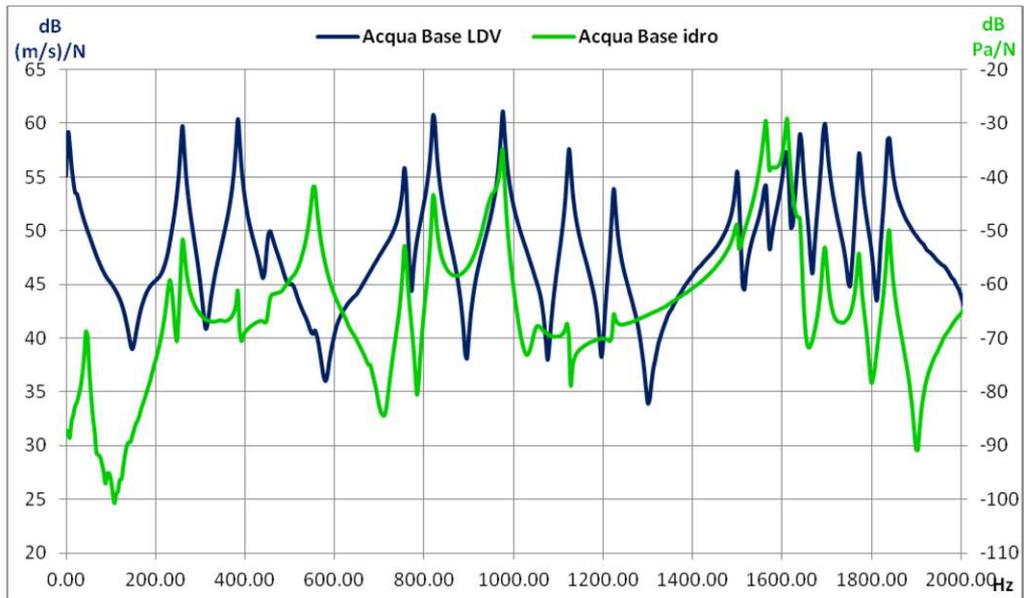


Figura 6: Grafico FRI's 0 - 2000 Hz

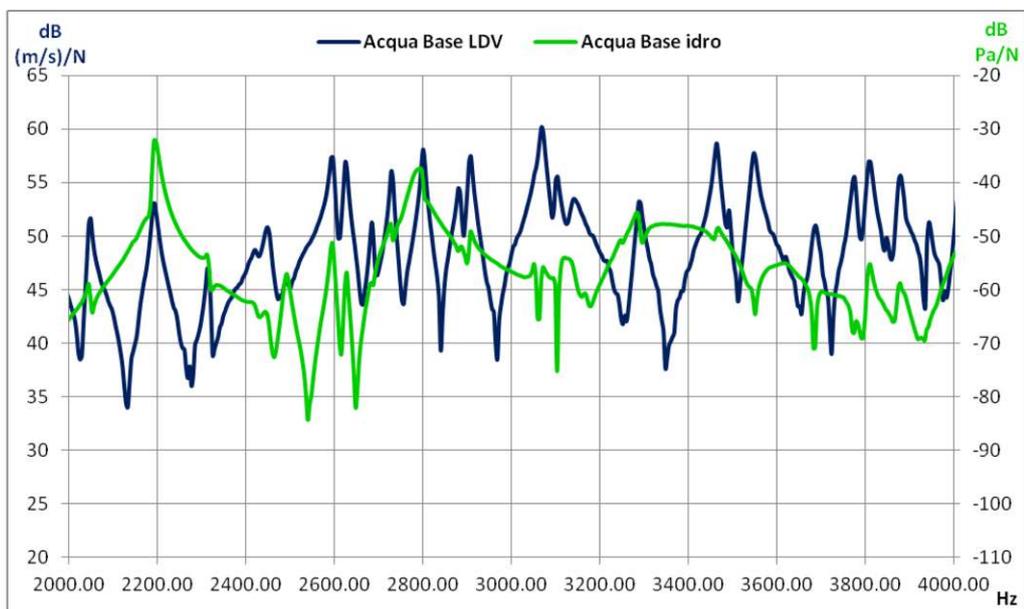


Figura 7: Grafico FRI' 2000 - 4000 Hz

Le frequenze alle quali si riscontra la sovrapposizione dei picchi delle FRF sono le Risonanze di Tabella 5. Nella colonna di destra sono indicate le Antirisonanze dell'acqua rispetto al picco di risonanza del vetro.

Risonanza [Hz]		Antirisonanza [Hz]
260.0	1772.0	552
384.0	1836.0	1128
756.0	2192.0	2440
820.0	2780.0	2588
976.0	3280.0	3060
1564.0	3808.0	3115
1600.0	3876.0	3552
		3684
		3772

Tabella 3: Risonanze e Antirisonanze, (Hz).

Una spiegazione possibile di questa differenza di comportamenti è da attribuire alla diversa velocità di propagazione delle onde di pressione nei due mezzi:

- Acqua: 1482 m/s
- Vetro: 5000 m/s

Poiché le onde nei due mezzi si muovono con velocità notevolmente differenti, si instaurano fenomeni di interferenza costruttiva e distruttiva nella trasmissione della vibrazione.

4.1.1.4 Aggiunta di acqua e alghe

In quest'ultimo paragrafo analizziamo quali effetti comporta l'aggiunta dello stesso quantitativo prima di acqua e poi di alghe rispetto al livello base finora considerato di 630 mm; lo scopo sarà quello di valutare a parità di volume gli effetti sulla FRF calcolata sul driving point.

Andiamo ora a mostrare quattro grafici che rappresentano i casi più significativi:

- Livello base / Livello base +100 ml acqua
- Livello base / Livello base +200 ml acqua
- Livello base +100 ml acqua / Livello base +100 ml alghe
- Livello base +200 ml acqua / Livello base +200 ml alghe

Si è scelto di utilizzare un elevato range di frequenza sull'asse delle ascisse (2500 – 4000 Hz) in quanto alle basse frequenze non è apprezzabile una diversità di comportamento tra i due casi messi a confronto.

Si può facilmente notare come un aumento di massa derivante dall'aggiunta di acqua porti ad uno shift delle frequenze verso valori minori; tale effetto è direttamente proporzionale alla quantità di massa aggiunta.

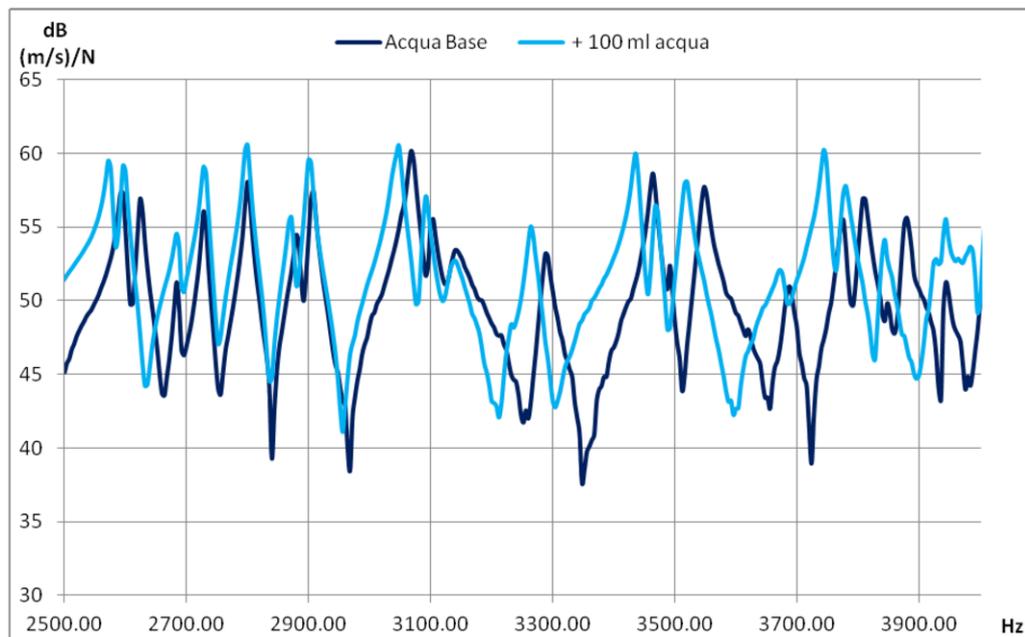


Figura 8: Confronto acqua al livello base con aggiunta di 100 ml di acqua

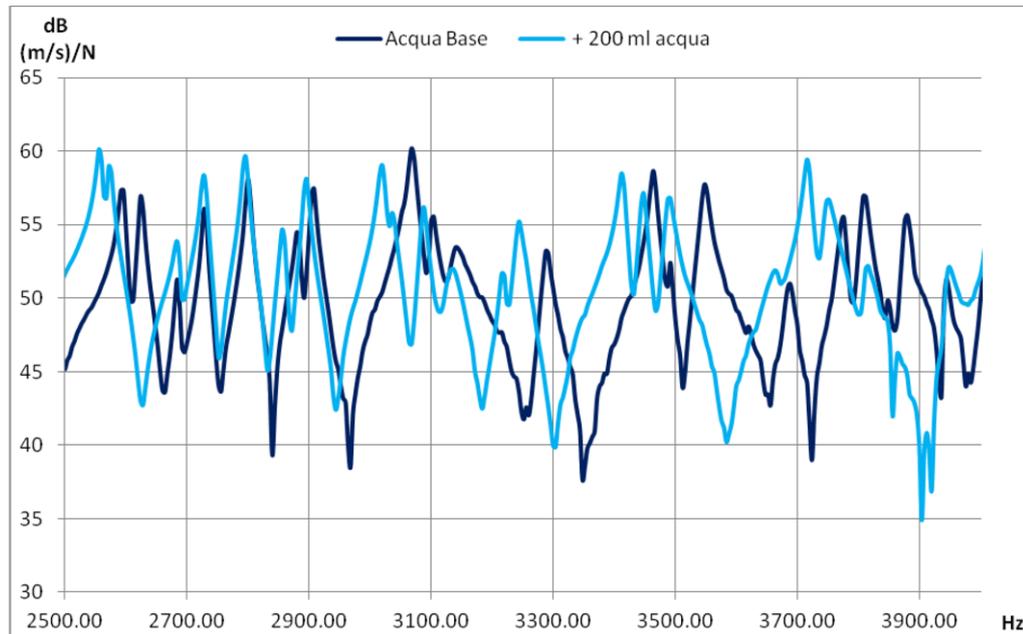


Figura 9: Confronto acqua al livello base con aggiunta di 100 ml di acqua

Considerando invece l'influenza dell'aggiunta di alghe rispetto allo stesso quantitativo di acqua possiamo distinguere due diversi comportamenti: mentre l'aggiunta 100 ml non comporta differenze sostanziali tra le FRF's misurate, già raddoppiando la quantità immessa si nota come le alghe portino ad uno spostamento della relativa curva a frequenze minori rispetto all'acqua. Infatti la pulsazione ω è esprimibile come $\sqrt{k/m}$, funzione della rigidità e della massa del sistema; le alghe, che hanno anche se di poco maggiore massa ma minor rigidità dell'acqua, essendo una massa non coesa, vanno a diminuire la pulsazione stessa del sistema.

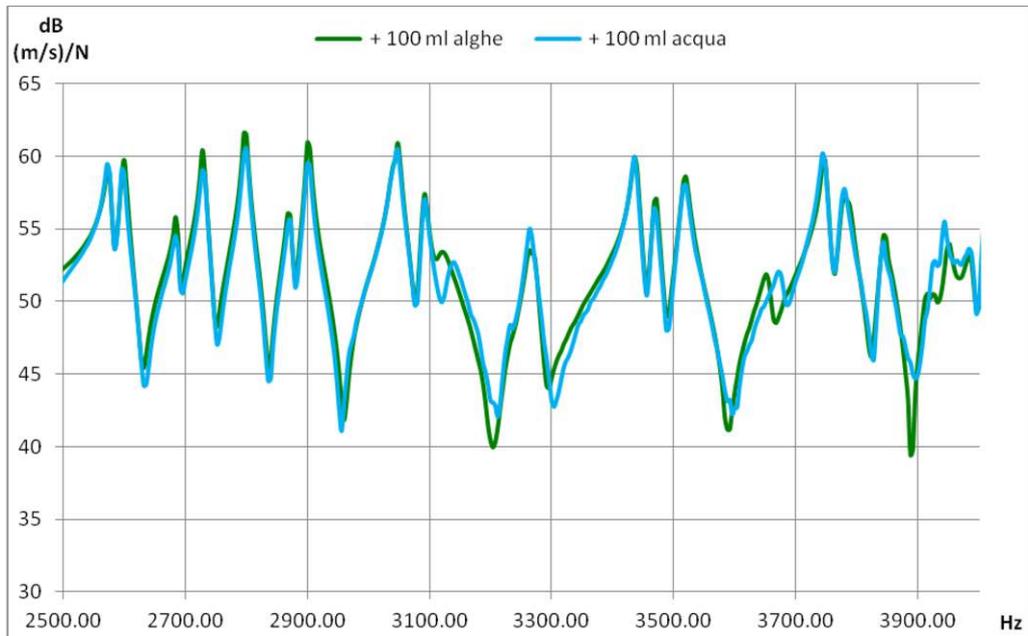


Figura 10: Confronto aggiunta di 100 ml di acqua e con aggiunta di 100 ml di alghe

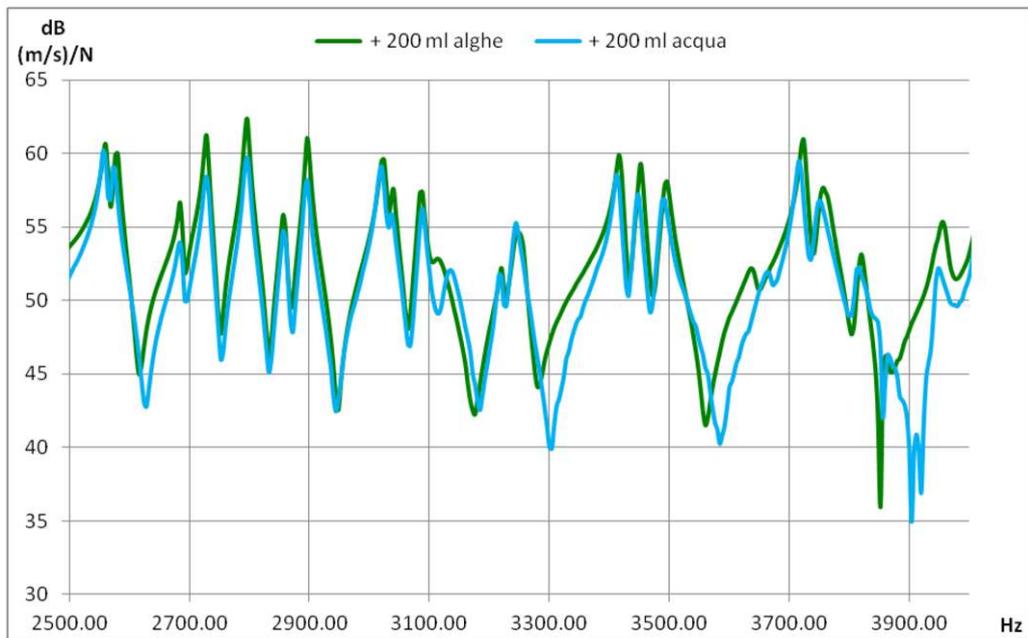


Figura 11: Confronto aggiunta di 200 ml di acqua e con aggiunta di 200 ml di alghe

4.1.2 Le Analisi Laser Doppler Vibrometer sull'attuatore acustico Ottone

Con la stessa tecnica LDV è stato osservato il comportamento dell'attuatore acustico Ottone durante la riproduzione sonora. Sono stati registrati i modi di vibrazione ed è stata rilevata la deformazione istantanea della sua superficie di contatto che trasmette le onde acustiche al fbr (vedi Figura 13). La superficie vibrante dell'attuatore acustico Ottone (vedi Figura 12), è stata ancorata saldamente alla base del fbr di vetro con un sottile disco biadesivo della 3M che assicura il perfetto accoppiamento tra le due superfici essendo stato progettato appositamente per queste applicazioni.



Figura 82: Il particolare dell'ancoraggio dell'attuatore acustico Ottone sulla base del fotobioreattore, con un disco biadesivo della 3M. A destra, è indicata la superficie vibrante oggetto delle analisi LDV.

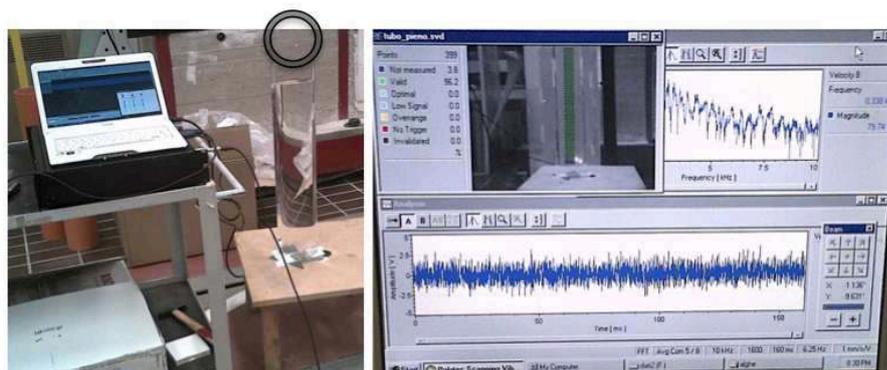


Figura 13: particolare dell'analisi LDV. Nel cerchio il puntino rosso prodotto dal raggio laser che muovendosi lungo tutta la superficie del fbr di vetro posta in vibrazione dall'attuatore acustico, ne rileva le deformazioni istantanee.

Con l'analisi modale della superficie vibrante è stata valutata l'efficienza nella riproduzione dei suoni e sono state così individuati i "buchi nella riproduzione", in altre parole, le regioni dello spettrogramma in cui alcune frequenze sono attenuate a causa delle caratteristiche costruttive proprie dell'attuatore acustico.

Si può notare come la superficie dell'attuatore, apparentemente un corpo solido in ottone, al passaggio della corrente elettrica nella sua componente piezoelettrica magnetostriativa di costruzione, trasmetta al piatto di collegamento queste evidenti deformazioni strutturali, che trasferiranno la loro energia al tubo fotobioreattore in vetro, ponendolo in vibrazione.

Nelle Figure 14 e 15, partendo dalla miniatura di sinistra e disposte per righe è possibile osservare le deformazioni strutturali rilevate dalle analisi LDV, attraverso la scansione con il raggio laser della superficie di contatto dell'attuatore acustico Ottone con la base del fbr, durante la riproduzione dei segnali acustici.

Durante la riproduzione della traccia audio, le vibrazioni prodotte dall'attuatore acustico, caratterizzate da una velocità istantanea, vengono rilevate dal vibrometro laser.

La misura complessiva è costituito da una serie di risposte di vibrazione (generalmente FRF) ottenute in ogni singolo punto sulla griglia e dall'elaborazione con il vibrometro PSV200 sono state create le mappe di velocità per ogni frequenza di risonanza.

Dalle immagini (Figure 14 e 15) relative a due diverse frequenze di risonanza III e V modo di vibrazione, è stato rappresentato il movimento tridimensionale della superficie dell'attuatore acustico investigato.

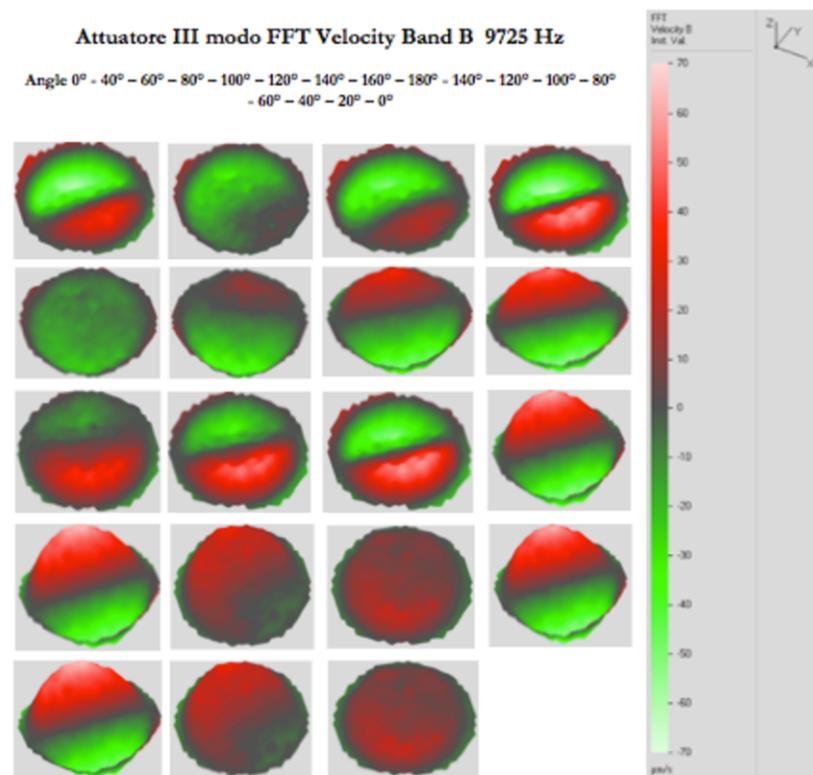


Figura 14: Analisi con la tecnica LDV della superficie di contatto dell'attuatore acustico Ottone - III modo di Oscillazione Banda B – alla frequenza di 9725 Hz.

Attuatore V modo FFT Velocity Band B 15,41 kHz

Angle 0° - 40° - 60° - 80° - 100° - 120° - 140° - 160° - 180° - 140° - 120° - 100° - 80°
- 60° - 40° - 20° - 0°

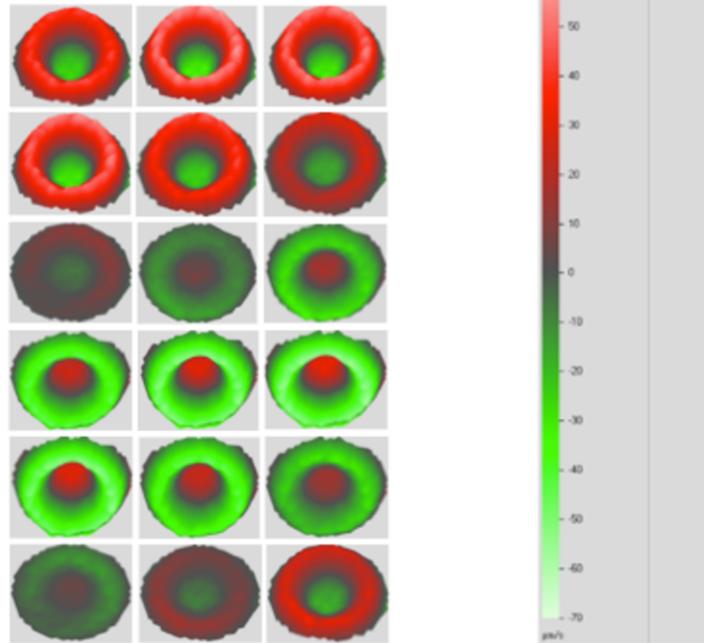


Figura 15: a partire da sinistra è riportata la sequenza delle immagini delle deformazioni strutturali rilevate con la tecnica LDV sulla superficie dell'attuatore posto in vibrazione.

La superficie dell'attuatore acustico che partecipa al trasferimento delle vibrazioni al vetro, assume questa particolare conformazione ad anello mentre la parte centrale della corona circolare oscillante resta ancorata con un perno centrale alla massa oscillante dell'attuatore Ottone.

Quest'analisi si è rivelata particolarmente efficace, perché ha messo in evidenza il comportamento assunto dall'attuatore durante la riproduzione delle frequenze acustiche. Le informazioni sono state impiegate nelle fasi successive di elaborazione e ottimizzazione dei segnali acustici che sono stati impiegati nei diversi programmi di stimolazione acustica.

Si è cercato di superare le criticità costruttive proprie dell'attuatore mostrate nella riproduzione di determinate frequenze acustiche. Per questo motivo, per la riproduzione delle rispettive frequenze di 2 e 6 kHz, sono stati campionate delle tracce audio alle rispettive frequenze di 2.087 e 5.784 Hz.

Il comportamento osservato nella riproduzione sonora dall'Attuatore Ottone è stato rappresentato graficamente in Figura 3 con una linea di colore verde e, messo poi in relazione con il comportamento del fbr nelle due condizioni di lavoro: con e senza acqua.

4.1.3 Ottimizzazione della trasmissione del suono nel sistema accoppiato trasduttore fotobioreattore.

Sempre con la stessa tecnica di analisi è stato osservato il comportamento del tubo fbr nelle due condizioni di tubo vuoto e tubo pieno di acqua con un livello pari a 60 cm. Queste analisi dinamiche hanno confermato i risultati osservati per quanto riguarda i modi di vibrazione del vetro ottenute dalle precedenti analisi LDV e si sono rivelate particolarmente utili per acquisire importanti informazioni comportamentali, utilizzate in seguito per l'ottimizzazione dei suoni che sono stati riprodotti nei vari test sperimentali con le microalghe.

I dati ottenuti da queste analisi dinamiche, sono stati espressi in forma grafica in figura 16, e sono stati impiegati nella elaborazione software per la costruzione delle tracce audio utilizzate nella sperimentazione pilota e nelle batterie di test del disegno fattoriale volte a individuare i parametri di frequenza ed intensità di segnale più efficienti per la crescita delle colture microalgali.

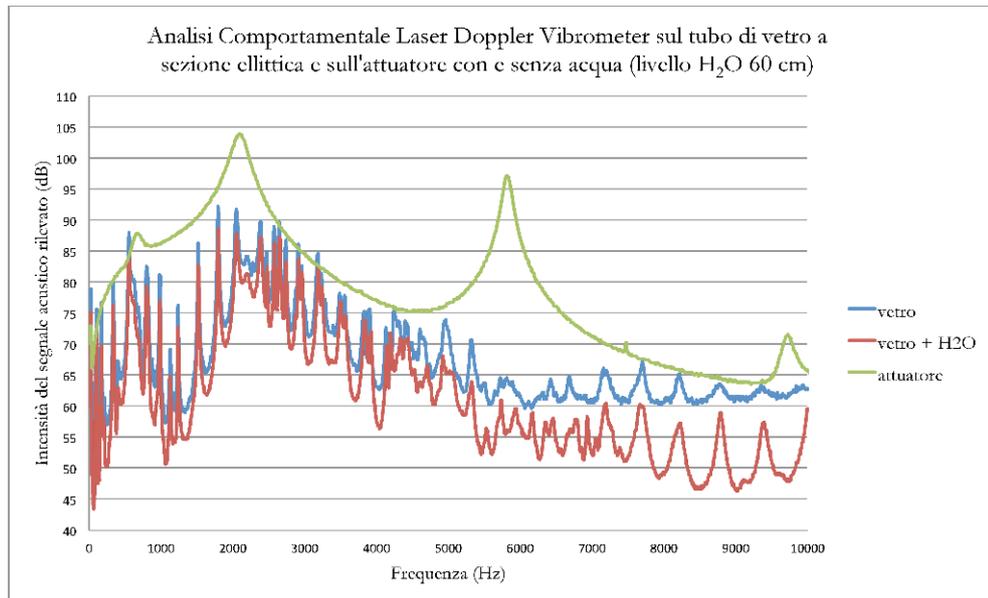


Figura 16: La risposta in frequenza rilevata con le analisi Laser Doppler Vibrometer sulla superficie laterale del fbr e sulla superficie di contatto dell'attuatore acustico, nelle due condizioni di tubo vuoto e tubo pieno di acqua con livello pari a 60 cm.

Com'è possibile osservare nel grafico in Figura 16, è riportata con la linea di colore verde la risposta in frequenza dell'attuatore acustico. Il dispositivo ha risposto in frequenza con quattro picchi d'intensità del segnale pari a 87, 103, 96, 70 dB nelle rispettive frequenze pari a 612,5 , 2025 , 5787,5 e 9662,5 Hz .

I segnali acustici prodotti dall'attuatore acustico, si trasmettono al vetro, con una naturale perdita di segnale dovuta all'energia assorbita dal vetro, ma in accordo ai fenomeni fisici, con un trend crescente nell'attenuazione in Intensità del segnale da 4.400 Hz fino al valore di 10 kHz. In questo intervallo, si possono, infatti, osservare in alcune regioni dello spettro degli shift sulle frequenze dovuti essenzialmente ai modi di vibrazione del tubo fbr ed ai modi di risonanza ed anti risonanza prodotti dalla massa di acqua posta in vibrazione.

4.1.4 Le misure spettrofotometriche sulla riflessione del vetro

Il fotobioreattore a sezione ellittica è stato caratterizzato mediante le misure allo spettrofotometro Shimadzu, modello SolidSpec-3700, utilizzando il protocollo sperimentale indicato nel capitolo 3 di materiali e metodi, paragrafo 3.8.1 ottenute dalla collaborazione con il Prof. Ing. Francesco Asdrubali e l'Ing. Samuele Schiavoni del Ciriad dell'Università di Perugia.

Le misure spettroradiometriche effettuate distintamente su ciascuna postazione dei tubi fbr hanno evidenziato una diversa distribuzione della luce sul banco sperimentale di analisi in corrispondenza dei fbr esterni della serie 1-9 e sui due fbr esterni della linea di controllo 10 - 12. La soluzione a questi diversi fenomeni d'irraggiamento dei fbr è stata trovata corredando ciascuna postazione fbr con due pannelli laterali fonoassorbenti e riflettenti in modo da separare ciascun fascio luminoso emesso da ciascuna plafoniera al neon.

L'isolamento acustico ottenuto con i pannelli fonoassorbenti si è rivelato particolarmente utile nella gestione dei programmi acustici con suoni a bassissima frequenza e intensità.

La particolare geometria ellittica del fbr permette di distribuire il volume del terreno di coltura su una maggiore superficie laterale di esposizione alle radiazioni elettromagnetiche emesse dai neon sulle colture microalgali, massimizzando l'esposizione delle cellule all'impatto delle radiazioni elettromagnetiche emesse dal neon.

Il fbr in esame è stato irradiato con una fonte luminosa di spettro compreso nella porzione della radiazione luminosa fotosinteticamente attiva 400 - 700 nm.

Dalle analisi sono stati ottenuti il valore percentuale dello specchio di riferimento rispetto al solfato di bario, il valore della riflessione "assoluta" dello specchio di riferimento impiegato nello spettrofotometro come dai valori riportati nella tabella 1.

Con queste misure è stato ottenuto il valore della riflessione speculare assoluta e corretta della superficie del fbr, la trasmissione d'irradianza su ciascuna superficie laterale del fbr ed il valore dell'assorbimento del vetro contenuto nei valori del 5, 6 % del valore totale della radiazione elettromagnetica.

I valori cercati in questo esperimento erano quelli relativi all'assorbimento della radiazione luminosa nella regione del PAR e della riflessione ipotizzata a causa della curvatura della superficie laterale esposta alla luce artificiale.

Il valore della trasmissione diretta al singolo strato di vetro (superficie laterale del fbr) è stato ottenuto rapportando il valore percentuale della trasmissione diretta rilevata su ciascuna superficie laterale del fbr di vetro per la frazione percentuale rapportata all'unità della riflessione speculare assoluta. Dal valore ottenuto è stata estratta la radice quadrata.

Gli esami hanno confermato una distribuzione lineare nella regione del PAR come rappresentato nel grafico della figura 17:

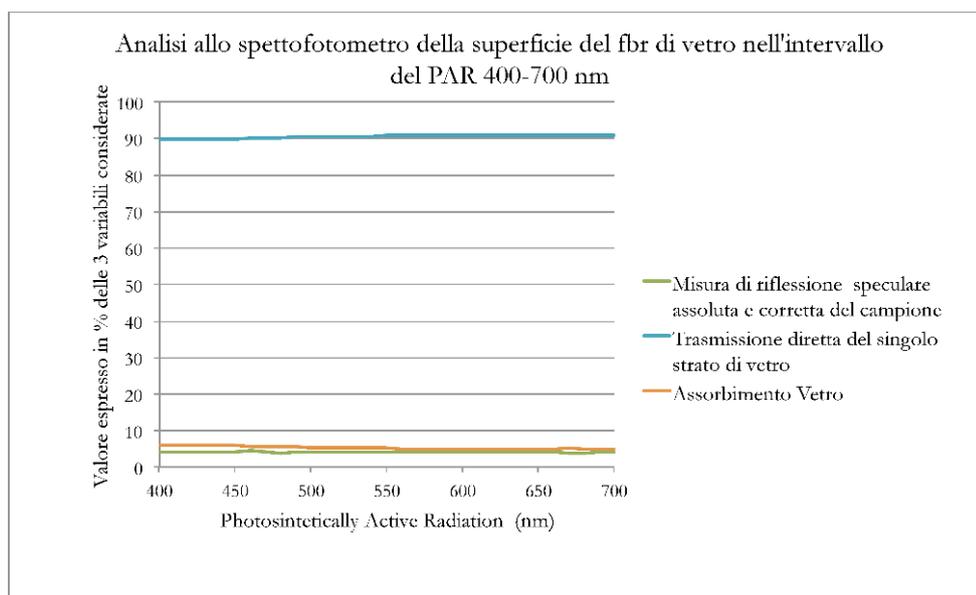


Figura 17: Esito delle analisi allo spettrofotometro del fbr irradiato con una sorgente luminosa nella regione della radiazione fotosinteticamente attiva.

Queste analisi, hanno confermato le caratteristiche di risposta delle superfici laterali del fbr, con un assorbimento accettabile nella misura del 5 – 6 % e una riflessione compresa tra 3,79 e 4,25% linearmente distribuita nella regione della radiazione fotosinteticamente attiva.

Queste particolari caratteristiche garantiscono efficienza e riproducibilità non solo alla trasmissione della radiazione luminosa, ma anche un valore accettabile di riflessione che è stata corretta nella sperimentazione del Doe, vedi quarta sessione paragrafo 4.5.1, con l'introduzione di appositi pannelli separatori fonoassorbenti e riflettenti per massimizzare l'efficienza e favorire la selettività e direzionalità di ciascuna fonte luminosa verso il proprio fotobioreattore disposto sul banco sperimentale.

La linearità nell'assorbimento della radiazione nell'intervallo del PAR, sulla superficie laterale del fbr, ha permesso poi di condurre le attività sperimentali in situ con la sonda spettroradiometrica Li-Cor, non rilevando particolari shift sulle lunghezze d'onda trasmesse dal vetro al terreno di coltura e alle microalghe, e da questo alla seconda parete del fbr di separazione con il mezzo aria, su cui è stato posizionato a due diverse altezze il sensore come indicato nella terza sessione paragrafo 4.3.2 per le misure di assorbanza.

Non si riportano in questa sede i parametri misurati sulla conformazione cilindrica del tubo fbr, che a parità di diametro esterno rispetto al tubo a sezione ellittica, oltre a presentare una maggiore presenza di fenomeni di riflessivi dovuti ad una più pronunciata curvatura delle superfici esposte alla luce, esprimeva un pessimo grado di penetrazione della luce a causa della maggiore superficie esposta lungo il cammino ottico della luce.

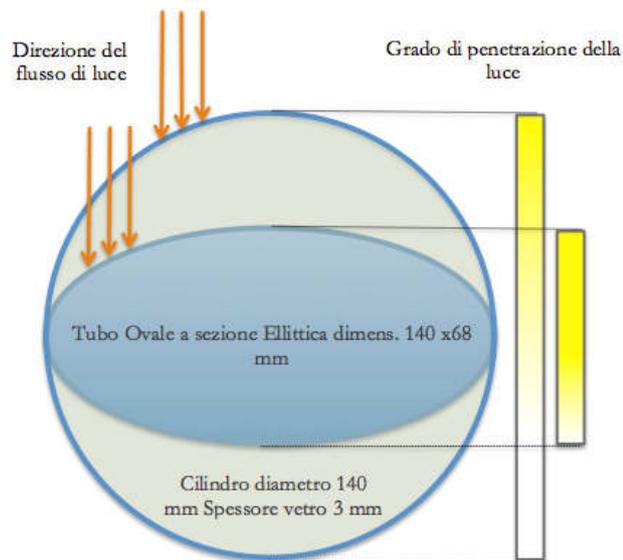


Figura 18: Ricostruzione del rapporto geometrico in scala delle due sezioni di fbr. A destra le due bande di colore giallo e le relative sfumature di colore indicano il diverso grado di penetrazione della luce nei fbr.

Nella Figura 18 si osserva come il tubo ovale a sezione ellittica, a parità di intensità e distanza dalla fonte luminosa, presenta un grado più elevato di penetrazione della luce (banda di colore giallo a lato della figura) rispetto al tubo cilindrico dove la stessa radiazione luminosa non riesce a penetrare oltre il raggio riducendo così del 50 % la superficie illuminata e quindi l'efficienza fotosintetica complessiva.

Nel rapporto superficie/volume si è visto come una riduzione del 50% della sezione del tubo cilindrico, oltre ad incrementare ulteriormente i fenomeni di riflessione della luce a causa della curvatura ancora più pronunciata della superficie, avrebbe senz'altro richiesto una maggiore superficie radiante a causa dell'incremento nella lunghezza del tubo relativa al medesimo volume di coltura microalgale (4 L).

Attraverso l'aumento della superficie laterale d'impatto che si ottiene con la geometria ellittica⁶ è stato possibile distribuire il volume della coltura microalgale pari a 4 lt su una altezza della colonna pari a quella delle lampade al neon radianti in modo da poter sfruttare e distribuire l'intero fascio fotonico emesso dalle lampade al neon su una superficie laterale più estesa. La particolare conformazione, in cui il diametro dell'asse minore della sezione ellittica

⁶ A parità di Intensità luminosa e distanza dei fbr dalla fonte luminosa, la sezione ellittica rispetto a quella cilindrica consente una migliore penetrazione della luce, che uscendo dalla parete posteriore non illuminata del fbr, mantiene ancora un basso livello di irradianza. La diagonale minore dell'ellisse è pari raggio del tubo cilindrico. Per questo motivo nel tubo cilindrico la stessa radiazione luminosa non riesce ad attraversare tutta la superficie del fbr.

dei tubi fbr è ortogonale alla superficie radiante, ma è pari al raggio di un tubo a sezione cilindrica, conferisce ai fbr un'illuminazione idonea anche nelle fasi evolutive della crescita delle microalghe per cui sono stati progettati i diversi disegni sperimentali che hanno originato le batterie di test.

In proposito, si ricorda che sono state impiegate colture a termine in batch da 22 giorni (nell'esperimento pilota) con il quale sono state acquisite importanti informazioni che hanno permesso successivamente di ridurre il tempo di durata degli esperimenti ad una settimana circa (8 -10 gg.).

4.1.5 Realizzazione del banco sperimentale e sua validazione.

Una volta ottenute le conferme sperimentali sulla validità dei materiali impiegati e sulle soluzioni tecniche di costruzione individuate, è stato finalmente allestito il banco di sperimentazione su cui sono stati sistemati i 12 fbr. In pratica come raffigurato in figura 6 sono stati disposti 9 fbr stimolati acusticamente in linea sul banco sperimentale, contrapponendo ad essi sul retro altri 3 fbr di controllo.

Come raffigurato in Figura 19, sono state preparate le 9 basi di appoggio in marmo su cui posizionare i fbr muniti di attuatore acustico e le culle in legno preformato di contenimento, per l'alloggiamento dell'attuatore acustico.

Questa doppia combinazione di materiali, uniti tra loro da una schiuma di poliuretano, è stata montata allo scopo di smorzare le vibrazioni prodotte dagli attuatori acustici su ciascun fbr durante le riproduzioni sonore.

Sulle basi di marmo, è stata ulteriormente sistemata una doppia striscia di scotch biadesivo dello spessore di 3 mm, in modo da incrementare l'isolamento acustico tra le basi in marmo e la superficie di appoggio (Vedi Figura 19 a destra).



Figura 19: Le basi in marmo e la culla in legno per alloggiare l'attuatore acustico e il fbr. A destra il particolare del biadesivo d'isolamento delle basi in marmo dal piano di appoggio.

E' stata poi avviata la costruzione degli alloggiamenti delle plafoniere delle lampade al neon ciascuna in posizione verticale con il flusso di luce indirizzato su ciascun fbr e il cablaggio elettrico di collegamento degli attuatori acustici agli amplificatori di segnale (Vedi Figura 20).

I cavi elettrici di collegamento degli attuatori sono stati montati sulle rispettive uscite degli amplificatori a canali separati (Vedi Figura 20 a destra).

I segnali acustici generati e registrati su supporto digitale, sono stati elaborati nella preparazione dei programmi di stimolazione acustica con il Software Nuendo 4 e, con l'impiego della Scheda Audio Presonus Fire Studio, sono stati inviati ai rispettivi canali separati di amplificazione per essere poi riprodotti singolarmente da ciascun attuatore acustico Ottone.



Figura 20: Particolare dell'assemblaggio dei collegamenti elettrici del sistema audio Ottone e delle lampade al Neon. A destra La Scheda Audio Presonus e gli amplificatori

Una volta terminato il montaggio del sistema di riproduzione sonora nei fbr e di illuminazione artificiale con le lampade al neon, è stato montato il sistema di rilascio di piccole bolle di aria microfiltrata (filtri Whatman di porosità 0,22), realizzato con 4 pompe di aria da acquario ognuna di esse collegata ad un impianto di smistamento dell'aria da avviare in ognuno dei 12 fbr. Ciascun fbr è stato provvisto da un tubicino in plastica trasparente del diametro interno pari a 4 mm, dal quale sono state fatte fluire le bolle di aria a bassa velocità per evitare di perturbare il mezzo di coltura (Vedi Figura 21).



Figura 21: A sinistra il particolare del sistema di rilascio delle bolle d'aria e a destra un'immagine del bando sperimentale con i 9 fbr provvisti di attuatore acustico alla base.

Sono state quindi eseguite numerose prove di laboratorio al fine di testare il comportamento delle colture microalgali sotto il flusso costante di piccole bolle di aria microfiltrata.

Alla fine si è deciso di impiegare un solo tubo di rilascio dell'aria. Tutti e 12 i fbr sono stati corredati internamente da una asta collegata all'estremità con un disco di vetro da utilizzare al momento dei prelievi di biomassa, in modo da ottenere un campione più uniforme e risospingere le colture microalgali sedimentate.

Dalla parte opposta ai 9 fbr stimolati acusticamente, sono stati sistemati i 3 fbr di controllo raffigurati in Figura 22, provvisti unicamente di una base in legno di rialzo per consentire ad essi la medesima esposizione alla fonte luminosa.



Figura 22: Particolare delle basi in legno del triplicato di controllo

4.1.5.1 Prove d'interferenza dei suoni tra fbr

Una volta verificato il funzionamento di tutti i dispositivi, sono state effettuate le prove di interferenza necessarie ad assicurare che tra i fotobioreattori non vi fossero interferenze nella riproduzione dei suoni e cioè che ciascuno di essi fosse stato in grado di riprodurre in acqua esclusivamente le tracce audio ad esso assegnate nel programma di stimolazione acustica.

L'obiettivo dell'esperimento è stato quello di verificare l'eventuale esistenza d'interferenze nella riproduzione sonora tra i 9 fbr stimolati e i 3 fbr di controllo che dovevano operare in assenza di perturbazioni di qualsiasi natura.

Dalle analisi delle registrazioni acustiche e dall'elaborazione dello spettrogramma, sono state inoltre identificate chiaramente le frequenze di emissione riguardanti le fonti rumorose di altri dispositivi presenti nel laboratorio.

In questo modo, oltre a validare il corretto funzionamento delle apparecchiature e l'assenza di interferenze tra i suoni riprodotti da ciascun fbr, sono state misurate tutte le altre fonti rumorose presenti nel laboratorio a partire dal rumore dei reattori delle lampade al neon, ai condizionatori ed infine allo stesso rumore prodotto nei fbr dal flusso delle bolle di aria impiegate per agitare le colture.

Di tutte le prove effettuate, in questa sezione se ne descrive solo quella più rappresentativa in cui viene stimolato il fbr1 con lo sweep acustico (0,1-6 kHz) che funge da fonte sonora e vengono effettuate le misure di acustica con il microfono posto prima sul fbr 4 e poi sul fbr 7 più lontano dalla fonte sonora.

Disposizione dei 9 fbr stimolati acusticamente sul banco di sperimentazione del laboratorio e rappresentazione delle fonti di rumore

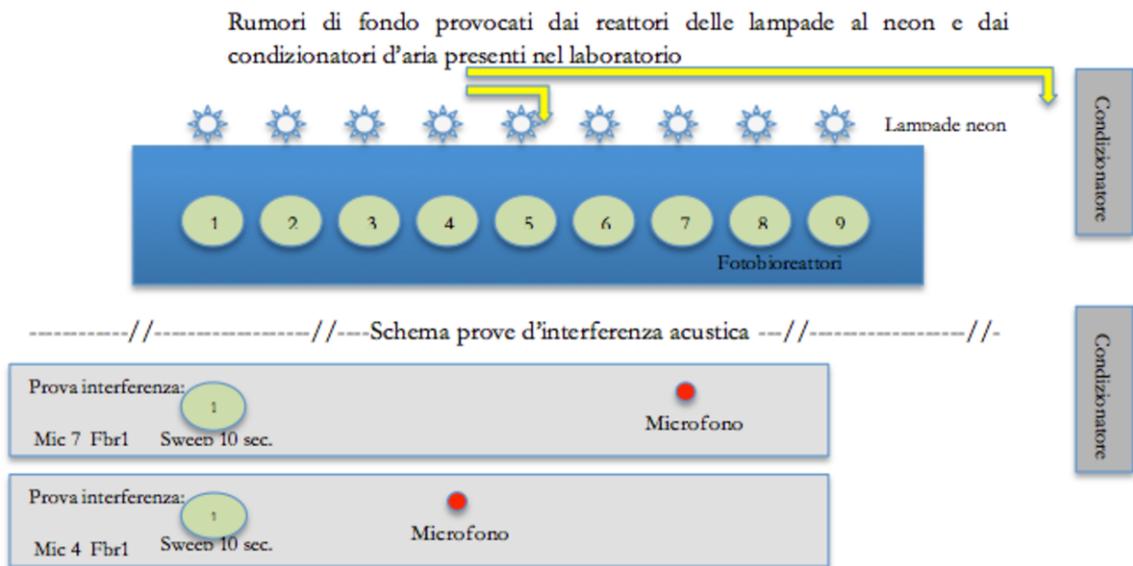


Figura 23: Particolare dello schema di realizzazione delle prove d'interferenza durante la riproduzione del suono sul fbr 1, misurata ponendo alternativamente nei fbr 4 e 7 il microfono sul bordo superiore aperto.

Le misure acustiche d'interferenza⁷ di Figura 23 sono state quindi eseguite alternativamente ponendo il microfono rispettivamente nel fbr 7 e nel fbr 4 (a trasduttori spenti), senza interrompere il flusso di bolle d'aria.

Dalla successiva elaborazione delle tracce audio registrate (Mic 7_fbr1 e Mic4_fbr1) della durata di 10 secondi, nello spettrogramma audio in (Figura 24) sono stati rappresentati gli spettri del segnale acustico misurato rispettivamente nel fbr 4 (linea di colore verde) e fbr 7 (linea di colore rosso).

Queste misure sono state comparate con la registrazione acustica del suono riprodotto dal fbr 1, utilizzato in questa prova di interferenza come sorgente acustica.

⁷ Queste misure sono state ottenute grazie alla collaborazione del tecnico audio Cristiano Anglerici di Marsciano (PG).

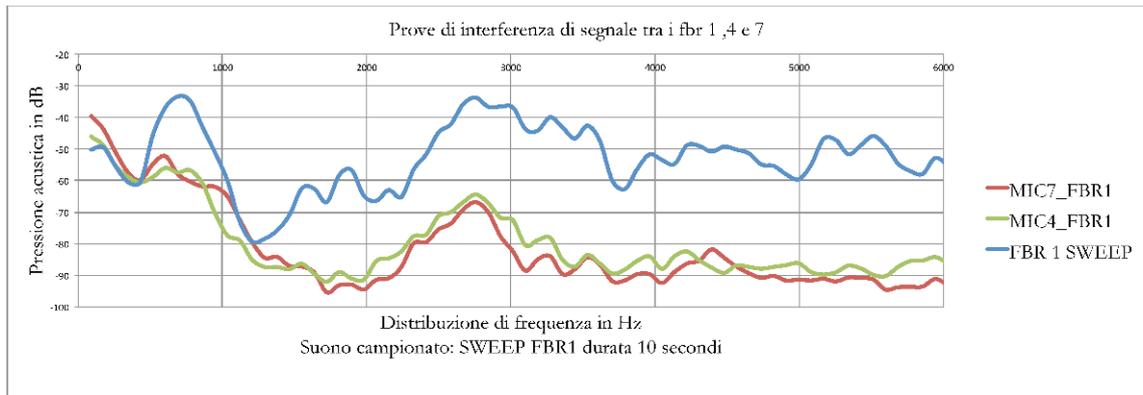


Figura 24: Spettrogramma ottenuto dalle prove d'interferenza mediante le quali è stato riprodotto un suono dal fbr 1 ed è stato misurato con il microfono nello strato di aria, immediatamente sopra il pelo libero dell'acqua, il valore della pressione acustica nei fbr 4 e fbr 7.

Lo spettrogramma di Figura 24 ha evidenziato chiaramente interferenze di onde sonore emesse dal condizionatore e dai reattori delle lampade al neon che si sovrappongono alle basse frequenze oggetto di questo studio.

Nonostante ciò è stato considerato che in questa prova di registrazione acustica, il microfono posto appena sopra il pelo libero dell'acqua, ha effettuato misure nel mezzo aria/acqua ed è riuscito a rilevare anche l'esatta localizzazione delle rispettive fonti rumorose per le quali è stata studiata la banda di emissione rumorosa caratteristica.

In conclusione, da queste analisi preliminari è emersa la piena riproducibilità sperimentale poiché la lieve entità dell'intensità dei segnali misurata nel mezzo aria, sicuramente riesce ad esprimere una forza di gran lunga inferiore nel mezzo di coltura, dovendo vincere la resistenza delle pareti di vetro dei fbr.

Queste informazioni sono state utili per quanto riguarda l'insonorizzazione del laboratorio (condizionatori spenti) durante le misure di bioacustica e lo studio del sistema di agitazione delle colture microalgali.

Seconda Sessione

*4.2 Esperimento Pilota - Attività sperimentali di accrescimento delle colture microalgali di *Scenedesmus obliquus* con le stimolazioni acustiche di bassa frequenza e intensità.*

L'esperimento pilota è stato concepito con lo scopo di collezionare una serie di dati sul comportamento di crescita delle colture microalgali stimulate con onde acustiche di bassa frequenza in un range di valori sufficientemente ampio, a causa dell'assenza di bibliografia di riferimento con indicazioni valide in tale intervallo.

Le preliminari basi scientifiche che riferivano sull'argomento erano datate e comunque non avevano mai affrontato le problematiche concernenti la trasmissione del suono in acqua, come quelle invece qui esposte.

Informazioni utili riferivano come si è visto, di aumenti di crescita dell'ordine del 33% per le colture batteriche di *E. coli* e di altri ceppi microalgali ma nessun dato era riportato per la *Scenedesmus obliquus*.

4.2.1 Il disegno sperimentale (fotoperiodo, suoni e sistema di agitazione delle colture)

Il disegno sperimentale è stato quindi definito sulla base delle uniche informazioni apprese dalla ricerca bibliografica, dalle caratteristiche reologiche e morfologiche del ceppo microalgale in esame. Per incrementare la significatività dei dati si è deciso di condurre questa sperimentazione preliminare in triplicato come in Tabella 4 avendo così la possibilità di testare contemporaneamente tre suoni diversi e poterne osservare l'andamento della crescita anche visivamente sui 3 fbr della linea di controllo.

Esperimento Pilota												
Programma stimolazioni	Fbr 1	Fbr 2	Fbr 3	Fbr 4	Fbr 5	Fbr 6	Fbr 7	Fbr 8	Fbr 9	Fbr 10	Fbr 11	Fbr 12
Frequenza (Hz)	sweep	sweep	sweep	2.025	2.025	2.025	5.784	5.784	5.784	Linea di Controllo		
Intensità relativa	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
Durata 1 ciclo Stimolazioni	40 min											
Numero cicli stimolazioni giornalieri	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
Durata compl. stimolaz.giornaliera (minuti)	200	200	200	200	200	200	200	200	200			

Tabella 4: Programma delle stimolazioni acustiche impiegate nell'esperimento pilota.

Il fotoperiodo impiegato è stato quello di illuminare le colture microalgali per un periodo di 14 ore al giorno intervallate da 10 ore di buio (vedi Tabella 5), intervallando i cicli delle stimolazioni acustiche della durata di 40 minuti ad un periodo di pausa della durata di 140 minuti solamente nelle 14 ore di luce.

Setup Sperimentale - Esperimento Pilota											
Fotoperiodo:	14 ore luce										10 ore buio
Ciclo di Stimolazioni:	Acoustic 40 min	Silent 140 min	(fase buio anticipata al termine dell'ultima stimolazione acustica)								

Tabella 5: Setup sperimentale impiegato nella sperimentazione pilota di accrescimento delle colture microalgali. Durante la sperimentazione le microalghe sono stimolate giornalmente con 5 cicli della durata di 40 minuti, ciascuno intervallato da 140 minuti di pausa unicamente nella fase luce del fotoperiodo utilizzato.

Come descritto nel paragrafo 4.5.1, in questi esperimenti preliminari di bioacustica, si è deciso di non impiegare nei fotobioreattori flusso di ossigeno né tantomeno di CO₂ poiché la presenza di questi gas nei terreni di coltura avrebbe sicuramente alterato le condizioni sperimentali in merito al campo acustico e alla diffusione dei suoni nei fbr. Per questo motivo, come si vedrà più avanti nel paragrafo 4.4, è stato effettuato uno studio specifico (*Terza Sessione*) per individuare un metodo di agitazione delle colture cellulari con un impatto acustico il più possibile basso, dovendo tra l'altro operare nel range delle basse frequenze.

Si è quindi deciso di provare un sistema misto di agitazione per le colture microalgali affidato quasi esclusivamente al rilascio nei fbr di un leggero flusso di microbolle di aria, distanziando l'emissione di ciascuna bolla di aria di qualche secondo per evitare che si instaurassero turbolenze che avrebbero potuto anch'esse produrre suoni nell'ordine delle frequenze impiegate nella sperimentazione.

Con le informazioni ottenute dalle analisi modale del fotobioreattore e dell'attuatore acustico, presso i laboratori di misure meccaniche della Facoltà di Ingegneria dell'Università

Politecnica delle Marche con la collaborazione degli Ingegneri Paolo Castellini e Milena Martarelli sono state preparate le tracce audio da impiegare nelle stimolazioni acustiche.

Nell'intervallo di frequenza oggetto dello studio, sono state campionate due diverse tracce audio in modo da testare la risposta delle microalghie a cicli di stimolazione acustica su due frequenze distanti tra loro: 2 e 6 kHz. Le migliori caratteristiche che abbiano garantito la riproduzione delle frequenze indicate, sono state: 2.025 Hz per la frequenza a 2kHz (Vedi Figura 25) e 5.784 Hz per la riproduzione dei 6 kHz in acqua (Vedi Figura 26).

E' stato poi preparato uno Sweep lineare di segnale acustico che partendo dalla frequenza di 100 Hz raggiungeva nel periodo di 10 secondi la frequenza di 6 kHz ripetendosi ciclicamente, d'ora in poi denominato semplicemente Sweep vedi Figura 27.

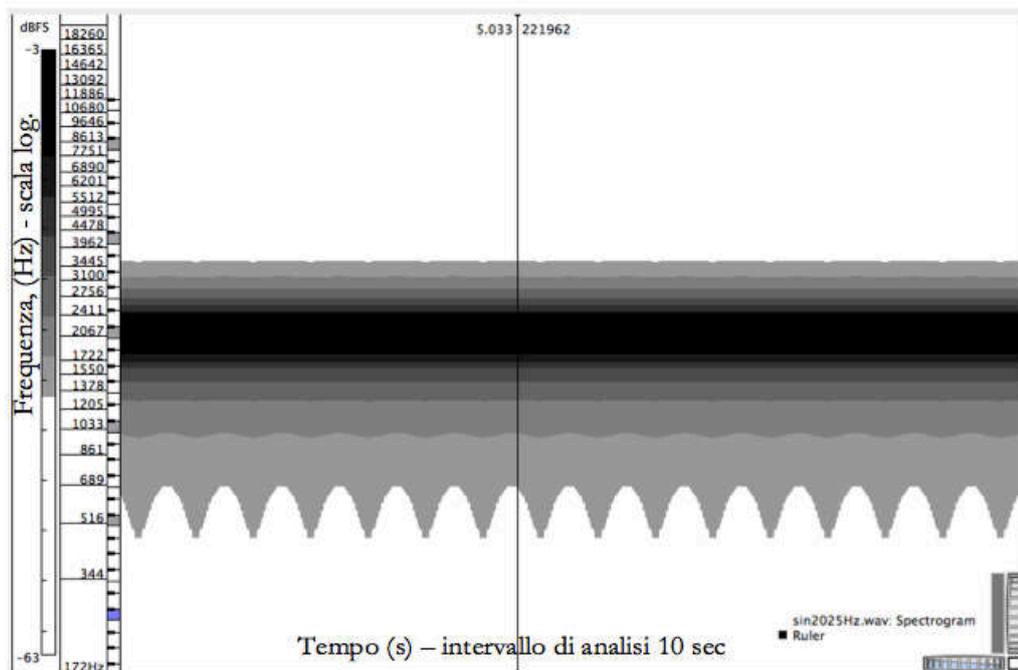


Figura 25: Rappresentazione grafica dello spettrogramma espresso in funzione logaritmica del suono fisso a 2.025 Hz della durata di 10 secondi ciclicamente ripetuto nei 40 minuti di ciascun ciclo di stimolazioni acustiche.

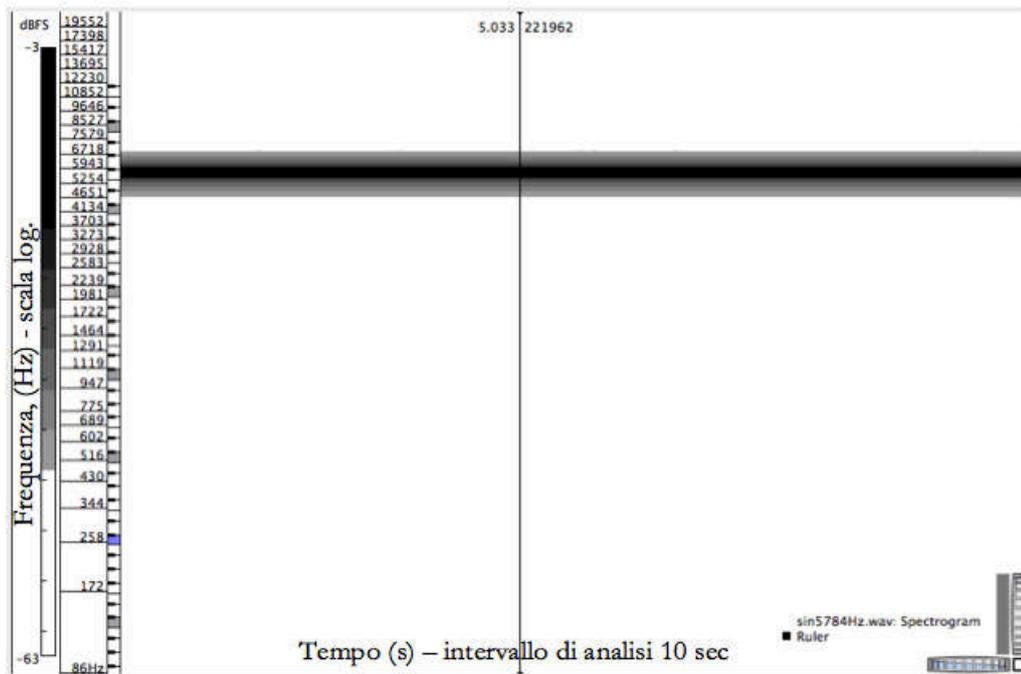


Figura 26: Rappresentazione grafica dello spettrogramma espresso in funzione logaritmica del suono fisso a 5.784 Hz della durata di 10 secondi ciclicamente ripetuto nei 40 minuti di ciascun ciclo di stimolazioni acustiche.

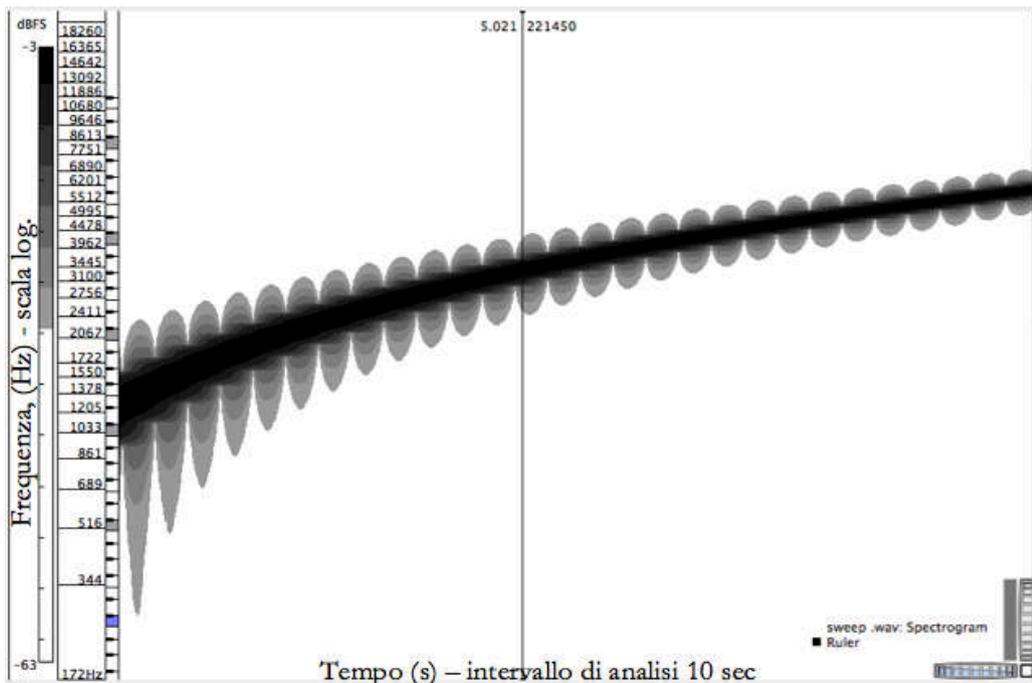


Figura 27: Rappresentazione grafica dello spettrogramma espresso in funzione logaritmica del suono Sweep 100 Hz – 6 kHz della durata di 10 secondi ciclicamente ripetuto nei 40 minuti di ciascun ciclo di stimolazioni acustiche.

4.2.2 Il rate di crescita osservato

Nel corso della Sperimentazione Pilota, in cui sono stati testati gli effetti di tre differenti suoni sulla crescita delle microalghe, non tutti i fotobiorattori hanno risposto allo stesso modo.

Questa preliminare conferma sul comportamento delle colture microalgali sotto l'effetto delle stimolazioni acustiche iniziava quindi a emergere manifestando visivamente gli effetti per la differente quantità di biomassa presente nei fotobiorattori.

Dalle elaborazioni grafiche dei risultati ottenuti (Vedi Figura 28), lo Sweep di segnale acustico ha evidenziato il maggiore incremento del Rate di crescita per un valore pari al 320 % rispetto al controllo.

A seguire è stato ottenuto il valore del 105 % con le stimolazioni a 2 kHz e del 25 % alla frequenza più alta 6 kHz.

E' stata così ottenuta questa importante e preliminare conferma sull'incremento della velocità della crescita delle colture algali stimolate con i suoni di bassa frequenza.

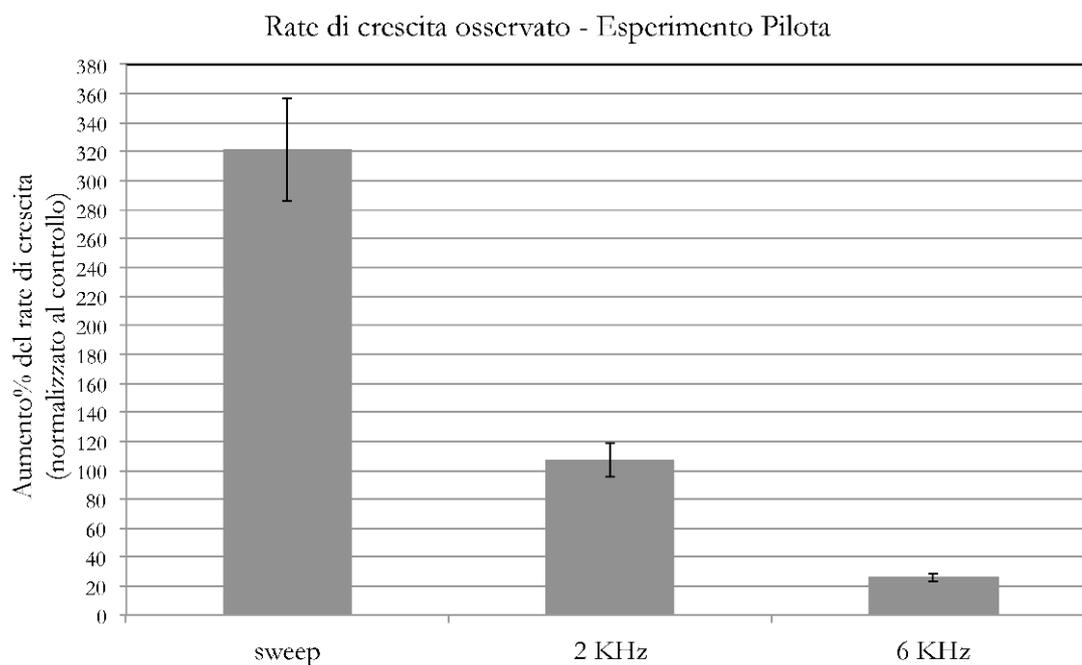


Figura 28: Rate di crescita ottenuto nella sperimentazione pilota normalizzato, al controllo, per le colture stimolate con lo Sweep (0,1 – 6 kHz) e con le rispettive frequenze acustiche pari a 2 e 6 kHz, rispettivamente.

4.2.3 La conta cellulare con lo Scepter contacellule automatico

Dalle analisi sulle concentrazioni di cellule microalgali, è possibile osservare (Figura 29) la rapidità nella risposta delle colture stimulate con lo sweep con una concentrazione di cellule /mL già dalla prima osservazione, dopo sole 48 ore dall'inizio dell'esperimento (T_1), che aumenta del 141% a differenza degli incrementi più lievi ottenuti nelle colture stimulate a 2 kHz pari a 9% e 6 kHz pari al 41 % rispetto al controllo (fbr non stimolato acusticamente, 0 kHz) che ha avuto un incremento del 13%.

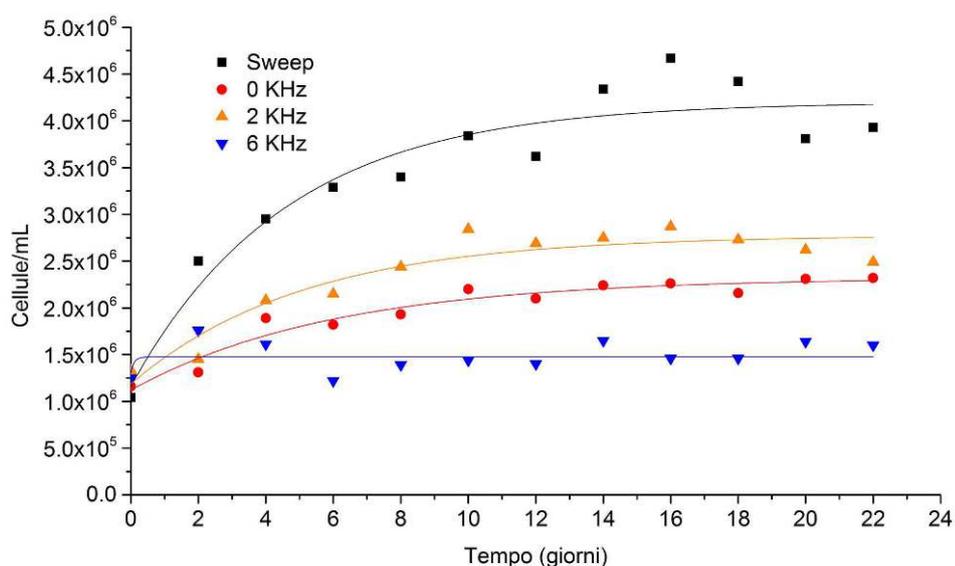


Figura 18: Curve di crescita misurate con lo Scepter contacellule automatico. Il valore di cellule deve essere moltiplicato x 10 in quanto il protocollo strumentale prevede l'analisi su un campione di 100 microlitri per cui il valore misurato è stato rapportato a 1 millilitro.

Il trend di maggiore crescita mostrato dallo sweep, viene mantenuto fino alla fine dell'esperimento a differenza delle colture stimulate a 6 kHz che a partire dal T_3 (72 ore dall'avvio dell'esperimento) subiscono una inversione nella tendenza di crescita.

La concentrazione massima ottenuta nelle colture stimulate a 2 kHz, ottenuta al T_5 si è avuta anche nella coltura di controllo mentre lo sweep ha favorito una crescita maggiore con una concentrazione superiore di 1×10^6 cells/mL.

Al T_8 (dopo 192 ore dall'avvio dell'esperimento), l'incremento della crescita delle popolazioni cellulari rispetto alla concentrazione iniziale, ha registrato il valore pari al 450% per le colture

stimolate con lo sweep e rispettivamente il 216 % e 117% per le frequenze 2 e 6 kHz mentre il controllo non è riuscito ancora a raddoppiare la concentrazione iniziale raggiungendo il valore del 194%.

Esprimendo il Rate % di crescita ottenuta, in rapporto al numero di cellule per millilitro (Figura 29), si osserva come ad eccezione che nelle prime due osservazioni ($T_1 - T_2$) le colture stimulate alla frequenza di 6 kHz mantengono un rate di crescita quasi lineare, inferiore agli altri programmi di stimolazione e alla stessa coltura di controllo.

Appare ancora più evidente la pendenza della curva di crescita mostrata dalle colture stimulate con lo sweep, anche se, nel corso della sperimentazione sono state notate in alcuni momenti leggere flessioni sul numero di particelle presenti nelle concentrazioni cells/mL.

Questo fenomeno potrebbe essere attribuito a un'altalenante presenza di aggregati cellulari che come si vedrà più avanti nelle approfondite analisi sulla distribuzione dimensionale delle cellule osservate, non rimane sempre costante nelle colture durante l'avanzamento dell'esperimento, ma subisce modificazioni come peraltro confermato anche dalle analisi al microscopio elettronico TEM con il quale è stata evidenziata nei campioni trattati con le stimolazioni acustiche una minore presenza di cenobi (cellule di *Scenedesmus obliquus* unite parallelamente tra loro) come meglio indicato nel paragrafo 4.6.

La separazione dei cenobi, per opera delle stimolazioni acustiche delle onde sonore potrebbe essere la prima causa che favorevolmente incrementa il numero di cellule che sono lette dal contacellule automatico sceptor e dal granulometro laser.

Altra considerazione va però fatta in merito alla morfologia della *Scenedesmus obliquus* che, al momento del passaggio davanti al cammino ottico laser (per il Granulometro Laser) e nel micro canale (nello Sceptor Coulter Counter), può assumere differente inclinazione lungo ciascuno del suo asse maggiore e minore, attribuendo così questa possibile conformazione posizionale che si traduce in un'assegnazione ad una classe dimensionale o alla successiva.

4.2.3.1 La distribuzione dimensionale delle cellule nei diversi programmi di stimolazione acustica.

Dalle analisi con il contacellule automatico Scepter, sono state elaborate le informazioni sulla distribuzione dimensionale delle cellule per millilitro al fine di riuscire a individuare, per classi dimensionali, il comportamento delle cellule di *Scenedesmus obliquus* nei diversi programmi di stimolazione acustica e, confrontandoli con quello del controllo in assenza di perturbazioni acustiche.

Le informazioni sulle concentrazioni di cellule per mL hanno consentito già di individuare il rate di crescita indicato nel precedente paragrafo 4.2.2, ma con questo ulteriore approfondimento, è stato possibile osservare la distribuzione dimensionale assunta dalle cellule microalgali sotto l'effetto delle stimolazioni acustiche.

Sono state approfondite le analisi sulla distribuzione dimensionale relativa al fbr 2 che ha prodotto i migliori effetti di crescita e fbr 11 di controllo, ed è stato possibile osservare, in rapporto al numero di cellule, per le classi dimensionali fino ad 11 μm (vedi figure 30 - 34) come sono cresciute le rispettive popolazioni cellulari nelle varie classi.

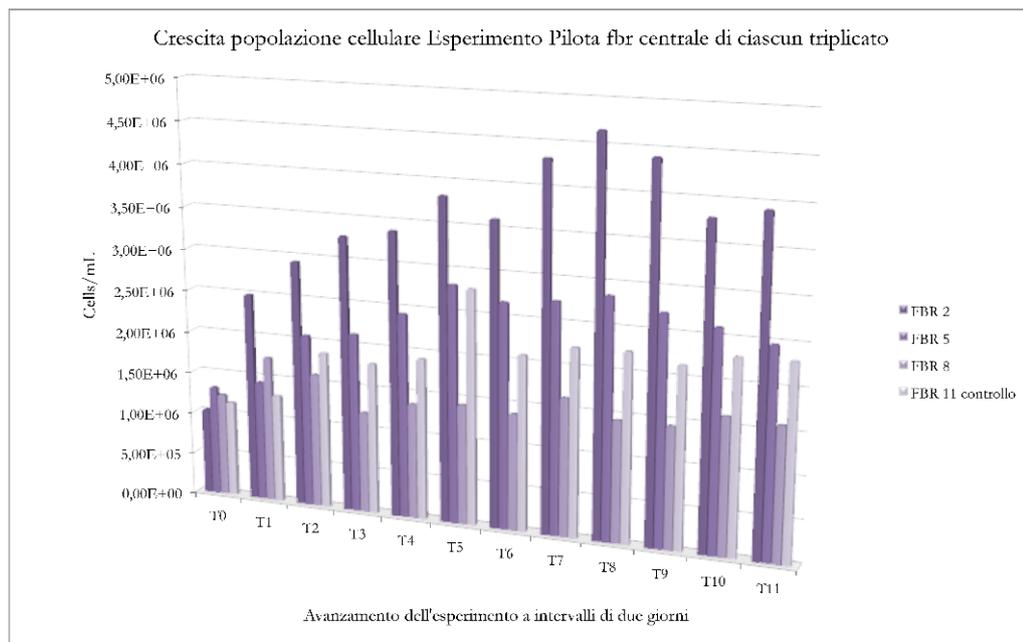


Figura 30: Crescita delle popolazioni cellulari nei 3 diversi programmi di stimolazione acustica e nel fbr 11 di controllo. La sperimentazione è stata eseguita in triplicato scientifico. I dati si riferiscono ai fbr centrali di ciascun triplicato preso a base per le osservazioni.

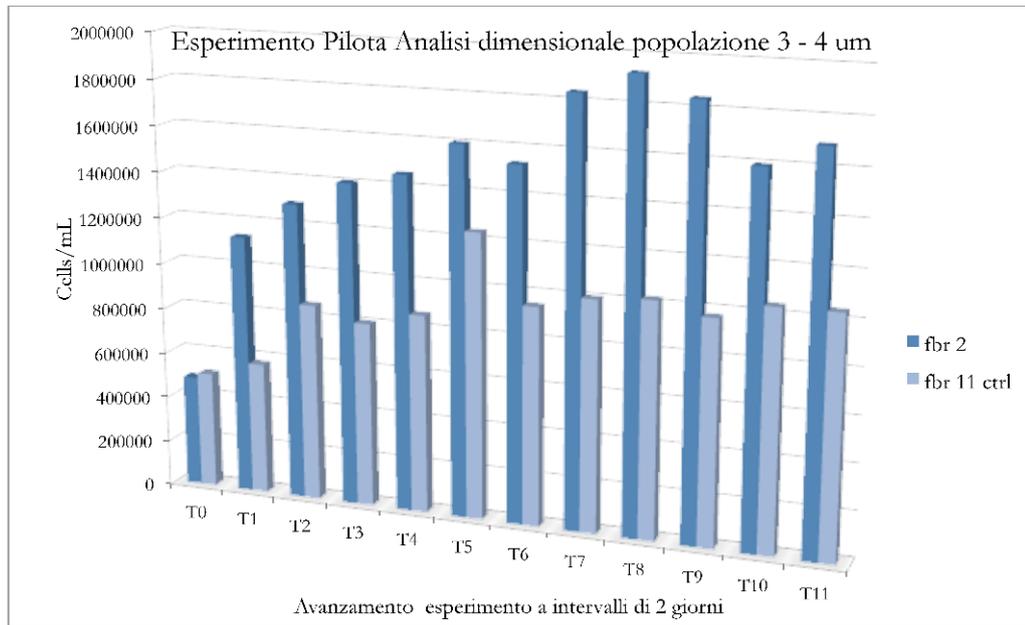


Figura 31: Distribuzione dimensionale della popolazione di microalghe nel range 3-4 um nel fbr 2 stimolato con il segnale acustico Sweep lineare e nel fbr 11 di controllo.

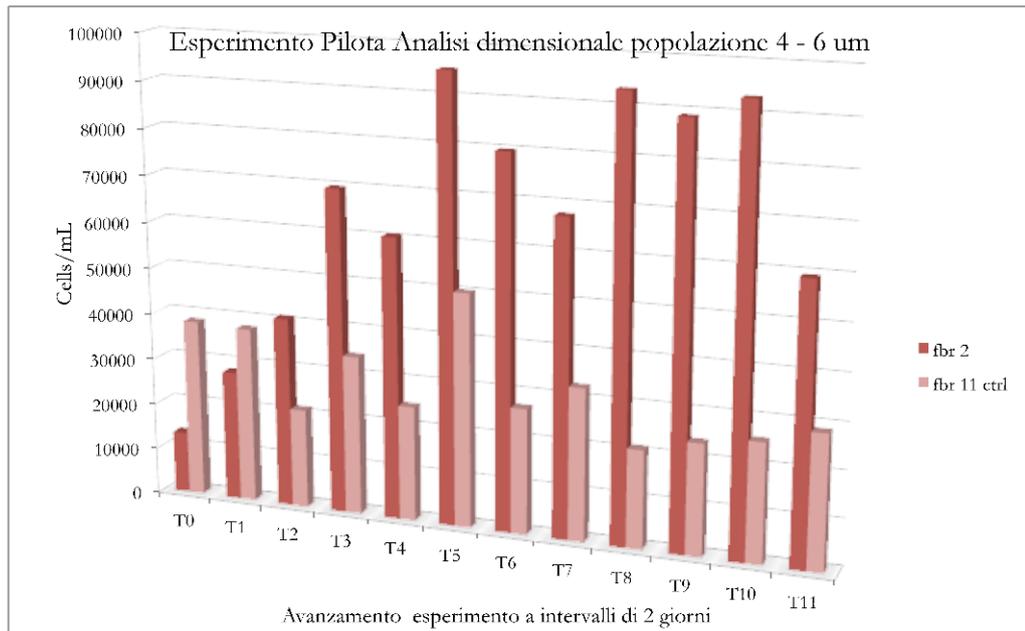


Figura 32: Distribuzione dimensionale della popolazione di microalghe nel range 4-6 um nel fbr 2 stimolato con il segnale acustico Sweep lineare e nel fbr 11 di controllo.

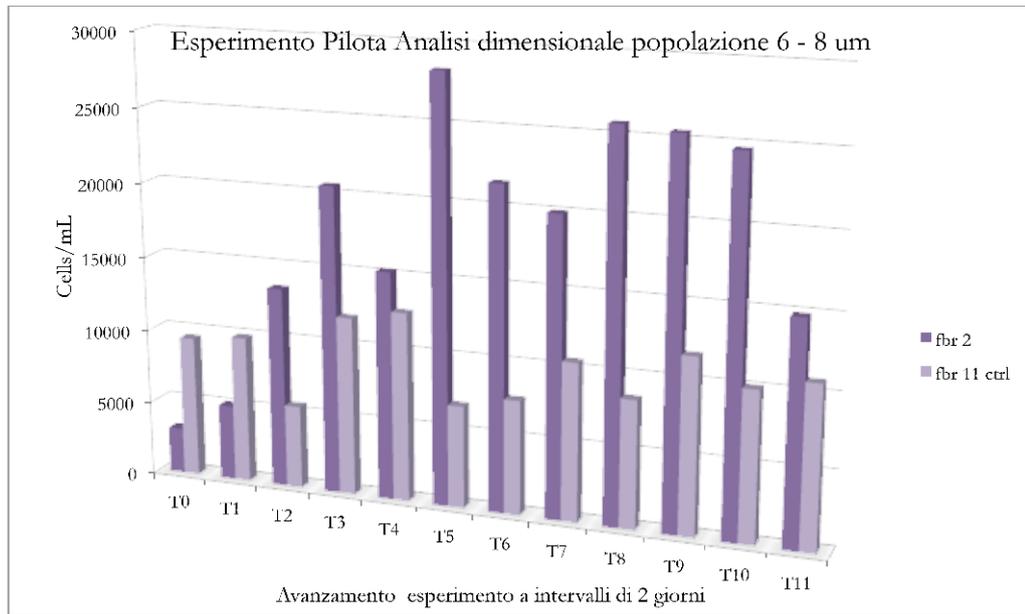


Figura 33: Distribuzione dimensionale della popolazione di microalghe nel range 6-8 um nel fbr 2 stimolato con il segnale acustico Sweep lineare e nel fbr 11 di controllo.

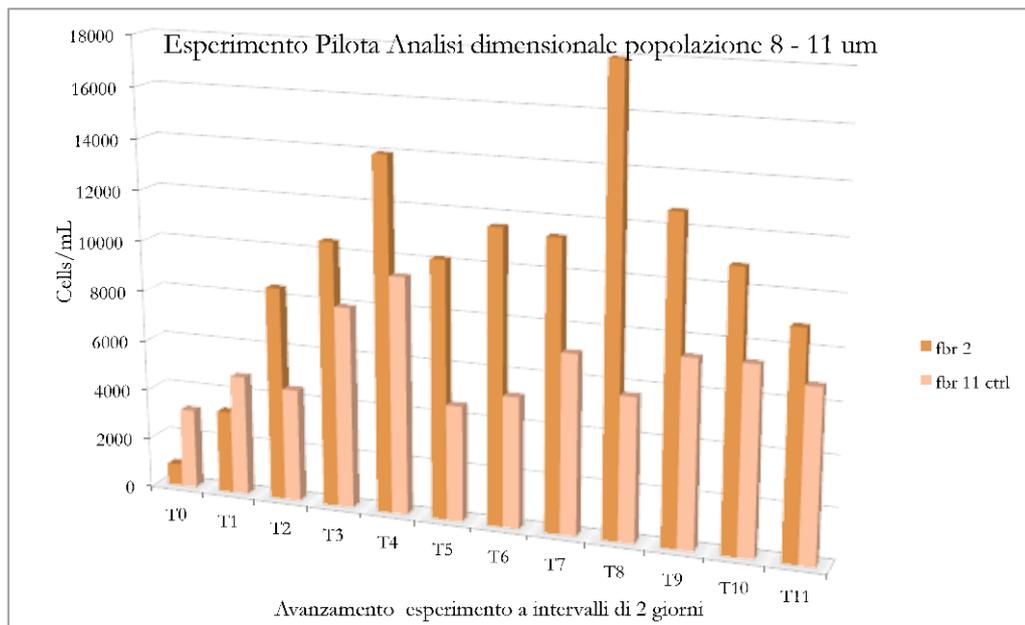


Figura 34: Distribuzione dimensionale della popolazione di microalghe nel range 8-11 um nel fbr 2 stimolato con il segnale acustico Sweep lineare e nel fbr 11 di controllo.

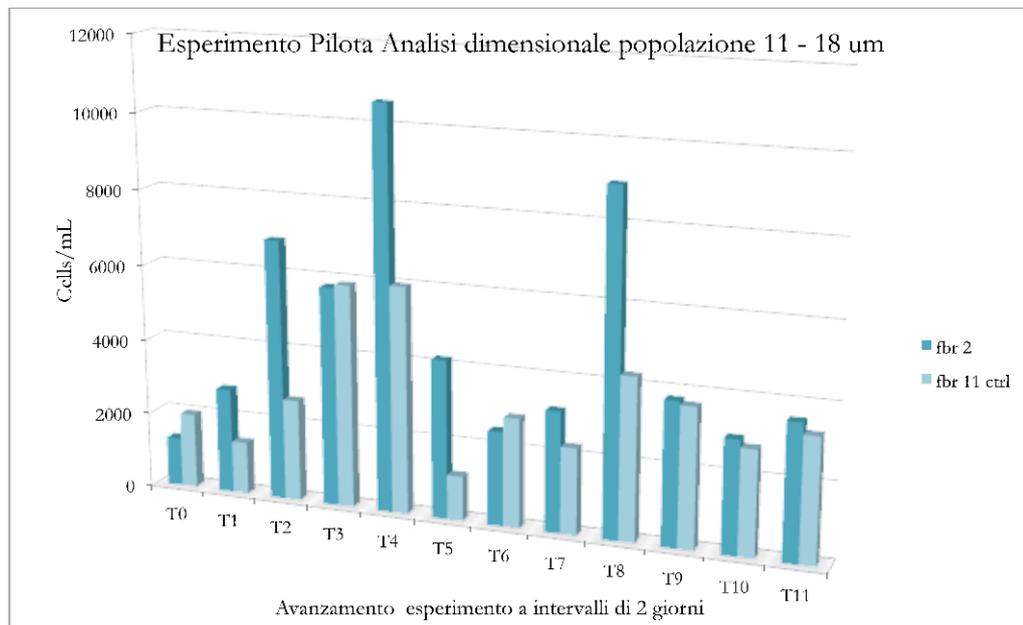


Figura 35: Distribuzione dimensionale della popolazione di microalghe nel range 11-18 um nel fbr 2 stimolato con il segnale acustico Sweep lineare e nel fbr 11 di controllo.

Dopo il 2° giorno e tra il 4° e 16° giorno (vedi Figura 33) le colture stimolate con lo sweep di segnale acustico hanno evidenziato un doppio incremento sulla crescita della popolazione di cellule microalgali passando da una differenza rispetto al fbr 11 controllo di $413 \cdot 10^5$ al valore di $833 \cdot 10^5$ cells/mL, nel range dimensionale 6-8 um.

Nel range da 4-6 um di Figura 32 è stata invece osservata una crescita quasi lineare che, partendo al T₀ da una concentrazione numerica positiva nel range osservato per il fbr 11 controllo pari a 25.100 cells/mL, le onde acustiche hanno favorito una crescita graduale fino al T₈ (16 giorni dall'inizio) generando una differenza positiva per lo sweep pari a 72.200 cells/mL.

Osservando invece il range dimensionale inferiore 3-4 um in Figura 31, lo sweep acustico ha evidenziato un rapido incremento sulla crescita che, pur partendo con un numero di cellule per mL inferiori di 23.300, ha espresso una rapida crescita lineare fino al T₁ (2 giorni dall'inizio) pari a 556.700 cells/mL, e così pure dal T₂ al T₈ (dal quarto al 16 giorno dall'inizio) con 905.800 cells/mL.

Nelle classi dimensionali superiori, a partire dal range 8-11 e 11-18 um (vedi Figure 34 e 35), non sono emersi scostamenti rispetto alla coltura di controllo con un incremento di popolazioni cellulari che numericamente non hanno superato le 4000/5000 unità per mL.

Quest'ultima osservazione, condotta su un periodo così lungo (22 giorni), ha confermato una maggiore attività di proliferazione di cellule microalgali sotto l'effetto della stimolazione con lo sweep acustico con un rapido incremento del rate di crescita proprio nel range dimensionale più piccolo 3-4 μm , attestando poi un'importante crescita dimensionale nel range 6-8 μm , in accordo con i dati ottenuti dallo studio sulla morfologia della *Scenedesmus obliquus*, ottenuto mediante esami in microscopia ottica ed elettronica TEM nella fase preliminare di questo studio, in cui furono subito notati effetti di riduzione degli aggregati cellulari in seguito a stimolazione acustica.

I dati, ottenuti con il contacellule automatico Scepter (vedi Tabella 3) e con il Granulometro Laser, e le successive elaborazioni hanno quindi confermato gli effetti prodotti dalle stimolazioni acustiche.

Distribuzione dimensionale delle cellule analizzate nell'Esperimento Pilota con lo Scepter Coulter Counter															
		cells/mL	Cells Counter	3 - 3,97	4,01 - 4,99	5,03 - 5,96	6,00 - 6,98	7,01 - 7,99	8,02 - 8,96	9,00 - 9,98	10,01 - 10,99	11,03 - 11,96	12,00 - 12,98	13,01 - 13,99	14,03 - 17,96
T0	2T0	1,04E+06	50570	48700	1150	190	220	90	60	10	20	10	20	20	80
	5T0	1,33E+06	64110	59240	2960	960	460	180	110	90	30	10	10	40	20
	8T0	1,25E+06	60300	55130	3690	840	370	140	60	40	10	0	10	10	0
	11T0	1,16E+06	56350	51030	2790	1060	680	270	150	120	50	30	40	50	80
T1	2T1	2,50E+06	117410	113480	2250	560	290	220	170	80	80	40	60	50	130
	5T1	1,45E+06	69770	68580	750	150	100	60	30	30	10	10	10	10	30
	8T1	1,76E+06	84200	76450	3840	1490	780	560	320	270	150	140	90	40	70
	11T1	1,31E+06	63220	57810	2770	1030	640	350	180	210	90	60	40	10	30
T2	2T2	2,95E+06	136710	129710	2760	1350	690	660	290	280	280	150	220	130	190
	5T2	2,08E+06	98530	97330	670	180	120	70	40	40	0	10	30	0	40
	8T2	1,61E+06	77460	69650	3800	1370	850	580	420	280	140	160	90	50	70
	11T2	1,89E+06	89860	86430	1560	590	340	220	200	160	90	80	70	60	60
T3	2T3	3,29E+06	151260	140590	5180	1800	1300	760	410	380	260	140	140	120	180
	5T3	2,15E+06	101770	100600	740	130	70	10	10	40	50	20	10	30	60
	8T3	1,22E+06	59150	56110	1110	620	470	200	260	70	90	70	50	40	60
	11T3	1,82E+06	86760	80730	2440	1000	680	520	380	260	160	210	120	80	180
T4	2T4	3,40E+06	155990	145940	4490	1570	930	600	610	470	320	260	230	230	340
	5T4	2,44E+06	114870	113610	790	140	90	50	30	40	10	60	20	10	20
	8T4	1,39E+06	66920	63120	1320	620	550	440	230	190	140	70	80	60	100
	11T4	1,93E+06	92050	86750	1720	770	520	420	260	260	150	140	120	100	190
T5	2T5	3,84E+06	174190	160370	6600	2940	1770	1070	550	320	150	190	50	70	110
	5T5	2,84E+06	132010	129930	1160	340	170	80	110	70	40	30	30	20	30
	8T5	1,44E+06	69560	66690	1050	540	360	240	160	130	90	90	100	60	50
	11T5	2,80E+06	130540	124240	3840	1190	440	250	160	140	160	30	30	40	20
T6	2T6	3,62E+06	165190	153630	5730	2260	1340	820	540	400	220	80	80	50	40
	5T6	2,69E+06	125550	123670	1010	280	230	140	70	40	50	40	10	10	0
	8T6	1,40E+06	67450	64270	1270	710	310	200	200	120	150	70	50	30	70
	11T6	2,10E+06	99480	95180	1870	850	500	270	250	160	110	80	90	20	100
T7	2T7	4,34E+06	194400	184160	4840	1940	1230	770	480	390	270	120	70	40	90
	5T7	2,75E+06	128410	126900	890	200	180	120	30	30	0	30	0	10	20
	8T7	1,65E+06	79220	76050	1060	430	410	260	270	200	110	110	100	50	170
	11T7	2,24E+06	105930	100640	2270	1020	580	480	300	210	200	90	40	70	30
T8	2T8	4,67E+06	207740	193110	6820	2530	1590	990	800	570	430	290	220	130	260
	5T8	2,87E+06	133290	131530	1040	330	160	40	80	30	50	0	0	10	20
	8T8	1,46E+06	70340	67420	1240	440	440	200	110	140	90	40	80	60	80
	11T8	2,26E+06	106520	102530	1380	750	440	420	260	130	180	150	70	60	150
T9	2T9	4,42E+06	197590	184490	6470	2430	1550	1000	660	340	270	180	80	90	30
	5T9	2,73E+06	127360	125490	960	380	160	160	60	70	30	10	10	10	20
	8T9	1,46E+06	70350	67540	930	500	320	320	230	100	120	110	50	80	50
	11T9	2,16E+06	102310	97610	1620	790	650	530	300	220	220	130	80	70	90
T10	2T10	3,81E+06	172980	159790	6780	2550	1490	980	510	380	200	60	100	40	100
	5T10	2,62E+06	122610	120660	980	280	300	120	70	80	50	10	30	20	10
	8T10	1,64E+06	78490	75220	1100	640	520	250	240	190	80	90	30	20	110
	11T10	2,31E+06	109020	104410	1680	900	600	410	320	210	210	90	30	80	80
T11	2T11	3,93E+06	178100	169410	4460	1490	950	540	360	340	190	130	80	90	60
	5T11	2,49E+06	116770	114780	1100	450	140	80	70	60	40	20	0	10	20
	8T11	1,60E+06	76870	75410	540	310	150	140	110	70	30	30	40	20	20
	11T11	2,32E+06	109560	104560	1990	910	680	410	290	190	200	110	90	40	90
Starter		7,28E+05	33202	27952	2218	1098	708	494	290	188	110	54	46	22	22

Tabella 6: Analisi della distribuzione dimensionale delle cellule microalgali misurate con lo Scepter Coulter Counter con il sensore da 40 μm durante la crescita delle colture (T₀-T₁₁) e relativo ai fbr centrali di ciascun triplicato denominati 2, 5, 8 e 11 (controllo) come in fig. 30.

4.2.4 I parametri chimico fisici e le misure spettrofotometriche

Le colture microalgali sono state monitorate, ad intervalli di 48 ore, con la sonda multiparametrica PCD650 (vedi paragrafo 3.2.1) registrando gli andamenti di: O₂, pH, e T°.

Dopo due giorni dall'inizio dell'esperimento, il valore del pH è stato corretto e bilanciato come indicato dal protocollo Algares, mediante l'aggiunta di HCl o NaOH entrambi alla concentrazione 0,1 molare sterile, al fine di riportare tale valore tra 7 e 8 idoneo per la crescita delle colture microalgali come riferito anche da (Hodaifa et al., 2009; Maraskolhe et al., 2012) in merito agli effetti negativi prodotti da valori di pH superiori a 9.

Gli effetti osservati delle variazioni del pH (vedi Figura 36) in questa sperimentazione preliminare sono dovuti all'attività fotosintetica della coltura cellulare che tende a innalzare il pH della coltura. Certamente l'aggiunta di un flusso di CO₂ in bombola avrebbe compensato il leggero aumento di pH dovuto all'attività fotosintetica ma la turbolenza generata dal flusso continuo di gas nelle colture microalgali avrebbe generato interferenze negative al campo acustico oggetto di studio. E' da rilevare che i fbr sono aperti in alto e quindi scambiano ossigeno e anidride carbonica con l'esterno, scambio facilitato dall'agitazione del brodo di coltura.

Si è deciso di ottimizzare le produzioni di biomassa solo dopo aver ottenuto le prime conferme sperimentali sugli effetti prodotti dalle onde acustiche e, osservare quindi le reali potenzialità della *Scenedesmus obliquus* nell'abbattimento della CO₂ da combustione per oltre il 48%, e in condizioni ottimali fino al 67% (Maraskolhe et al., 2012; Fang Li et al., 2011; Hsin Ho et al., 2010) emessa da una cemeniera (Barker et al., 2009), ambito di questi approfondimenti di ricerca.

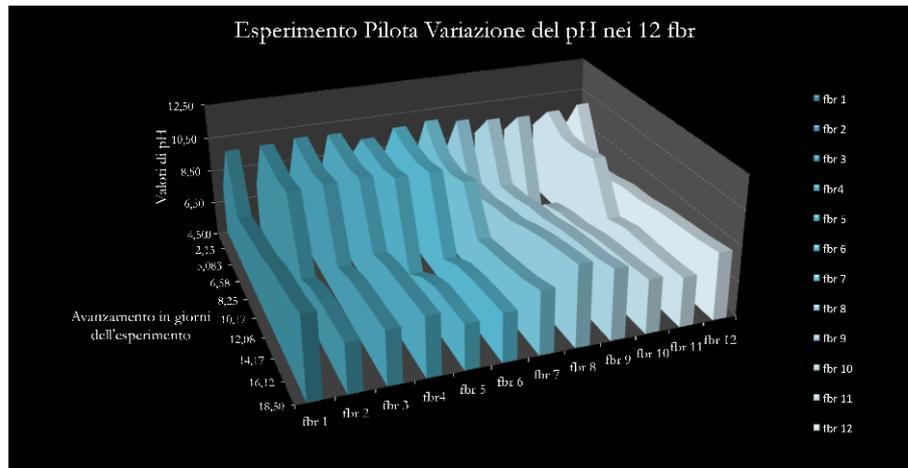


Figura 36: Monitoraggio dei valori di pH durante l'avanzamento dell'esperimento pilota con i 12 fbr.

La misura della temperatura delle colture microalgali è stata rilevata unitamente a quelle del pH e dell'ossigeno ed è stata mantenuta costante con la termoregolazione del laboratorio a $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Con le misure spettrofotometriche è stato eseguito monitoraggio del valore di assorbanza con il quale sono state ottenute rapide informazioni sulla crescita delle colture.

Durante l'avanzamento delle colture e durante il progredire della crescita sono state ottenute le conferme sperimentali dalle misure di conta cellulare mediante la camera di burker, il granulometro laser e lo Scepter coulter counter.

Dai campioni prelevati durante la crescita delle colture nei 12 fbr, è stata prelevata da ciascuno di essi una aliquota pari a 3 mL, suddividendo ciascuno in 3 campioni da 1 mL e sono stati sottoposti a misure spettrofotometriche alla lunghezza d'onda pari a 678 nm. I valori ottenuti sono stati elaborati graficamente con il Log OD+ 10 (come da protocollo Algares).

Nella Figura 37 sono stati confrontati i valori di densità ottica misurata sui campioni dei fbr centrali di ciascun triplicato. Per una migliore comprensione si ricorda che:

- Il fbr 2 ha lavorato con uno Sweep di segnale acustico compreso tra (0,1 e 6 kHz);
- Il fbr 5 è stato stimolato con un segnale acustico di 2 kHz;
- Il fbr 8 è stato stimolato con un segnale acustico di 6 kHz;
- Il fbr 11 di controllo non è stato stimolato acusticamente.

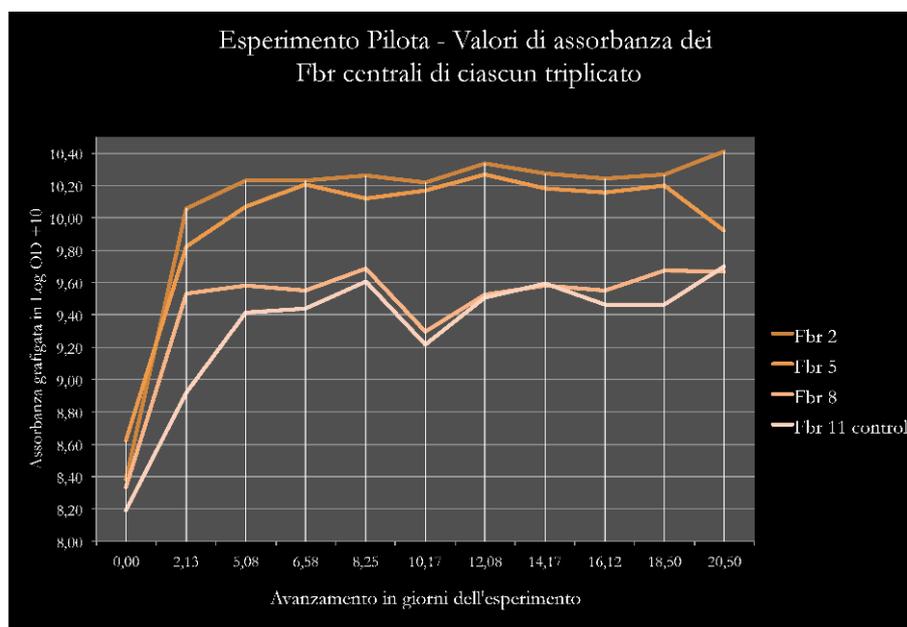


Figura 37: Misure di assorbanza (ripetute tre volte) ottenute con la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 648 nm di campioni di microalghe prelevati nel corso dell'avanzamento dell'esperimento dai fbr centrali di ciascun triplicato 2,5,8 e 11 di controllo.

I risultati osservati con il metodo ottico hanno evidenziato subito le differenze nel rate di crescita tra le colture stimulate con i diversi programmi sonori i cui effetti erano visibili anche ad occhio nudo per il colore caratteristico dei pigmenti di clorofilla di diversa tonalità. In corrispondenza del secondo e terzo giorno dall'inizio dell'esperimento, come evidenziato anche dai valori del pH, subito dopo aver "aggiustato" i valori con le modalità in precedenza descritte, sono stati osservati importanti fenomeni di flocculazione con la formazione di grossi aggregati cellulari visibili ad occhio nudo che si depositavano sul fondo dei fbr. Nei fbr stimolati acusticamente la coltura appariva più limpida (minore formazione di macro aggregati cellulari). Certamente, il verificarsi di questo effetto, ha in parte condizionato l'esito delle misure spettrofotometriche.

Per questo motivo al verificarsi di questo evento, sono stati eseguiti nuovi approfondimenti ed esperimenti di laboratorio con l'intento di risolvere il problema dell'assenza di agitazione delle colture. Da esso, infatti, dipendono i fattori di degasamento dell'ossigeno molecolare e di ombreggiamento cellulare, molto limitanti in una coltura batch priva di scambio di gas con l'ambiente esterno che ha determinato variazioni così importanti nel valore del pH.

Concludendo, la differente quantità di biomassa prodotta nei tre fbr stimolati acusticamente con lo Sweep nei fbr 1,2 e 3 rispetto alla linea di fbr di controllo 10,11 e 12 al di là dei

fenomeni osservati e descritti di flocculazione spontanea, è stata chiaramente evidente come documentato nelle immagini seguenti:

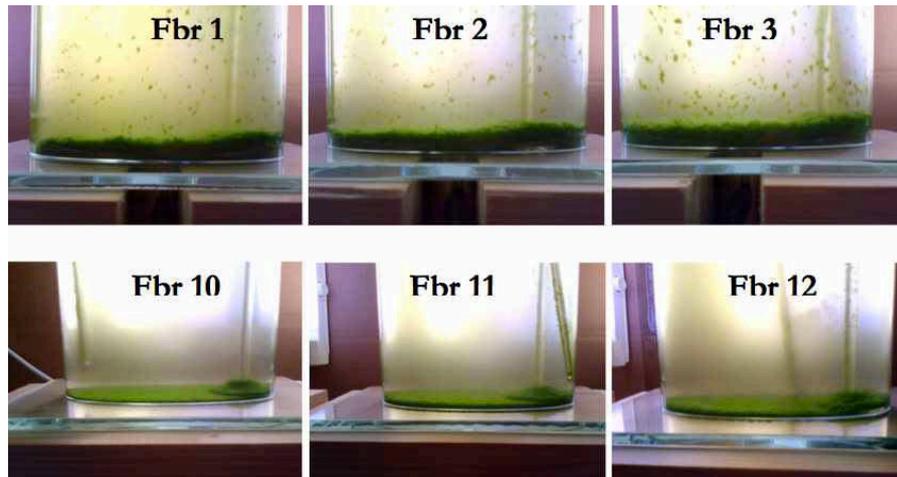


Figura 38: Le immagini si riferiscono ai fbr 1,2 e 3 stimolati acusticamente con lo Sweep e alla linea di controllo, fbr 10,11 e 12 colture cresciute in assenza di stimolazioni.

4.2.5 Le misure di bioacustica e le registrazioni dei segnali in acqua

Nel corso della sperimentazione pilota, sono state registrati i suoni trasmessi attraverso la colonna d'acqua dei fbr durante la crescita microalgale nel tempo. I suoni trasmessi sono stati campionati nello strato d'aria presente sul pelo libero della coltura microalgale (vedi Figura 39) mediante un microfono a condensatori posto sul bordo superiore aperto di ciascun fbr.

I suoni rilevati dal microfono sono stati in seguito elaborati e trasformati in uno spettrogramma riportante le frequenze e le intensità delle onde acustiche uscenti dal fbr.

Dalle elaborazioni delle tracce audio registrate al tempo zero (inizio dell'esperimento), dopo 7 e 14 giorni sono emerse importanti correlazioni che ci hanno indotto ad approfondire il campo acustico di risposta di ciascun fbr, con particolare riferimento al valore di intensità della pressione acustica rilevata in rapporto alle popolazioni di cellule di microalghe e/o di particelle presenti nel mezzo di coltura.



Figura 39: Particolare dei prelievi di biomassa sui fbr e delle misure di acustica (immagine di destra) con il microfono a condensatori nello strato di aria appena sopra il pelo libero delle colture nei fbr.

Con i software open source Audacity e Sonic Visualiser sono state rielaborate le tracce audio registrate relativamente al fbr 1 rispettivamente dopo 1, 7 e 14 giorni dall'inizio dell'esperimento allo scopo di rilevare sullo spettrogramma, il comportamento delle onde sonore trasmesse attraverso il mezzo di coltura, all'aumentare della concentrazione delle cellule microalgali (vedi Figura 29 e Tabella 6).

Si è visto come la riproducibilità di questa prova dipenda essenzialmente dalla rapidità di esecuzione delle misure. Tra il termine dell'agitazione manuale necessaria a risospendere la coltura microalgale e la riproduzione del segnale acustico nei fbr da registrare, occorre standardizzare l'intervallo di tempo necessario ad effettuare le prove, per evitare di falsare le misure a causa dei diversi tempi di sedimentazione delle particelle lungo la colonna d'acqua dei fbr.

Le colture microalgali, infatti, crescono a diverse concentrazioni di cellule per millilitro e assumono diverse distribuzioni dimensionali a seconda dei programmi di stimolazione impiegati, e questo fa cambiare continuamente nel tempo le caratteristiche di sedimentazione delle cellule di *Scenedesmus obliquus* che non sono dotate di moto proprio.

Nello Spettrogramma relativo alle registrazioni acustiche dei tre fbr (Figura 40), sono state visivamente delimitate con cerchi di colore blu gli intervalli di frequenza acustica (0,1 – 2 kHz), in cui è stato osservato il fenomeno dell'incremento dell'intensità dei segnali acustici misurati durante i tre intervalli di tempo considerati a partire dal giorno di inizio. Nel periodo osservato è stato infatti riscontrato un incremento delle concentrazioni cellulari nei tre fbr esaminati.

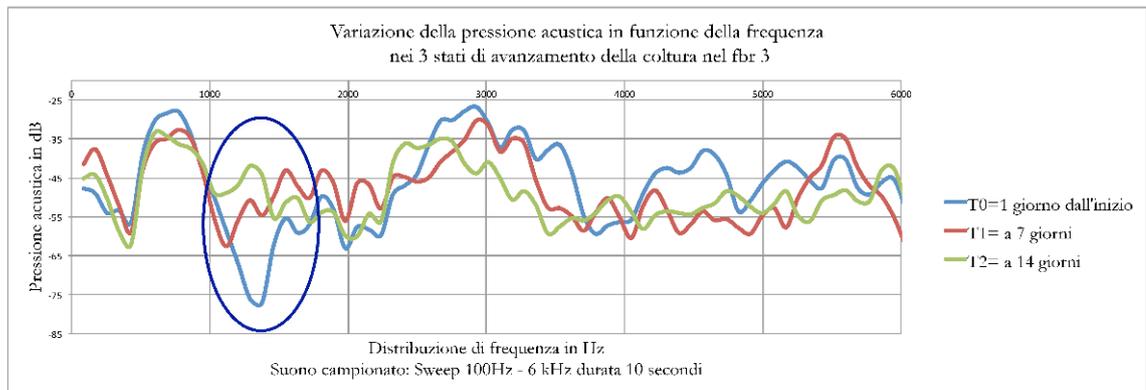
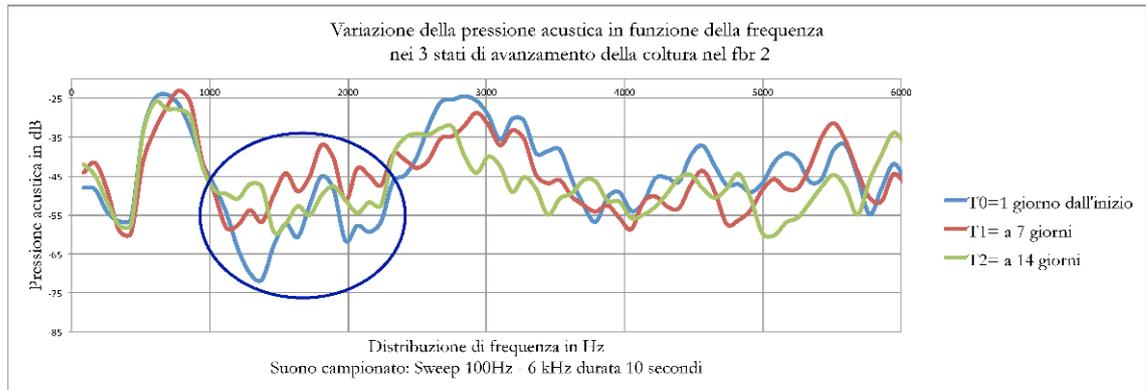
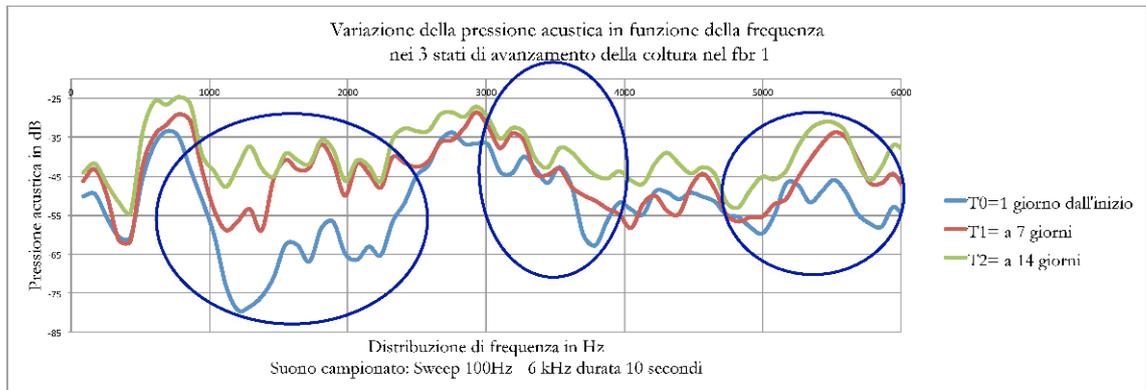


Figura 40: Spettrogramma delle registrazioni acustiche nei 3 fotobioreattori a partire dal giorno 1, 7 e 14 dall'avvio dell'esperimento.

La riproducibilità delle suddette misure, dipende anche dal livello del pelo libero della coltura microalgale che, durante l'avanzamento dell'esperimento, deve essere mantenuto costante al fine di non modificare il campo acustico dei segnali riprodotti dal sistema attuatore acustico – fbr nel mezzo di coltura.

Per verificare l'attendibilità di queste osservazioni (Jundt et al., 2005) e quindi di come cambiano le frequenze di risonanza prodotte dal sistema fbr – coltura microalgale e quindi dei modi di vibrazione meglio descritti nei paragrafi 4.1.1 e 4.1.2, sono state effettuate

sempre in Ancona nei laboratori di misure meccaniche con la collaborazione dell'Ing. Paolo Castellini le prove sulla modifica del campo acustico.

Sono state introdotte nel fbr in esame aliquote sempre diverse di acqua e coltura microalgale in modo da simulare diverse concentrazioni e livello di altezza delle colture nei fbr, registrando i segnali acustici riprodotti dall'attuatore con un idrofono posto in immersione a diverse altezze lungo la colonna d'acqua.

L'esito di queste misure (vedi Figura 41) ha confermato la validità del protocollo sperimentale impiegato che impone il rabbocco delle colture microalgali a seguito di ciascun prelievamento biologico di campioni e il reintegro delle aliquote di acqua dispersa per evaporazione.

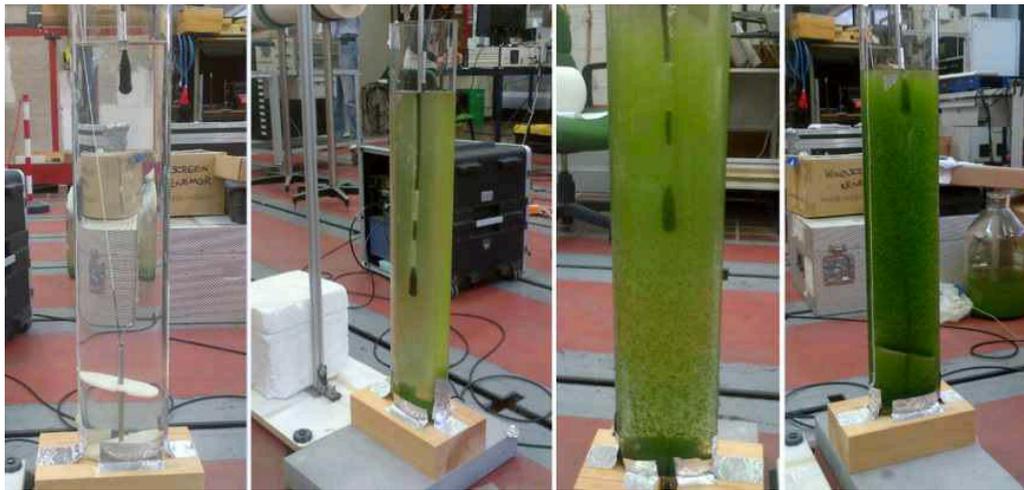


Figura 41: Le misure di bioacustica presso il laboratorio di misure meccaniche della Facoltà di Ingegneria dell'Università Politecnica delle Marche. Con l'idrofono in immersione posto a diverse altezze, sono state effettuate le misure a diverse concentrazioni e livello di biomassa nel fbr in esame.

Terza Sessione

4.4 Realizzazione del sistema di agitazione sincrono, seriale e automatizzato delle colture nei 12 fbr.

Lo studio sui sistemi di agitazione delle colture cellulari, in questo lavoro di bioacustica, ha richiesto particolare attenzione sull'impiego di dispositivi convenzionali a basso impatto acustico, al fine di prevenire possibili interferenze sovrapponibili alle basse frequenze impiegate in questa sperimentazione.

Sono state pertanto eseguite diverse prove sperimentali per testare vari sistemi di agitazione, tra cui ventoline, agitatori magnetici, micromotori a immersione, ma con risultati non soddisfacenti a causa del rumore di fondo provocato nel mezzo di coltura dal contatto tra questi congegni e la superficie dei fbr.

Nella fase preliminare al test sperimentale è stato condotto uno studio sulla rumorosità di differenti metodi di agitazione meccanicamente potenzialmente applicabili ai fotobioreattori per mantenere le alghe in sospensione.

I test hanno evidenziato che tutti i metodi normalmente impiegati per il mescolamento producono onde sonore non trascurabili su un'ampia banda di frequenza. Ad esempio, com'è possibile vedere in Figura 42, l'agitazione tramite magnete produce un rumore molto più intenso dello stesso stimolo acustico.

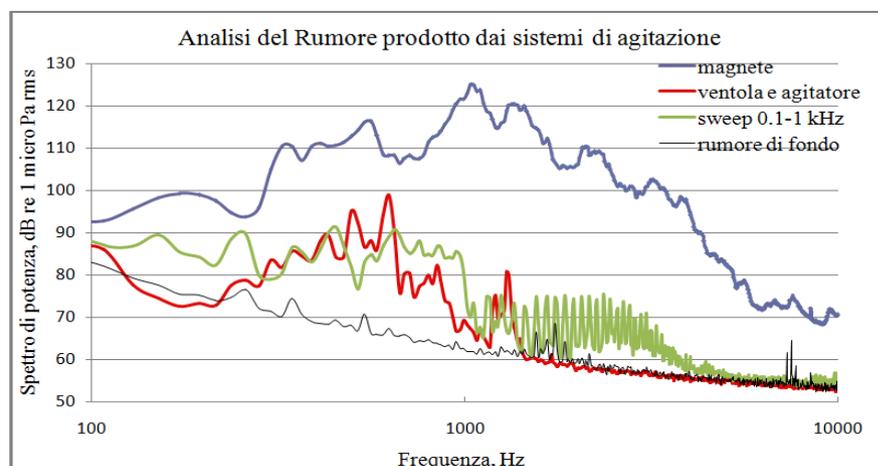


Figura 42: Rappresentazione grafica della pressione acustica esercitata da ciascun sistema di agitazione della coltura esaminato confrontata con quella ottenuta con lo sweep 0,1 - 1 kHz impiegato nella sperimentazione. In ordinata sono riportati i valori in decibel ricorretti in acqua e l'unità di misura dB relativo in micro Pascal rms.

In queste condizioni di rumorosità, l'impiego di questi sistemi avrebbe sicuramente reso fuorviante i risultati sperimentali.

Si è quindi deciso di procedere alla coltivazione delle microalghe senza l'impiego di un sistema di agitazione convenzionale poiché il rumore prodotto avrebbe interferito in maniera rilevante con la stimolazione acustica oggetto dell'esperimento. Le colture sono state quindi agitate manualmente ogni due giorni mediante dieci azioni manuali di salita e discesa di una astina di vetro provvista di un piccolo disco all'estremità, in occasione delle misure e dei prelievi di biomassa per le analisi di laboratorio.

Ciascun fbr è stato corredato da un tubo di plastica del diametro di 4 mm, in cui è stata fatta fluire aria microfiltrata con i filtri Whatman con una porosità di 0,22 μm , regolando il flusso in modo tale da assicurare un lento rilascio con un numero di bolle compreso tra 30 – 35 al minuto e di piccola dimensione, per ridurre il rumore prodotto nella risalita lungo la colonna d'acqua dei fbr.

E' stato quindi misurato il livello della pressione acustica in acqua, con l'impiego di un microfono a condensatori sistemato appena subito sopra il pelo libero della coltura sul bordo superiore aperto del fbr.

Anche in questo caso, il sistema di agitazione a bolla d'aria ha evidenziato problemi in merito alla disposizione dei filetti fluidi generati dalle bolle che muovendosi verso la superficie, trasportavano con esse la coltura microalgale generando un positivo effetto di risospensione. Accadeva che, in prossimità del tubicino di rilascio delle bolle, come raffigurato in Figura 43, il fbr appariva libero da depositi di microalghe che invece iniziavano a stratificarsi nelle zone del fbr dove erano assenti le perturbazioni provocate dalle bolle di aria.

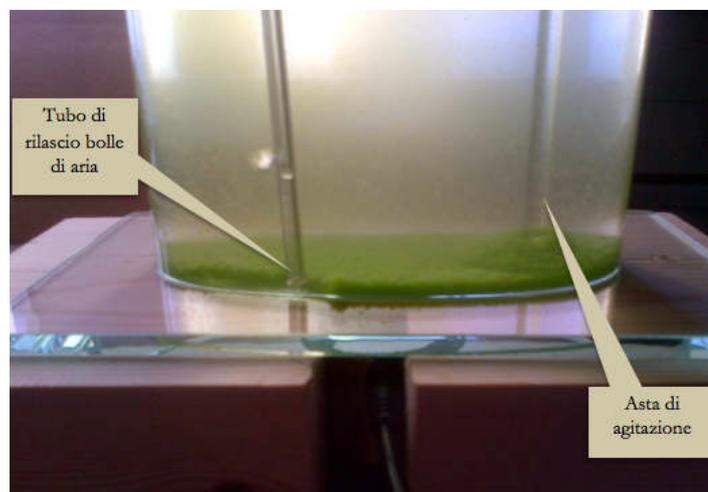


Figura 43: Il particolare del tubicino di rilascio delle bolle d'aria e la stratificazione della biomassa sul fondo dei fbr e in corrispondenza del piattello alla base dell'astina di vetro per l'agitazione manuale.

E' stata poi eseguita una complessa attività di elaborazione delle tracce audio registrate al fine di valutare l'intensità e la frequenza generata dal rumore prodotto dalle bolle d'aria che venivano rilasciate nei fbr. E' stata studiata la forma d'onda generata prendendo a base delle osservazioni sulla traccia audio le perturbazioni prodotte da due bolle d'aria consecutive e la porzione della traccia audio denominata pausa silente, in modo da avere una corretta indicazione sull'impatto acustico provocato dalle bolle nei fbr.

E' stato quindi sotto campionato il segnale audio nell'intervallo di ciascuna bolla d'aria (vedi Figura 44) e nel tratto silente presente tra le due bolle (in cui è presente solo il rumore di fondo) e da queste analisi è stato possibile determinare univocamente le caratteristiche sonore di queste emissioni.

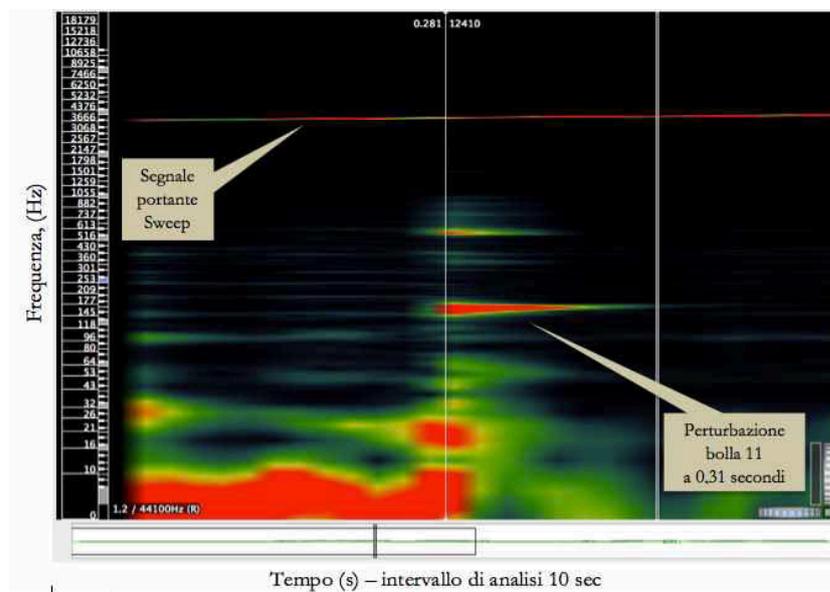


Figura 44: Nello Spettrogramma la registrazione audio del segnale Sweep riprodotto nel Fbr 1. Si può osservare l'impatto acustico provocato dalla bolla 11 (esaminata) a 0,31 secondi, rispetto al suono portante sweep impiegato nella sperimentazione.

L'esito delle elaborazioni delle tracce audio registrate ha evidenziato caratteristiche di frequenza e intensità delle perturbazioni sonore, provocate dal fluire delle bolle di aria nelle colture microalgali, tali da non garantire una buona riproducibilità negli esperimenti futuri.

Alla luce di quanto è emerso da questa preliminare sperimentazione è stato, quindi, necessario predisporre metodi alternativi al mescolamento delle colture microalgali.

L'attività si è quindi concentrata nella messa a punto di un sistema valido e continuo nel tempo in grado di mantenere il più possibile in sospensione le colture microalgali, evitando la

formazione di biofilm cellulari sulle pareti dei fbr, riducendo la formazione di aggregati cellulari e mantenendo le colture microalgali in movimento continuo e in assenza di rumori. In questo modo un maggior numero di cellule delle colture partecipa attivamente ai processi fotosintetici, in seguito all'aumento della superficie microalgale esposta alla radiazione luminosa.

4.4.1 Analisi con il blue di metilene per la validazione del dispositivo di agitazione

Nella fase di costruzione del prototipo del sistema di agitazione⁸, realizzato con materiali inerti mediante due palette di teflon collegate ad un asse verticale in acciaio, libero di muoversi nel fbr con moto alternativo dall'alto verso il basso e viceversa, sono state effettuate prove sperimentali preliminari con l'impiego di 1 mL di blue di metilene allo scopo di osservare e monitorare nel tempo, la sua distribuzione nella colonna d'acqua del fbr con e senza l'azionamento del sistema di agitazione.

Da queste prove è stato possibile osservare la distribuzione dei filetti fluidi nel fbr, e la loro completa dissolvenza nell'acqua bidistillata del volume pari a 4 L dopo sole tre azioni di salita e discesa delle palette di agitazione.

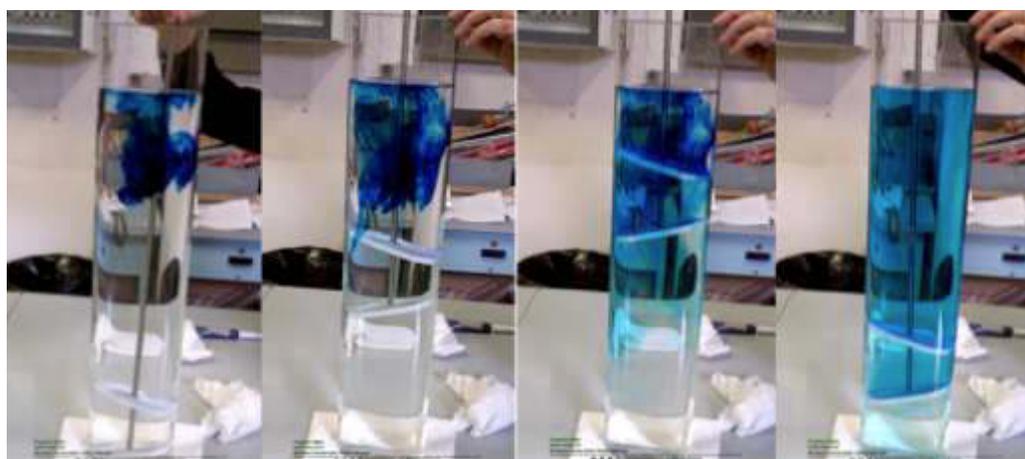


Figura 45: Prove sperimentali di validazione del sistema di agitazione con il blue di metilene.

⁸ La realizzazione del sistema di agitazione è stata affidata alla Ditta EGW Snc di Perugia di Giuseppe ed Ettore Franceschini.

Le osservazioni empiriche sulla diffusione del blue di metilene, nella fase di costruzione dei prototipi dell'agitatore, hanno permesso di ottimizzare l'orientamento delle palette raffigurato in Figura 45, dimensionando lo spessore della palette agitatrice (4 mm) e la geometria pari alla medesima sezione ellittica del tubo con una luce tra il diametro del fbr e la palette compreso tra i 4 e i 6 mm per favorire lo scorrimento della biomassa e innescare così dei moti di rotazione (microvortici in assenza di turbolenza), migliorando la distribuzione delle microalghe nel terreno di coltura contenuto nei fbr.

Questi rapporti dimensionali e l'inclinazione delle palette collegate all'asse hanno permesso, nelle prove di laboratorio, di raggiungere il migliore compromesso nella distribuzione e agitazione delle colture nei fbr, riducendo al tempo stesso gli attriti dovuti allo scorrimento dell'agitatore lungo la superficie del fbr.

La stessa prova è stata poi ripetuta in contemporanea su altri due fbr, di cui uno munito di trasduttore acustico. Sul pelo dell'acqua libero di entrambi è stato versato 1 mL di soluzione di blue di metilene e per il tubo stimolato è stato riprodotto il segnale acustico dimostratosi più performante, e cioè lo sweep di frequenza da 100 Hz a 6 kHz circa della durata di 10 secondi che si ripeteva ciclicamente.

Allo stesso tempo è stato avviato il cronometro. E' stato osservato (vedi Figura 46) che la soluzione di blue di metilene ha iniziato a diffondersi per gravità con una velocità doppia nel fbr privo di stimolazione acustica giungendo sul fondo nel tempo di 2 minuti circa contro i 4 minuti impiegati dal fbr stimolato acusticamente.

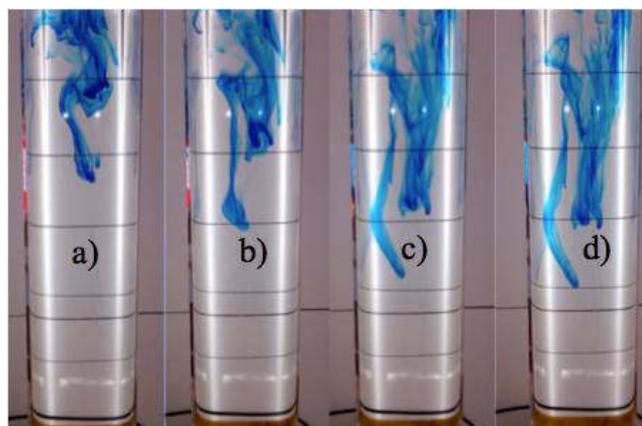


Figura 46: Sequenza della diffusione e sedimentazione del blue di metilene dalla lettera a) alla d) durante la riproduzione dello sweep di segnale acustico.

Queste prove di validazione del sistema manuale di agitazione sono state effettuate con una coltura microalgale ad una concentrazione pari a circa $2,8 \times 10^6$ ccell/mL, avviando registrazioni video durante le fasi di agitazione della coltura microalgale.

Dalle osservazioni dei filmati a velocità rallentata è stato possibile osservare e documentare gli effetti macroscopici dei vortici creati dall'inclinazione delle palette che, muovendosi nella colonna d'acqua, con la loro particolare inclinazione imprimono alla coltura veri e propri flussi rotazionali (Figura 47), favorendo così una migliore risospensione delle microalghe lungo la colonna d'acqua.

In questo modo è stata eliminata la stratificazione sul fondo dei fbr di biomassa osservata nella sperimentazione pilota. Il debole flusso delle bolle d'aria non riusciva infatti a risospingere bene la coltura cellulare e il moto di risalita delle bolle d'aria lungo la colonna d'acqua determinava inoltre una maggiore sedimentazione delle microalghe nei punti di assenza di turbolenza, rallentando così la fotosintesi nelle cellule stratificate sul fondo del fbr.



Figura 47: Particolare dei moti e vortici rotazionali che si osservano nel fbr durante il moto alternativo dell'agitatore lungo la colonna del fbr.

4.4.2 Automazione del dispositivo e studio del protocollo sperimentale

Una volta ottimizzata la diffusione del blue di metilene nel volume pari a 4 l. dei fbr con le osservazioni empiriche dei filetti fluidi che si dissolvevano completamente in soluzione dopo sole tre agitazioni complete (tre azioni complete di salita e discesa lungo la colonna d'acqua del fbr), è stato studiato l'automatismo capace di imprimere sugli agitatori il moto alternativo lungo la colonna d'acqua, al fine di migliorare la riproducibilità del sistema di agitazione.

Le condizioni imposte al sistema erano di trasmettere contemporaneamente il moto alternativo seriale ai 12 fbr, con la possibilità di scelta dei programmi di agitazione in cui

fosse possibile agire sul numero e sulla velocità delle azioni di salita e discesa delle palette lungo la colonna d'acqua ed impostare le azioni di pausa lavoro tra una serie di agitazioni e la successiva.

In particolare, il disegno sperimentale del protocollo di agitazione è stato impostato in funzione delle osservazioni empiriche e delle concentrazioni di cellule di microalghe ottenute nella sperimentazione pilota, in modo da individuare un programma di agitazione che fosse valido nei 7 giorni di durata di ciascun esperimento di crescita, in funzione del diverso comportamento nella velocità della sedimentazione delle microalghe nei fbr.

Le palette di teflon sono state collegate a degli assi in acciaio inox posto in movimento mediante filo di nylon del diametro di 0,50 mm, collegati ad un asse tubolare in alluminio posto a 30 cm dal bordo superiore dei fbr (vedi Figura 48) e posto in rotazione da un motore munito di riduttore di velocità e fine corsa meccanici. Le rotazioni destra/sinistra del tubo orizzontale motorizzato, che hanno trasmesso agli agitatori il moto alternativo lungo la colonna di ciascun fbr, e le azioni di pausa/lavoro sono state ottenute mediante l'uso di contattori e relè con i quali sono state programmate il numero e la durata di ciascun ciclo di agitazione delle colture microalgali.



Figura 48: Il tubo di alluminio posto orizzontalmente sopra il bordo aperto dei fbr con la sua rotazione a dx e sx, avvolge e rilascia il filo di nylon a cui sono collegati gli agitatori che così si muovono in modo alternativo lungo la colonna di ciascun fbr.

4.4.3 Misure Spettroradiometriche di verifica della sedimentazione delle colture nei fbr e validazione dei timesheet di pausa lavoro dell'agitazione

Nella validazione del dispositivo di agitazione, le prove preliminari sulla diffusione del blue di metilene sono state ripetute con le colture microalgali impiegate a diversa concentrazione, ottenuta mediante l'aggiunta al terreno di coltura della quantità di microalghe pari a 200 mL in ciascuna sessione e mantenendo inalterato il protocollo di agitazione per numero di azioni e tempi di pausa tra una serie di agitazioni e la successiva.

Queste prove, realizzate con la collaborazione del Prof. Aldo Romani e della Dott.ssa Chiara Grazia del Dipartimento di Chimica – Sezione fotochimica dell'Università di Perugia, sono state effettuate con l'impiego di una sonda spettroradiometrica posizionata esattamente a metà dell'altezza del fbr permettendo di individuare, tra i diversi programmi di agitazione sperimentati quello con la migliore performance, che è stato adottato definitivamente nella sezione sperimentale consistente in un minuto di agitazione intervallato da nove minuti di pausa, ripetuto ciclicamente nelle 24 ore.

Lo Spettroradiometro ha misurato sulla superficie del fbr 1 opposta a quella illuminata, l'intensità (irradianza) e la forma spettrale della radiazione luminosa nelle rispettive lunghezze d'onda 435 e 549 nm.

Le misure d'irradianza sulla superficie posteriore del fbr (illuminata dal cammino ottico del flusso fotonico assiale proveniente dalle lampade, che ha attraversato la prima superficie in vetro del fbr, la coltura microalgale e la seconda parete di vetro), sono state poi confrontate con quelle ottenute con la sonda radiometrica Li-Cor dove viene normalizzato il valore del PAR ovvero della radiazione fotosinteticamente attiva che concorre alla crescita delle colture, metodo impiegato nel rilevamento dei diversi tempi di avanzamento delle colture attraverso il monitoraggio dei valori di assorbanza.

Ancor prima di compiere le misure, sono state individuate le due bande spettrali in cui la clorofilla è più efficiente nella conversione fotochimica, in modo da monitorare in queste regioni la variazione in intensità del flusso fotonico emesso dalle lampade.

Sono state quindi eseguite le analisi dinamiche di validazione del sistema di agitazione con e senza le stimolazioni acustiche.

Infatti, durante l'avanzamento delle colture, sono stati notati diversi comportamenti tra le colture nei fbr per quanto riguarda la velocità di sedimentazione di aggregati cellulari visibili ad occhio nudo e si è pensato di monitorare questi diversi effetti.

E' stata così determinata per ciascun fbr non solo il valore d'intensità media del flusso fotonico nei 9 minuti intercorrenti tra una agitazione meccanica e la successiva, ma soprattutto un dataset di informazioni sulla diversa velocità di sedimentazione delle colture microalgali che è stato successivamente messo in relazione con i valori di concentrazione cellulare e con la distribuzione dimensionale il peso secco e dei valori di assorbanza rilevati con la sonda Li-Cor.

Lo scopo era di osservare se, durante l'avanzamento delle colture, al variare del valore d'irradianza residua, si generava all'interno del fbr un'azione di shift dello spettro originario prodotto dalla lampada a causa dei fenomeni di scattering e ombreggiamento dovuto alla pigmentazione delle clorofille, ai metaboliti rilasciati nel terreno di coltura e all'aumento della concentrazione microalgale.

I fenomeni di scattering della luce riflessa sulla superficie di una coltura microalgale nella lunghezza d'onda del PAR è stata stimata in una sospensione cellulare di *Spirulina* in un valore inferiore al 2% (Iehana, 1987).

Misure di irradianza del fbr 1 nel periodo intercorso tra due agitazioni meccaniche (9 minuti)

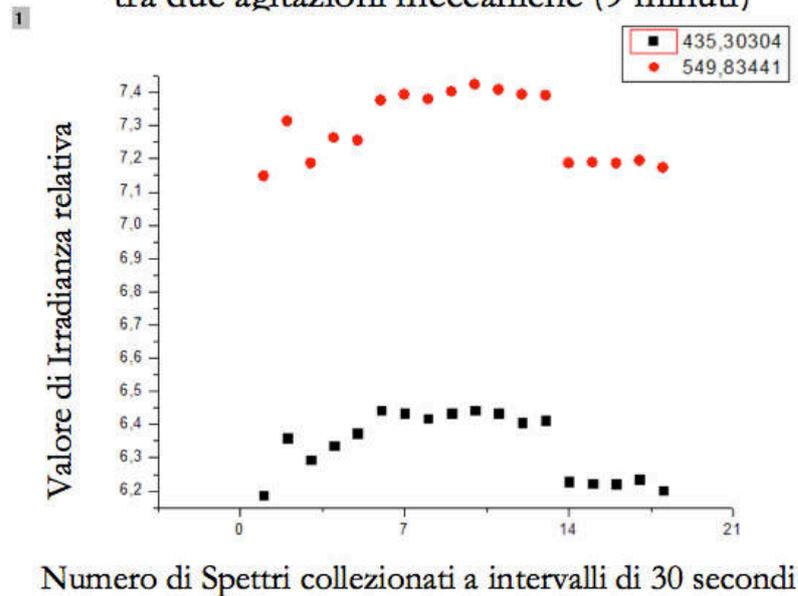


Figura 49: Grafico della distribuzione relativa dell'irradianza rilevata dallo Spettrometro ad intervalli pari ad 1 minuto nelle due bande spettrali della radiazione elettromagnetica.

Con lo Spettrometro sono stati collezionati 18 spettri a intervalli di 30 s con un tempo di risoluzione di 100 ms e 100 finestre di misura.

Nel grafico di figura 49, in corrispondenza dei primi tre spettri si è avuto un repentino incremento dell'intensità misurata $(30 \text{ sec} \times 3) + (100 \text{ ms.} \times 3) = 90,300 \text{ sec}$ e in seguito la coltura ha continuato a sedimentare gradualmente fino al termine dei 9 minuti.

In corrispondenza del 14° spettro, si è invece avuta una repentina riduzione di intensità a causa dell'avvio del nuovo ciclo di agitazione che ha risospeso la coltura microalgale, riducendo così l'irradianza rilevata dallo Spettroradiometro.

La prova è stata ripetuta con il medesimo protocollo con diverse concentrazioni di cells/mL e, alla fine delle misure sperimentali, è stata confermata la validità del disegno sperimentale di impiego del sistema di agitazione consistente in un minuto (5 azioni complete di agitazione lungo la colonna d'acqua) alternato a 9 minuti di pausa, in modo da ottenere 6 cicli di agitazione su base oraria.

Questo setup sperimentale (vedi Tabella 7) come si vedrà più avanti è stato utilizzato nelle due successive sperimentazioni del disegno fattoriale Doe.

Programma Agitazioni meccaniche (minuti)			
	10 minuti	1 ora	24 h
Pausa	9	54	1296
Lavoro	1	6	144
Tot	10	60	1440

Tabella 7: Programma delle agitazioni meccaniche ritenuto idoneo nelle condizioni di durata dei cicli sperimentali di una settimana in rapporto alle concentrazioni microalgali di avvio e termine esperimento e alla velocità di sedimentazione delle microalghe.

Con queste prove si è quindi cercato di monitorare il valore dell'intensità media e della qualità spettrale della luce che dopo aver attraversato la coltura, trasporta con se lungo il cammino ottico importanti informazioni generate dalla composizione dei terreni di coltura, dalla presenza dei metaboliti, dalle concentrazioni e stadio di crescita delle microalghe più o meno ricche di pigmenti fotosintetici (Chl *a*, Chl *b*), come presentato nel modello cinetico di Acien Fernandez et al., 1997 e Molina Grima et al., 1999

Infatti, nelle colture batch come quelle descritte in questa ricerca, bisogna considerare che, al di là della capacità di rimozione dei nutrienti e di una diversa cinetica di crescita, il sistema fbr risponde in modo diverso non solo per effetto delle stimolazioni acustiche, ma anche per gli effetti sulla crescita algale che rallenta a causa della maggiore densità ottica della coltura (un numero superiore di cellule/mL) e dei metaboliti presenti nei fbr.

Solo una frazione del flusso fotonico che attraversa ortogonalmente il fbr viene assorbito dalle cellule (Carvalho et al., 2011) e tale valore dipende dalla distribuzione dimensionale delle cellule in sospensione e quindi dalla densità, dalle proprietà ottiche delle stesse, dalla distanza delle lampade e soprattutto del sistema di agitazione impiegato.

I fotoni che non prendono parte ai processi di conversione fotochimica, vengono dissipati dalle cellule sotto forma di calore e in parte vengono riflessi anche tra le stesse cellule provocando i fenomeni di scattering.

Come si vedrà dallo studio sulle cinetiche di crescita, i risultati ottenuti in seguito a differenze nei rate di crescita delle microalghe, determinano in ciascun fbr condizioni di opacità e intorbidimento della coltura estremamente diverse rendendo difficoltosa la loro interpretazione.

Una rapidità nella crescita ottenuta con la stimolazione acustica in queste condizioni limitanti, comporta una consistente diminuzione della trasparenza della coltura e quindi della penetrazione della luce.

Pur tuttavia, questi effetti di accelerazione della crescita sono stati notati e di sicuro verranno amplificati nelle future prove sperimentali con fbr a ciclo discontinuo in cui il terreno viene costantemente arricchito di nutrienti e parte della coltura microalgale rinnovata.

Quarta Sessione

4.5 Disegno fattoriale e ottimizzazione dei parametri di crescita

Per ottimizzare i parametri della crescita delle microalghe, già osservati nell'Esperimento Pilota, sono stati approntati diversi programmi di stimolazione acustica in cui sono stati testati suoni nell'intervallo tra 100 Hz e 10 kHz con un diverso numero di cicli di stimolazioni e diversi valori della pressione acustica dei segnali inviati nelle colture microalgali.

Per valutare l'effetto dei parametri strumentali sul comportamento delle colonie di microalghe è stato usato il software *Design Expert 8.0.7.1* impiegando un disegno fattoriale 2^k . Le variabili scelte, interpolate con un'equazione polinomiale quadratica (Eq. 1), sono riassunte in Tabella 8.

Tabella 8. Variabili indipendenti considerate			
Variabili	Limite inferiore	Limite superiore	U.M.
Frequenza (A)	100	10000	Hz
Intensità (B)	-3	6	rel.
Durata (C)	0.5	12.5	ore

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + e \quad \text{Eq. 1}$$

dove y è la risposta, b_0 , b_i , b_{ii} e b_{ij} sono i coefficienti di regressione, x_i , x_j è il livello del fattore i -esimo, j -esimo come riportato in Tab. 1 ed e è l'errore casuale residuo del modello.

I limiti inferiori e superiori delle variabili sono state selezionate sulla base di esperimenti preliminari e la letteratura nel settore. Le variabili dipendenti o risposte sono il numero di cellule ed il rate di crescita *pro die*.

I modelli sono stati valutati statisticamente tramite ANOVA che ha permesso di calcolare le superfici di risposta per le variabili usate.

Le superfici di risposta ottenute sono state combinate applicando l'approccio della desirability totale (Derringer and Suich, 1980), che è rappresentato dall' Eq. 2:

$$f(d_{(g)}) = \frac{\sum_{i=1}^M w_i d_i}{\sum_{i=1}^M w_i} \quad \text{Eq. 2}$$

dove $f(d_{(g)})$ è la desirability totale, d_i è la desirability dell' i -esima risposta, M è il numero di risposte e w è il peso di ogni risposta specificato dall'utente.

Questo approccio consente di individuare la regione ottimale dello spazio sperimentale precedentemente scelto.

In questo modo è possibile restringere la regione nella quale i criteri di ottimizzazione sono soddisfatti. La desirability assume valori tra 0 ed 1 ed il massimo di desirability corrisponde alle condizioni che forniscono il rispetto degli obiettivi stabiliti (optimum).

Analisi dei Check points

Al fine di valutare la capacità predittiva dei modelli ottenuti, è stata realizzata l'analisi di check points scelti in modo arbitrario all'interno dell'area di lavoro del disegno sperimentale. Un check point è stato prodotto in triplicato in modo da determinare lo scarto (bias) tra i valori predetti dal modello e quelli sperimentali misurati in triplicato. Un accordo inferiore al 20% di bias è stato considerato accettabile.

4.5.1 Descrizione del setup sperimentale

Con il setup sperimentale riportato in Tabella 8, le colture microalgali sono state sottoposte a cicli di stimolazioni acustiche che sono state impiegate solo nelle 12,30 ore del fotoperiodo della fase luminosa in accordo a quanto riferito anche da altri autori (Weinberger and Das, 1972). I cicli di stimolazione sono stati impostati in modo da essere riprodotti dopo 1,30 ore dall'accensione delle lampade al neon e di permanere nei programmi "laddove previsto" per un tempo massimo pari alla durata dell'illuminazione artificiale (12,30 ore), in modo che i cicli di stimolazione fossero riprodotti unicamente durante l'illuminazione artificiale delle colture.

Come visto in precedenza nei paragrafi 4.4.1, 4.4.2 e 4.4.3 sono state condotte attività sperimentali volte all'ottimizzazione della diffusione della radiazione luminosa nelle colture in funzione dei fenomeni di sedimentazione delle colture microalgali.

Nella tabella 9 è riepilogato il setup sperimentale impiegato nei due esperimenti del disegno fattoriale.

Setup Sperimentale Doe						
Fotoperiodo:	14 ore luce			10 ore buio		
Cicli di Stimolazioni:	1,30 ora	30 min	22 ore			
	1,30 ora	6,30 ore		16 ore		
	1,30 ora	12,30 ore			10 ore	
Cicli di Agitazione:	9 minuti pausa		1 minuto	9 minuti pausa		1 minuto
<small>Nel minuto di lavoro si compiono 6 azioni complete di salita e discesa delle palette agitatrici nelle colture microalgali</small>						

Tabella 9: Setup sperimentale utilizzato nelle due distinte attività sperimentali del Doe.

Ciascun ciclo delle stimolazioni acustiche ha avuto una durata di 30 minuti che è stata alternata ad un periodo di 1,30 ore nei fbr in cui i programmi hanno previsto una stimolazione prolungata a 6,30 e 12,30 ore. Nella Tabella 10 è stato indicato per i diversi cicli delle stimolazioni il tempo di durata delle stimolazioni e di pausa.

n.	Programma delle stimolazioni acustiche													Ore gg. Stimolaz.
1	Acoustic												30 minuti	
	30 min													
2	Acoustic	Silent	Acoustic	Silent	Acoustic	Silent	Acoustic						2 ore	
	30 min	1,30 h	30 min	1,30 h	30 min	1,30 h	30 min							
	6,30 h													
3	Acoustic	Silent	Acoustic	Silent	Acoustic	Silent	Acoustic	Silent	Acoustic	Silent	Acoustic	Silent	Acoustic	3,30 ore
	30 min	1,30 h	30 min	1,30 h	30 min	1,30 h	30 min	1,30 h	30 min	1,30 h	30 min	1,30 h		
	12,30 h													

Tabella 10: Programma delle stimolazioni acustiche impiegate delle due sperimentazioni del Doe.

La struttura dei suoni è stata campionata presso l'Università Politecnica delle Marche, dove i fbr e l'attuatore sono stati caratterizzati con la tecnica LDV descritta nella terza sessione nel paragrafo 4.3.3. In questo modo, si è cercato di ottimizzare il valore della frequenza ed intensità acustica realmente riprodotto nei fbr.

I valori dell'intensità dei segnali indicati nel programma delle stimolazioni acustiche sono puramente indicativi e riferibili unicamente alla scala prestabilita dal Software Nuendo 4 in cui è stato impostato il range di variabilità compreso tra (-3) e (+6) che indica il livello d'intensità minima e intermedia per la riproduzione dei segnali.

Le intensità dei segnali acustici riprodotti nel mezzo di coltura sono state rilevate accuratamente all'inizio di ogni esperimento con l'idrofono in immersione.

Solo a proposito del fbr 5 del secondo esperimento, è stato impiegato il valore di intensità relativa ridotto ad 1/5, al fine di non interferire con i fbr vicini dato il notevole rumore generato nella fase di spunto di ciascuna ripetizione ciclica di 10 secondi.

In ogni caso il fbr 5 non risultava incluso nel disegno fattoriale nel quale erano invece compresi solo suoni a frequenza fissa, al fine di ottenere una superficie tridimensionale di risposta in merito alle frequenze e segnali da investigare.

1 Esperimento del Doe									
Programma stimolazioni	Fbr 1		Fbr 3		Fbr 5		Fbr 7	Fbr 8	Fbr 9
Frequenza	100 Hz		100 Hz		100 Hz		100 Hz	10.050 Hz	10.050 Hz
Intensità	-3		6		-3		6	1,5	1,5
Durata Stimolazioni	30 min		30 min		12,30 h		12,30 h	6,30 h	6,30 h

Tabella 11: Programma delle stimolazioni acustiche osservato nel primo esperimento del disegno fattoriale.

2 Esperimento del Doe									
Programma stimolazioni	Fbr 1	Fbr 2	Fbr 3	Fbr 4	Fbr 5	Fbr 6	Fbr 7	Fbr 8	Fbr 9
Frequenza	10 kHz	10 kHz	10 kHz	10 kHz	Sweep	4.950 Hz	4.950 Hz	4.950 Hz	4.950 Hz
Intensità	-3	6	-3	6	-25	1,5	1,5	1,5	1,5
Durata Stimolazioni	30 min	30 min	12,30 h	12,30 h	12,30 h	6,30 h	6,30 h	6,30 h	6,30 h

Tabella 12: Programma delle stimolazioni acustiche osservato nel secondo esperimento del disegno fattoriale.

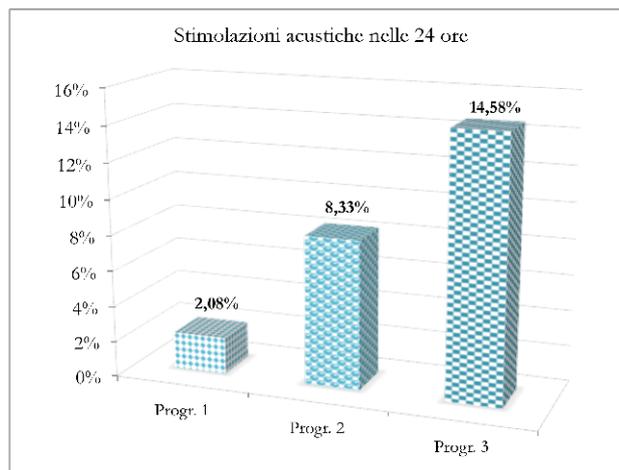


Figura 50: distribuzione percentuale della durata delle stimolazioni acustiche nei 3 programmi su base giornaliera.

In questo disegno sperimentale, sono state così investigate le risposte comportamentali delle colture microalgali sottoposte ad azioni di stress temporalmente molto diverse tra loro, al

fine di ottenere informazioni anche sui tempi di recupero e di eventuale inversione della crescita, oltre che di efficienza.

4.5.1 Risultati ottenuti dalle sperimentazioni del Doe. Le superfici di risposta tridimensionali.

In questo disegno fattoriale, gli esperimenti sono stati progettati in modo tale da soddisfare le condizioni imposte. Con il termine Desirability si vanno a ricercare i migliori valori di frequenza e durata delle stimolazioni acustiche in cui si ottengono i maggiori valori di biomassa e di velocità di crescita.

Al fine di determinare gli effetti di fattori principali sulla crescita delle microalghe è stato impostato un disegno fattoriale 2^k considerando la massa percentuale e il rate di crescita delle microalghe stesse. Il disegno è stato utile per esplorare l'effetto di fattori quali frequenza, intensità e durata dello stimolo, sulla crescita per determinare anche quale sia quello dominante rispetto alle risposte selezionate.

L'ampio range di lavoro tra 100 Hz e 10.000 Hz ha reso evidente un effetto inibitorio predominante della frequenza sulla crescita dovuto appunto all'elevato range investigato.

Infatti, come anche riportato in altri recenti lavori (Cai et al., 2013; Jiang et al., 2012) valori di frequenza fissi superiori a 2000 Hz sembrano far diminuire la capacità di crescita delle microalghe.

Superficie di risposta della biomassa algale ottenuta nella Sperimentazione del Doe (0,1 – 5 kHz)

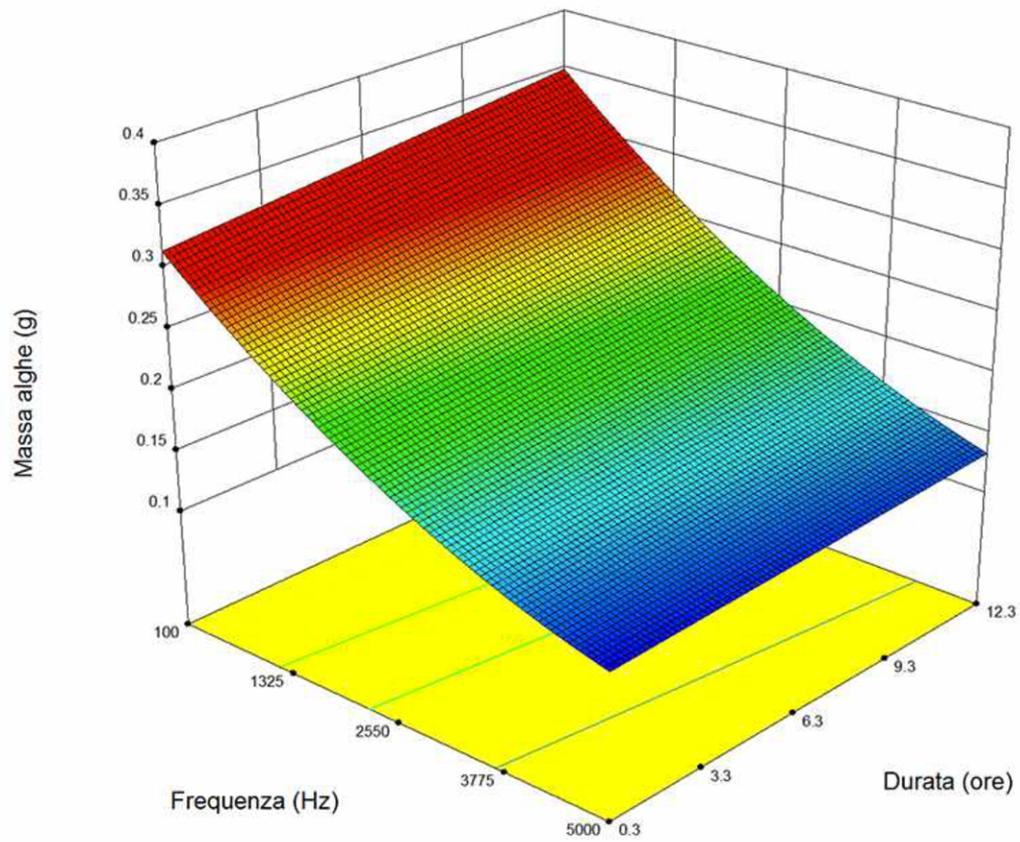


Figura 51: In ascissa è rappresentata la frequenza delle stimolazioni acustiche in funzione del programma giornaliero di stimolazione espresso in ore. In ordinata il valore di biomassa ottenuta rapportata al peso secco in grammi.

Superficie di risposta del rate di crescita (g/giorno) microalgale
ottenuta nella Sperimentazione del Doe (0,1 – 5 kHz)

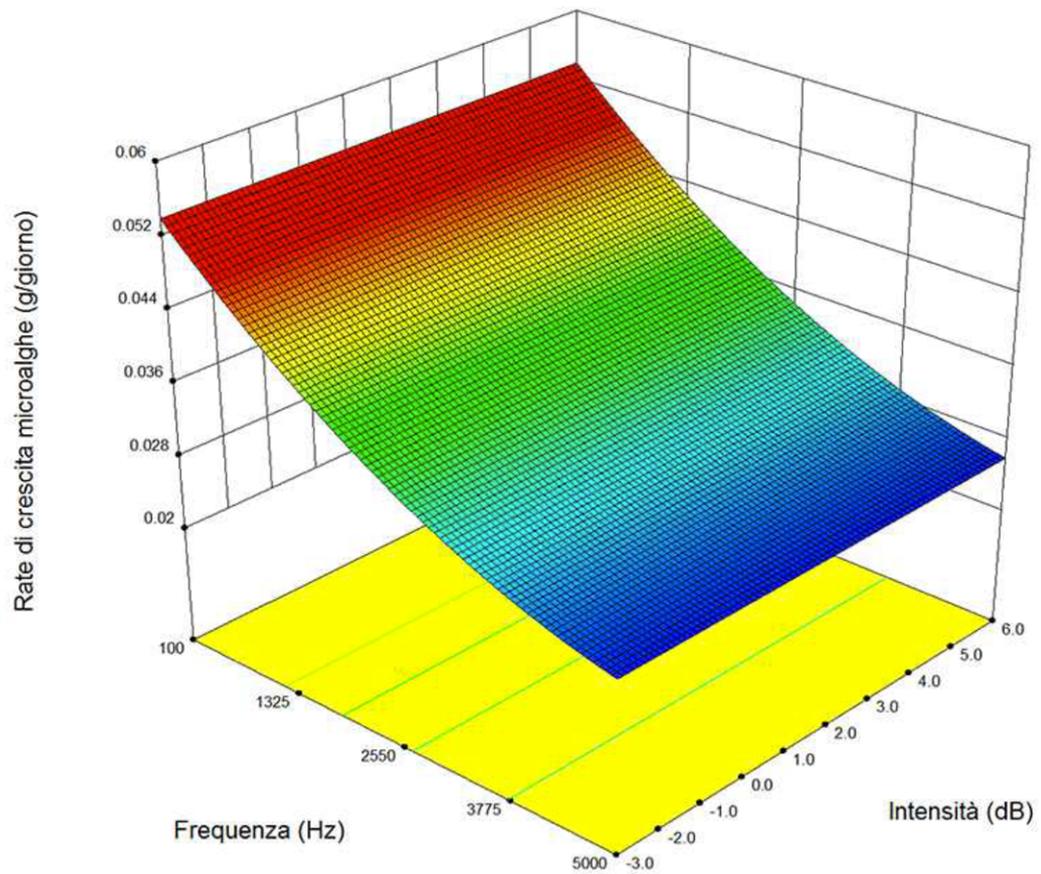


Figura 52: In ascissa è rappresentata la frequenza delle stimolazioni acustiche in funzione del programma giornaliero di stimolazione espresso in ore. In ordinata il valore Rate di crescita di biomassa espressa in (g/giorno).

Superficie di risposta della Desirability (g/giorno) di biomassa microalgale ottenibile negli intervalli di frequenza e durata delle stimolazioni acustiche.

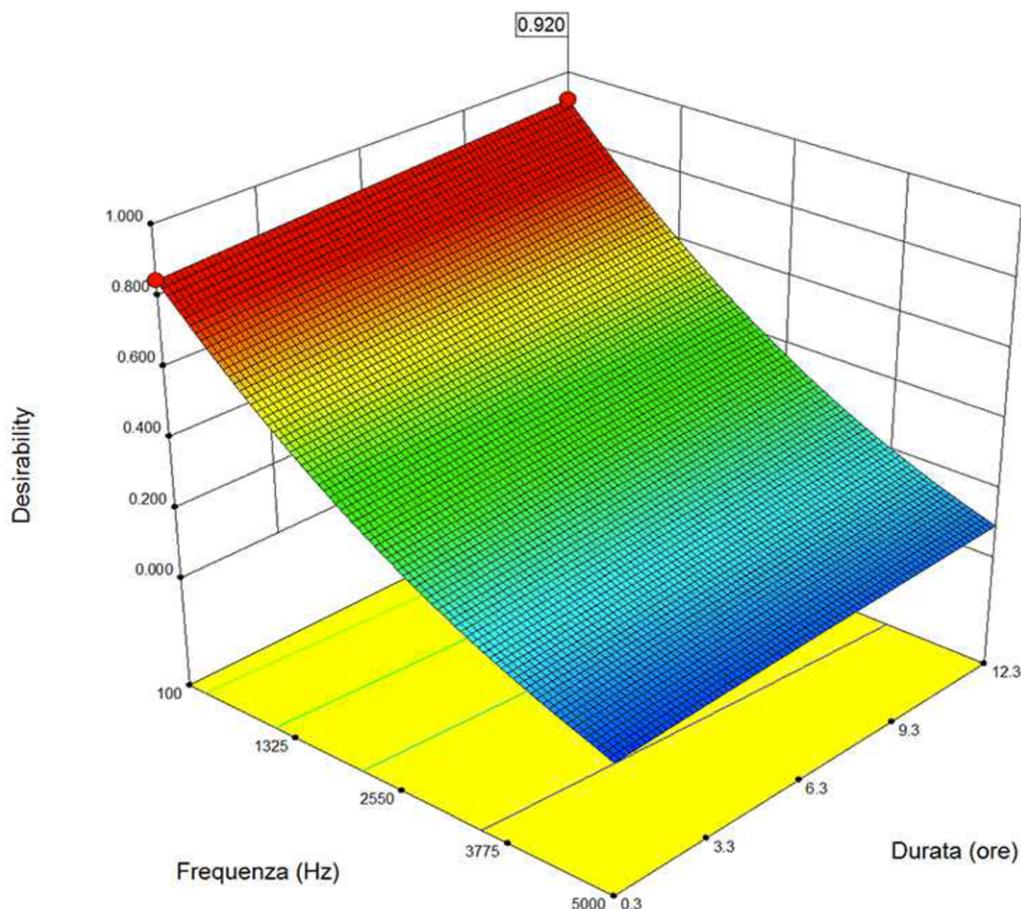


Figura 53: In ascissa è rappresentata la frequenza delle stimolazioni acustiche in funzione del programma giornaliero di stimolazione espresso in ore. In ordinata il valore della desirability ovvero la condizione imposta dei maggiori valori ottenibili di massa e rate di crescita in funzione del tempo.

Ciò che risulta infatti sia dall'analisi delle superfici di risposta delle singole variabili considerate quali la produttività di biomassa e il Rate di crescita giornaliero (Figure 51 e 52) che dalla desirability (la loro combinazione matematica), è una costante diminuzione sia della massa che del rate di crescita in modo quasi lineare all'aumentare della frequenza (Figura 53).

Il massimo di desirability, che corrisponde all'intorno di spazio nel quale le condizioni imposte dall'operatore (massima biomassa e rate) sono soddisfatte contemporaneamente, infatti, è al minimo di frequenza (circa 100 Hz) e massimo di durata.

Tuttavia, come già accennato, il valore di intensità con il quale sono stati riprodotti i suoni nei fotobioreattori, era stato imposto in questo disegno fattoriale con un ampio range di

variabilità (usando parametri relativi -3 e +6 per indicare il minimo e il massimo di intensità) sia il tempo di esposizione sia l'intensità sono risultate meno importanti rispetto all'effetto della frequenza. Ciò ha messo in luce l'esigenza di restringere il campo d'indagine a valori di frequenza compresi tra poche decine e 1000-2000 Hz massimi.

Al contrario, quando lo stimolo è imposto in modo dinamico tramite sweep lineare di frequenza, con un'estensione nella banda di frequenza compresa tra 100 Hz e 6 kHz, il sistema ha risposto in modo più efficiente come riportato in Figura 28 e 29 mostrando un aumento marcato della crescita rispetto ai valori ottenuti alle corrispondenti frequenze fisse.

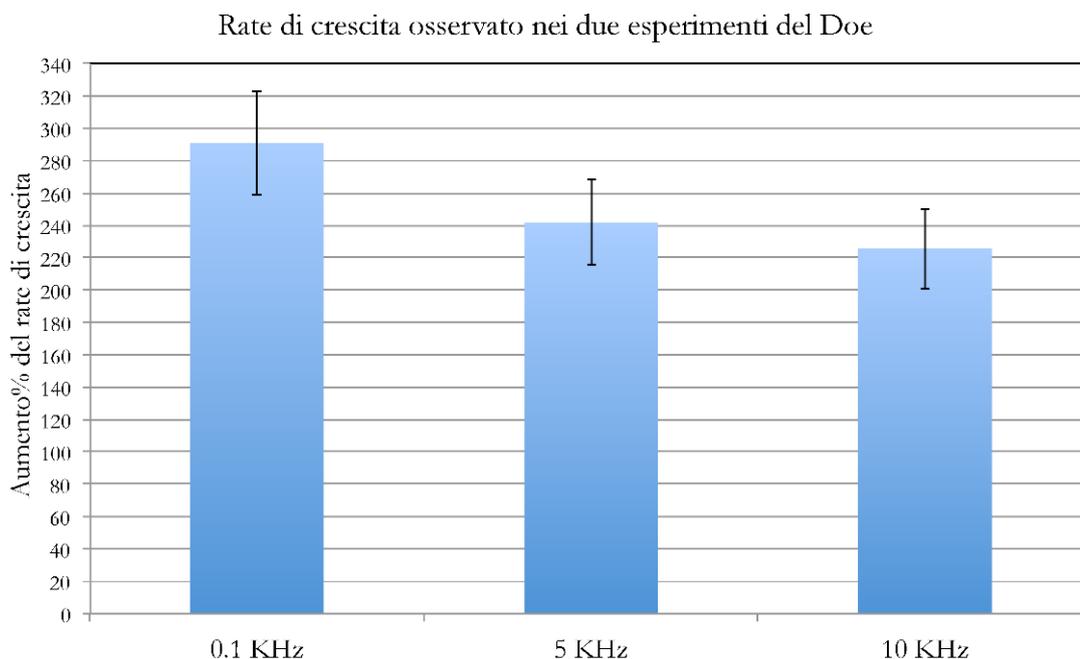
Tale risultato è giustificato dallo studio di analisi modale sulle vibrazioni del vetro prodotte dal trasduttore 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3 che, come già descritto approfonditamente, permette il superamento dei fenomeni dissipativi dovuti ai difetti strutturali del materiale ed alla geometria e dimensione della parete del fotobioreattore.

Infatti, la modalità ciclica (ripetizione ciclica di 10 secondi) di trasmissione del segnale durante lo sweep, che esercita sulle cellule una pressione discontinua modulata, probabilmente è meglio tollerata rispetto ad un'azione continua e costante nel tempo. Ciò permette alle cellule di godere in qualche modo di un effetto benefico di rilassamento che è più efficace nel mantenere l'equilibrio fisiologico delle microalghe.

4.5.2 Individuazione e ottimizzazione dei parametri acustici più efficienti per la crescita delle microalghe. L'aumento % del rate di crescita ottenuto

Dalle due repliche sperimentali del Doe è stata ottenuta conferma sul maggiore incremento del rate di crescita delle popolazioni microalgali stimolate con i suoni di bassa frequenza, i cui valori risultano compresi nel range tra 100 Hz e 1000 – 2000 Hz, come indicato nella superficie tridimensionale di risposta in Figura 52.

In particolare, il rate di crescita della biomassa di Figura 54 subisce un decremento per valori di frequenza che si allontanano dal valore di massima efficienza risultato essere pari a 100 Hz con il migliore aumento % del rate di crescita passando dal valore di 280% ai valori di 240% e 225% in corrispondenza delle frequenze di 5 kHz e 10 kHz, rispettivamente.



l'igura 54: Le basse frequenze di stimolazione acustica da 100 Hz hanno mostrato un incremento percentuale del rate di crescita delle colture microalgali, del 280 %. Questa tendenza diminuisce all'aumentare delle frequenze fino al 225%, in corrispondenza della frequenza pari a 10 kHz.

4.5.2.1 *La conta cellulare nei due esperimenti del Doe con lo Scepter contacellule automatico*

Dalle analisi giornaliere delle concentrazioni di cellule microalgali, è possibile osservare in Figura 55 come in corrispondenza delle stimolazioni acustiche con la frequenza pari a 100 Hz, già dopo 24 – 36 ore dall' avvio dell'esperimento, la coltura acquista un trend positivo di crescita rispetto alle stimolazioni acustiche a frequenze più elevate. La crescita diviene poi esponenziale dal 3° fino al 6° giorno.

Gli effetti riscontrati sulla crescita alle frequenze più elevate fino al 4° giorno non restituiscono informazioni di incremento sulla crescita che sembra livellarsi dal 2° al 4° giorno.

Lo sweep, impiegato in questa sperimentazione con un'intensità di segnale ridotta di almeno 5 volte (Intensità relativa - 25), non ha mostrato il sensibile aumento che aveva incrementato il rate percentuale della crescita delle colture del 320% nell'esperimento pilota condotto in triplicato (vedi Figura 28 e 29).

Questo risultato è la conferma dell'importante ruolo giocato dalla intensità delle onde acustiche che prima di essere trasmesse alla coltura microalgale devono superare una serie di barriere energetiche dovute al trasferimento delle vibrazioni nella catena elettromeccanica trasduttore – vetro. Un'intensità elevata del segnale acustico consente di superare le perdite energetiche dovute agli attriti che condizionano il rendimento dell'intero sistema.

Le misure di bioacustica con l'idrofono in immersione nei fbr hanno rilevato la non linearità del valore di intensità relativa che è gestita dalla scheda audio a monte del sistema e che per i prossimi esperimenti necessita di una calibrazione che possa consentire agli operatori di impostare sul software direttamente il valore della pressione acustica in acqua.

In queste attività sperimentali, il valore di intensità è stato determinato dalle elaborazioni delle registrazioni dei segnali ottenute con l'idrofono nel corso degli esperimenti.

Infatti, a proposito del fbr 5 (sweep di frequenza compresa nell'intervallo 0,1 – 6 kHz) del secondo esperimento del Doe , è stato impiegato il valore di intensità relativa ridotto ad 1/5 (-25), al fine di non interferire con i fbr vicini dato il notevole rumore generato nella fase di spunto di ciascuna ripetizione ciclica del segnale di 10 secondi. Questo valore di intensità relativo è risultato essere troppo basso poiché gran parte dell'energia acustica è stata assorbita dalle strutture del fbr, diffondendo nella coltura una ridotta densità di energia rispetto al precedente esperimento pilota.

Per questo motivo si ritiene che, a intensità più elevate e comunque pari a quelle impiegate nella riproduzione della bassa frequenza (100 Hz), tale programma di stimolazione possa esprimere sulle colture cellulari una migliore efficienza con un più marcato incremento sul rate di crescita.

Un valore di pressione discontinuo e modulato esercitato sulle cellule, probabilmente è meglio tollerato rispetto a un'azione continua e costante nel tempo. Ciò permette alle cellule di godere in qualche modo di un effetto benefico di rilassamento che è più efficace nel mantenere l'equilibrio fisiologico delle microalghe, ma questa ipotesi richiede una ulteriore conferma sperimentale che sarà effettuata nel prossimo futuro.

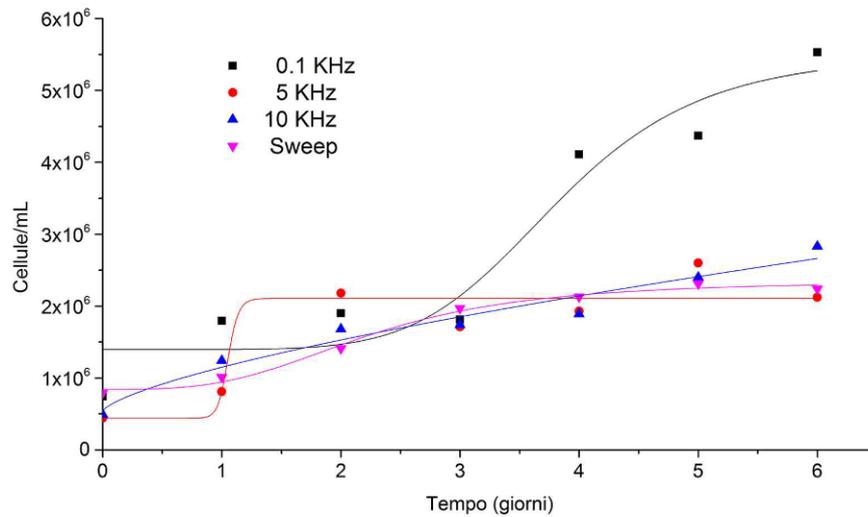


Figura 55: Curve di crescita misurate con lo Scepter contattelle automatico nelle due repliche sperimentali del Doe.

Dalle misure effettuate in triplicato con lo Scepter contattelle nel primo esperimento del Doe è stata misurata la concentrazione di cellule microalgali nel tempo come riportato in Figura 55. Anche in questa rappresentazione grafica di Figura 56, il migliore trend di crescita è stato osservato in corrispondenza del fbr 7 alla frequenza di 100 Hz (vedi Tabella 11).

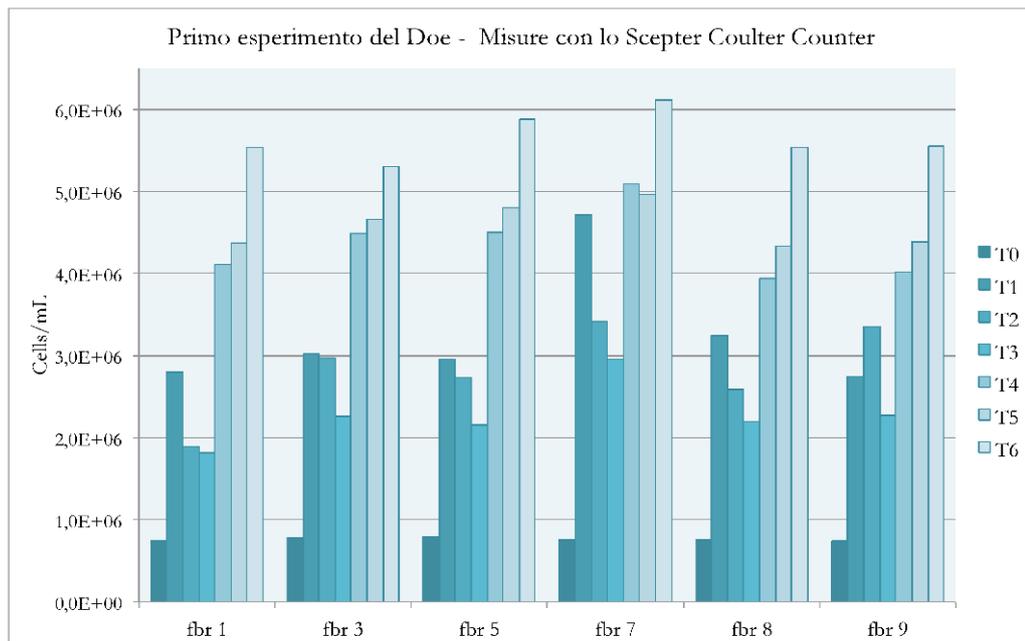


Figura 43: Andamento delle concentrazioni medie nel tempo rilevata nel primo esperimento Doe durante la crescita delle cellule microalgali in ciascun fbr. Le misure di concentrazione sono state effettuate in triplicato. La deviazione standard è generalmente inferiore al 15%.

Dalle misure effettuate in triplicato con lo Scepter contacellule nel secondo esperimento del Doe è stata osservata la concentrazione di cells/mL come riportato in Figura 57. Anche in questa rappresentazione grafica, il migliore trend di crescita è stato osservato in corrispondenza del fbr 6 alla frequenza di 4.950 Hz, ma con un valore di concentrazione di cellule per millilitro pari alla metà del valore ottenuto alle frequenze più basse pari a 100 Hz nel primo esperimento del Doe (vedi tabella 12).

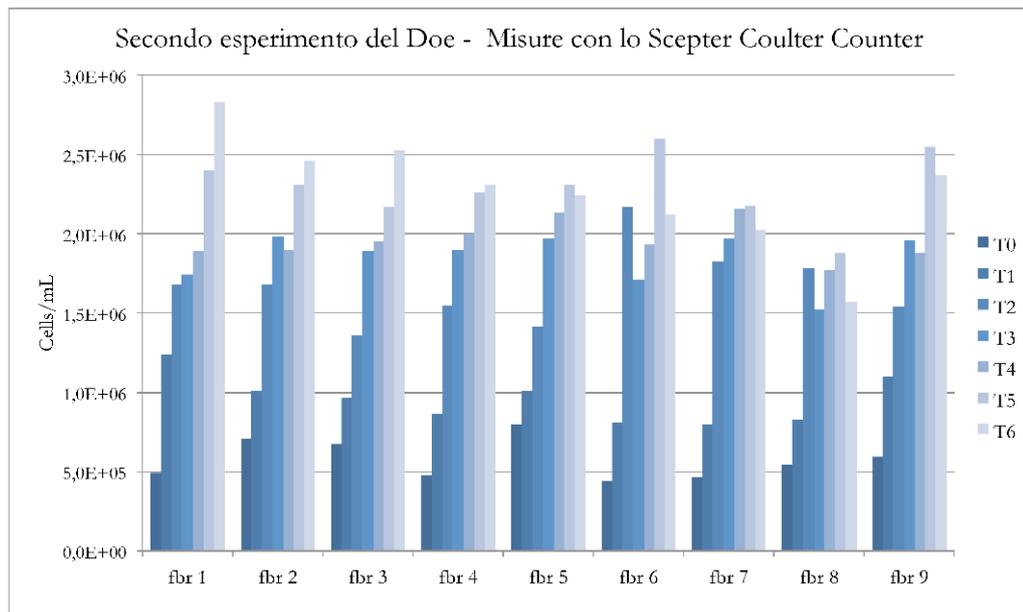


Figura 57: Andamento delle concentrazioni medie nel tempo rilevata nel secondo esperimento Doe durante la crescita delle cellule microalgali in ciascun fbr. Le misure di concentrazione sono state effettuate in triplicato. La deviazione standard è generalmente inferiore al 15%.

4.5.2.2 Le misure del peso secco

Le misure del peso secco, ottenute con i protocolli sperimentali meglio specificati nella sezione materiali e metodi, in buona sostanza hanno descritto le cinetiche di crescita. Queste misure sono state, infatti, utilizzate nella costruzione della superficie di risposta del Doe.

La deviazione standard è sempre risultata inferiore al 15% (vedi Tabella 13) ad eccezione delle prime misure in cui la quantità di biomassa in peso secco era molto bassa per cui la deviazione standard è risultata maggiore.

Riguardo il secondo esperimento del Doe, dove sono state impiegate frequenze di stimolazioni acustiche dai 5 ai 10 kHz, le frazioni di biomassa in peso secco sono risultate essere difficilmente apprezzabili con la bilancia utilizzata (vedi Tabella 14) e per questo motivo i dati risultano maggiormente scatterati, nonostante si osservi un discreto valore di deviazione standard nel triplicato di ciascuna misura effettuata.

Misure del Peso Secco nel primo esperimento del Doe

Peso secco della biomassa Primo Esperimento del Doe -Deviazione standard												
	fbr 1		fbr 3		fbr 5		fbr 7		fbr8		fbr9	
Tempo	Biomassa (g/L)	SD										
0	0,028	0,004	0,021	0,010	0,025	0,006	0,017	0,008	0,021	0,002	0,021	0,006
1	0,081	0,012	0,089	0,012	0,087	0,017	0,080	0,011	0,075	0,008	0,075	0,005
2	0,110	0,011	0,105	0,004	0,110	0,019	0,120	0,014	0,099	0,005	0,100	0,009
3	0,121	0,013	0,135	0,018	0,137	0,016	0,141	0,008	0,135	0,005	0,139	0,006
4	0,172	0,014	0,153	0,008	0,159	0,008	0,181	0,008	0,147	0,020	0,139	0,008
5	0,169	0,008	0,176	0,007	0,181	0,008	0,200	0,007	0,183	0,005	0,179	0,002
8	0,313	0,013	0,317	0,008	0,335	0,005	0,364	0,007	0,316	0,011	0,292	0,008

Taabella 13: Peso secco della biomassa nel primo esperimento del Doe

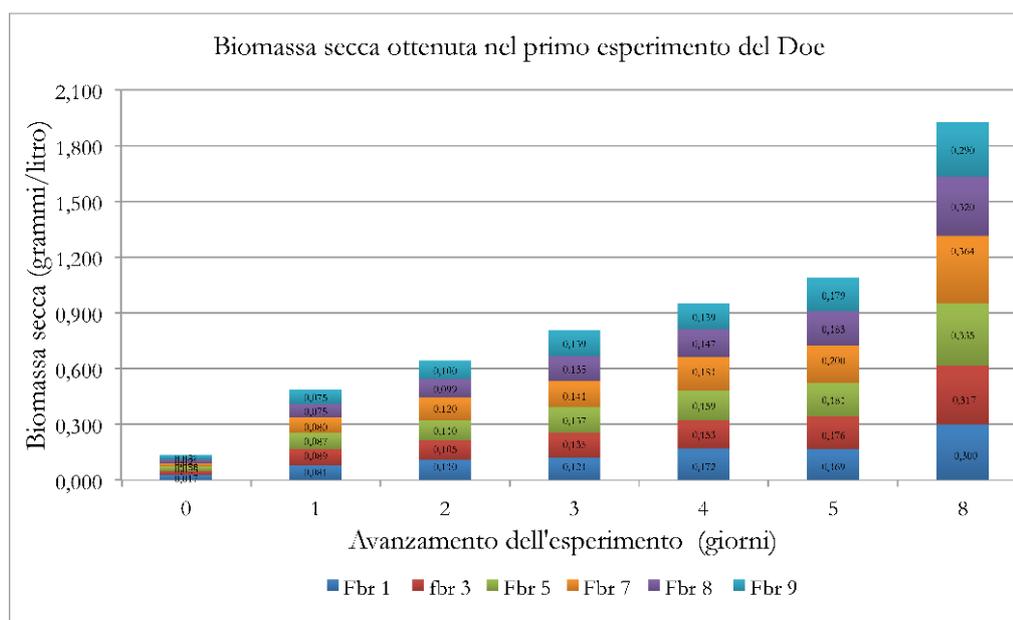
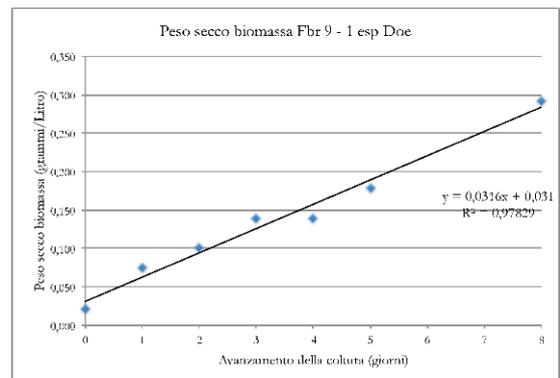
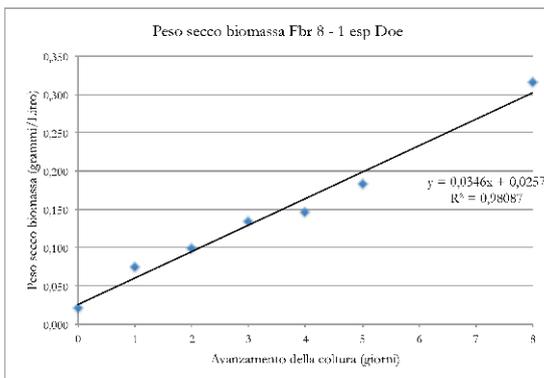
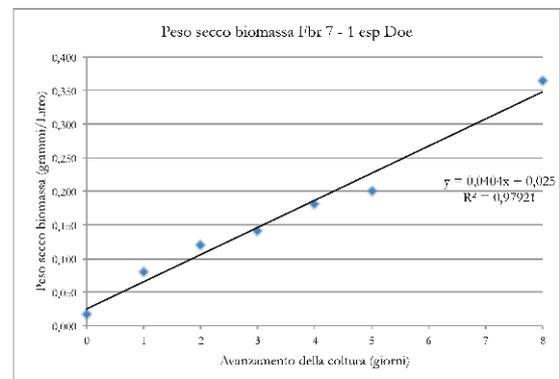
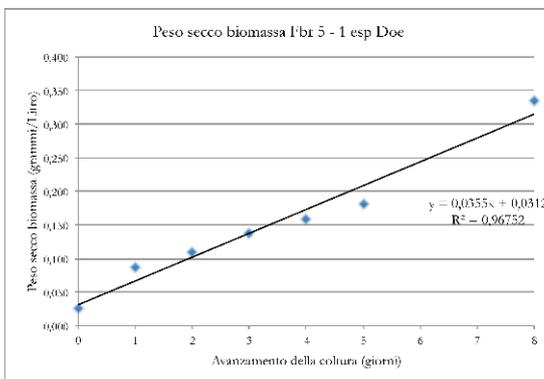
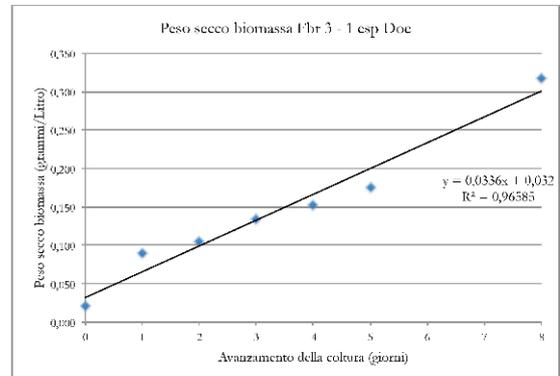
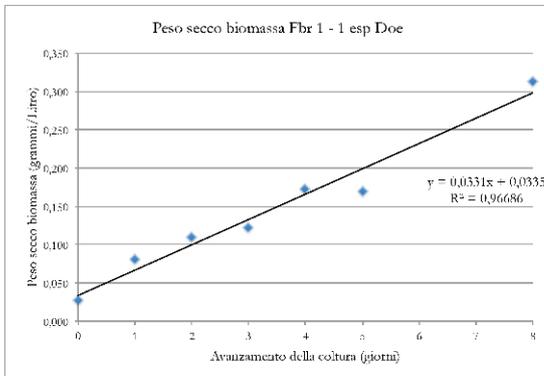


Figura 58: Misura in peso secco della biomassa rapportata a grammi/litro durante l'avanzamento delle colture nel 1 esperimento del Doe.

Rette di regressione e coefficiente di correlazione di Pearson nelle misure di peso secco durante l'avanzamento delle colture nel primo esperimento del Doe



Misure del Peso Secco nel secondo esperimento del Doe

Peso secco della biomassa Secondo Esperimento del Doe -Deviazione standard																		
	fbr 1		fbr 2		fbr 3		fbr 4		fbr 5		fbr 6		fbr 7		fbr 8		fbr 9	
Tempo	Biomassa (g/L)	SD																
0	0,017	0,002	0,015	0,002	0,017	0,002	0,017	0,005	0,020	0,000	0,033	0,009	0,035	0,012	0,035	0,083	0,024	0,014
1	0,043	0,005	0,036	0,000	0,069	0,024	0,067	0,014	0,049	0,006	0,052	0,004	0,059	0,012	0,056	0,223	0,031	0,002
2	0,032	0,004	0,036	0,012	0,029	0,008	0,019	0,008	0,020	0,014	0,033	0,015	0,039	0,016	0,011	0,023	0,028	0,011
3	0,055	0,015	0,014	0,014	0,059	0,006	0,072	0,012	0,068	0,026	0,084	0,011	0,075	0,016	0,081	0,185	0,047	0,028
4	0,084	0,025	0,080	0,014	0,061	0,020	0,079	0,024	0,045	0,032	0,128	0,028	0,108	0,012	0,067	0,167	0,067	0,030
5	0,056	0,004	0,073	0,030	0,087	0,030	0,060	0,021	0,053	0,008	0,109	0,017	0,103	0,009	0,067	0,201	0,065	0,013
8	0,147	0,010	0,143	0,023	0,143	0,018	0,124	0,014	0,113	0,013	0,117	0,032	0,149	0,005	0,121	0,061	0,119	0,021
11	0,144	0,014	0,136	0,014	0,124	0,014	0,095	0,018	0,121	0,016	0,147	0,008	0,156	0,014	0,147	0,061	0,133	0,026

Tabella 14: Peso secco della biomassa nel secondo esperimento del Doe.

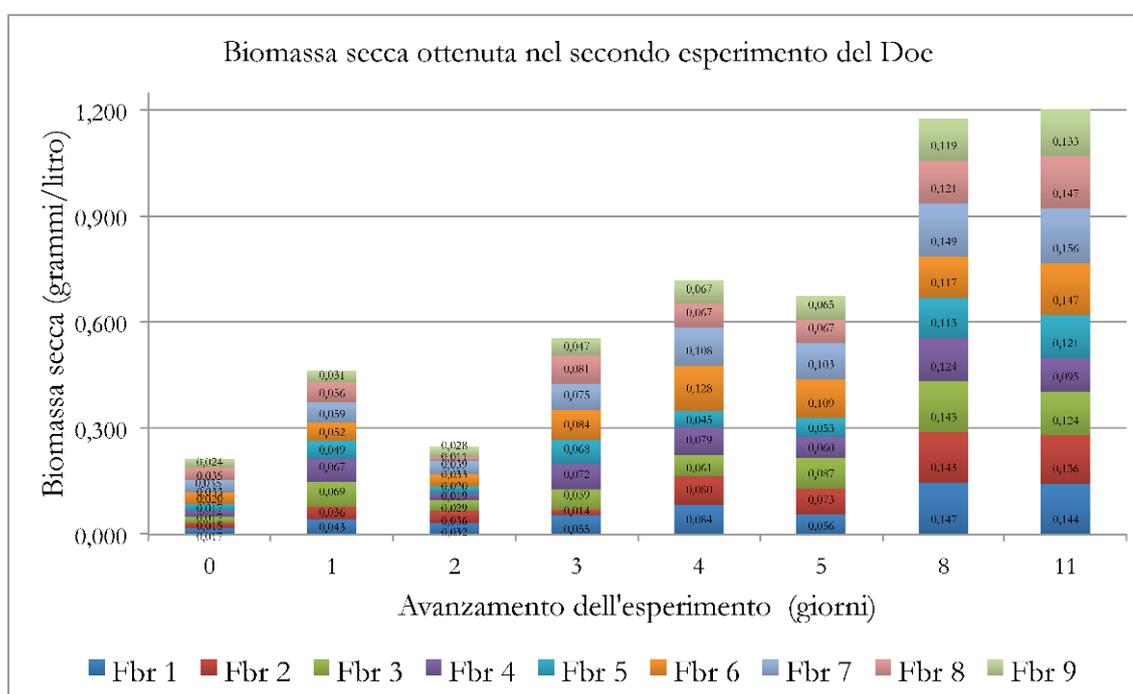
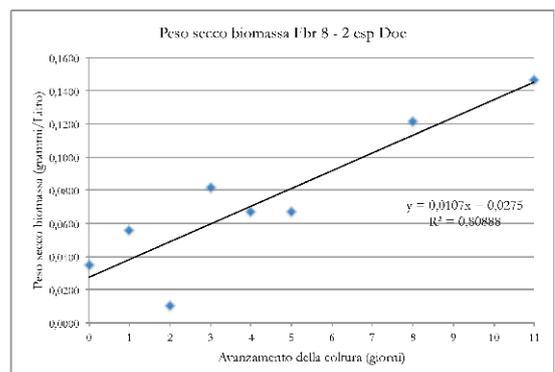
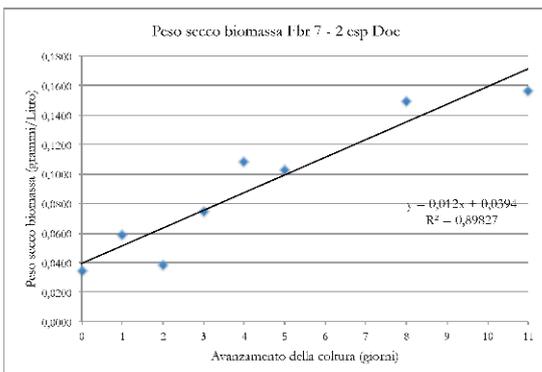
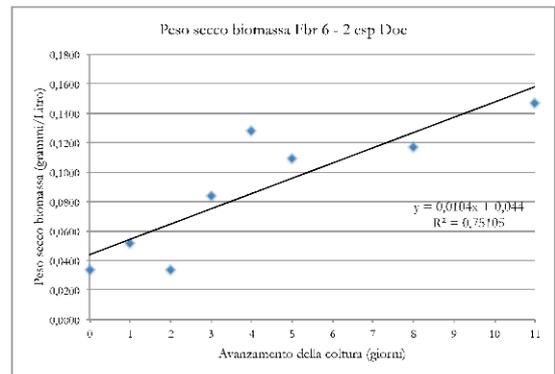
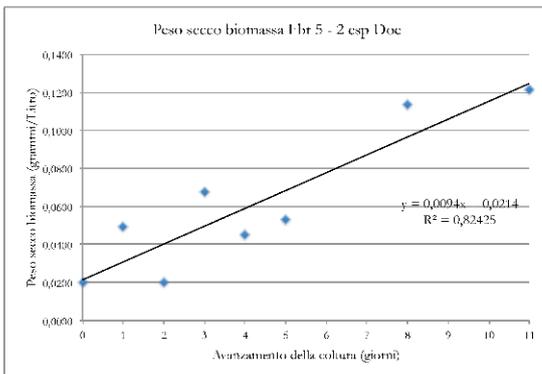
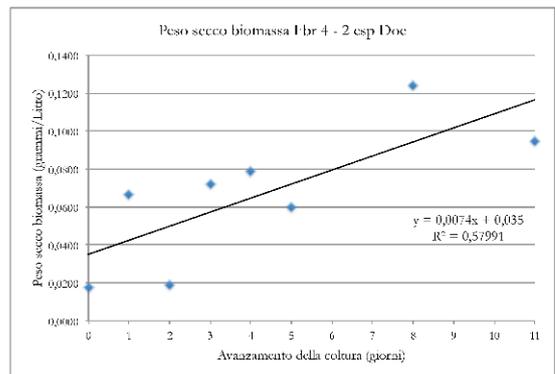
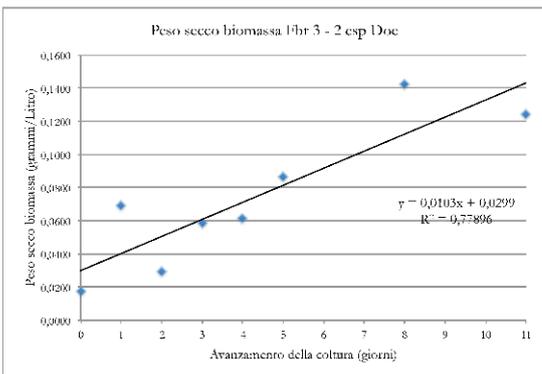
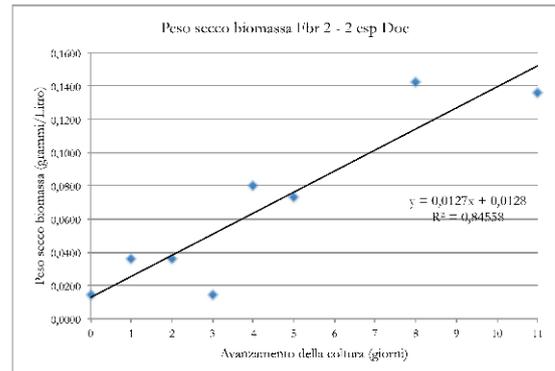
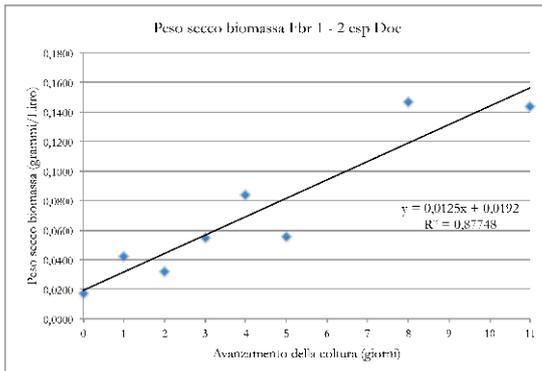
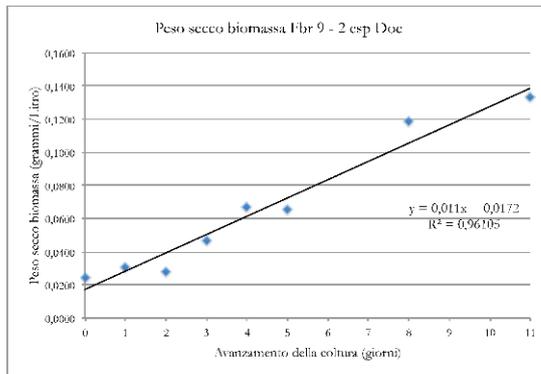


Figura 59: Misura in peso secco della biomassa rapportata a grammi/litro durante l'avanzamento delle colture nel 2 esperimento del Doe.

Retta di regressione e coefficiente di correlazione di Pearson nelle misure di peso secco durante l'avanzamento delle colture nel secondo esperimento del Doe





L'analisi di regressione ha dato coefficiente di correlazione di Pearson più che buono nel primo esperimento del Doe e generalmente buoni nel secondo esperimento a causa della ridotta quantità di biomassa in special modo nei primi giorni di crescita ottenendo così rette di regressione caratterizzate da punti più scatterati e comunque ottenendo discreti coefficienti di correlazione ad eccezione delle misure effettuate nel fbr 4.

4.5.3 Risultati ottenuti dall'impiego di metodologie innovative di analisi e monitoraggio delle colture.

Con i due metodi ottico e acustico di analisi descritti nei successivi paragrafi 4.5.4 e 4.5.5, si è cercato, parallelamente ai metodi convenzionali di conta cellulare impiegati per le misure di crescita microalgali, di rendere sempre più veloce e automatica questa operazione.

Con il metodo ottico di misura di assorbanza è stato possibile monitorare lo stato di avanzamento delle colture, limitando il costo per l'acquisto dei sensori del contacellule automatico Scepter, anche se in ogni caso si è reso necessario elaborare il dato misurato prima di ottenere in forma grafica e numerica l'andamento della crescita delle colture microalgali esaminate.

Con l'introduzione del metodo acustico si è prospettato uno scenario ancora più semplice, rapido e efficiente nel monitoraggio di un numero di colture così elevato, poiché per le misure di concentrazione algale nel tempo sono utilizzati i medesimi attuatori acustici impiegati per le stimolazioni.

Con i dati delle registrazioni acustiche collezionate nei due esperimenti è stato, infatti, possibile verificare il comportamento dei fbr e si è osservata in ciascuno di essi una risposta lineare nei parametri (frequenza e intensità) del campo acustico generato all'interno del fbr. Mantenendo fisso il livello della pressione acustica fornita al sistema e il livello della coltura

microalgale contenuta nel fbr, è stato infatti osservato che durante l'avanzamento dell'esperimento il parametro della pressione acustica misurata dall'idrofono, posizionato in immersione (a circa 10 cm sotto il pelo libero della coltura microalgale), è risultato essere proporzionale alla concentrazione di microalghe, variabile nel tempo.

Per questo motivo, una volta dotato ciascun fbr di un microfono impermeabilizzato in corrispondenza del pelo libero della coltura microalgale sul bordo superiore aperto di ciascun fbr, sarà possibile ottenere in continuo e in modo automatizzato nel tempo la misura del numero di cellule per mL e il rate di crescita delle microalghe in ciascun fbr.

La scheda audio Presonus Fire Studio e il Software Nuendo consentono, infatti, di automatizzare questo metodo di misura che necessita, quindi, solo di una preliminare calibrazione del campo acustico di partenza, essendo in grado di restituire nel tempo in continuo e in modo automatico, anche in assenza dell'operatore, il numero di cellule /mL presenti in ciascuna coltura dei fbr impiegati e quindi il rate di crescita delle cellule microalgali presenti in ciascuno di essi.

Questo ultimo sistema di monitoraggio delle colture microalgali necessita, quindi, solo di alcune misure intermedie di analisi delle colture microalgali come quelle ottenibili con il contacellule automatico Scepter sia per corredare e validare le informazioni ottenute, sia per determinare la distribuzione per classi dimensionali delle cellule presenti nelle colture, funzionalità propria dello strumento di misura Scepter.

In questo modo vengono drasticamente ridotti i costi di esercizio e notevolmente incrementate la rapidità e la ripetibilità delle misure mantenendo una buona riproducibilità.

4.5.4 Il monitoraggio Li-Cor nelle due repliche sperimentali del Doe

Con le modalità indicate nella terza sessione del paragrafo 4.3.2, è stato effettuato il monitoraggio dell'avanzamento delle colture per entrambi le repliche sperimentali del disegno fattoriale Doe.

Sono state collezionate misure di assorbanza a due distinte altezze del fbr ripetute giornalmente dopo l'agitazione delle colture e con la medesima sequenza tra le due misure, prima quella superiore e in seguito quella inferiore, in modo che non si verificassero tra le due misure alterazioni dei valori di assorbanza dovuti ad una troppo rapida sedimentazione delle cellule microalgali, fornendo così valori errati non confrontabili delle loro concentrazioni.

Per tenere conto anche di questa informazione, i dati sono stati collezionati distintamente tra loro senza operare alcuna media in modo da poter apprezzare la riproducibilità tra le due distinte osservazioni.

Per una migliore effettuazione delle misure, sul banco sperimentale è stato posto orizzontalmente un binario parallelo ai 9 fbr in cui è stato fatto scorrere un carrello munito di asta a cui è stato collegato il sensore della sonda Li-Cor, in modo tale da consentire allo strumento di assumere in ciascuna misura esattamente la posizione prestabilita (Figura 60).

Per questo motivo le misure di assorbanza riportate nei grafici sono state collezionate a partire dal giorno 1 di avvio dell'esperimento (dopo 24 ore) e quindi primo punto utile sui grafici $T2 = -\log T2/T1$.



Figura 60: Il particolare della misura con la sonda Li-Cor e il binario su cui scorre il supporto mobile necessario a posizionare il sensore nelle due posizioni Alto – Basso lungo la colonna di ciascun fbr.

Per una maggiore comprensione del dato ottenuto e dei parametri di crescita delle popolazioni cellulari nei diversi programmi di stimolazione, si rinvia la consultazione delle tabelle 11 e 12 relative ai programmi delle stimolazioni acustiche impiegate nei due esperimenti del Doe, e alle figure 55, 56 e 57 della conta cellulare ottenuta con lo Scepter coulter counter e alle misure del peso secco riportate nelle (tabelle 13 e 14 e figure 58 e 59).

I risultati ottenuti con questo metodo innovativo, rapido e non invasivo, confermano un'ottima riproducibilità con una deviazione standard nell'acquisizione delle 3 misure di ogni campionamento su fbr praticamente inesistente.

Questo metodo ottico di analisi si è rivelato quindi particolarmente affidabile e maneggevole per il monitoraggio seriale di un banco sperimentale con 9 – 12 fbr.

Diviene così percorribile la possibilità di dotare ciascuno dei 12 fbr di una coppia di sensori Licor posizionati stabilmente nei due punti (alto e basso) dei fbr, in modo che queste misure possano interagire con il dispositivo di agitazione non solo per regolarne la frequenza nei tempi di intervento, ma l'automazione nell'acquisizione di ciascuna lettura nelle stesse condizioni sperimentali, al termine di ciascun ciclo di agitazione, e in modo sequenziale e istantaneo su tutti e 12 i fbr.

Inoltre, le misure collezionate con i due distinti rilevamenti nelle due posizioni alto e basso lungo la colonna del fbr, saranno impiegate prossimamente per ottimizzare il setup sperimentale della durata dei cicli di agitazione in funzione della concentrazione di cellule, della distribuzione dimensionale e soprattutto dei tempi di sedimentazione delle microalghe nei fbr, procedure che come illustrato nel precedente paragrafo possono essere completamente automatizzate con una semplice procedura software.

Si riporta di seguito l'esito delle misure suddiviso per esperimento e posizione del sensore.

Primo esperimento del Doe (vedi tabella 11) – Posizione sensore Li-Cor Alto

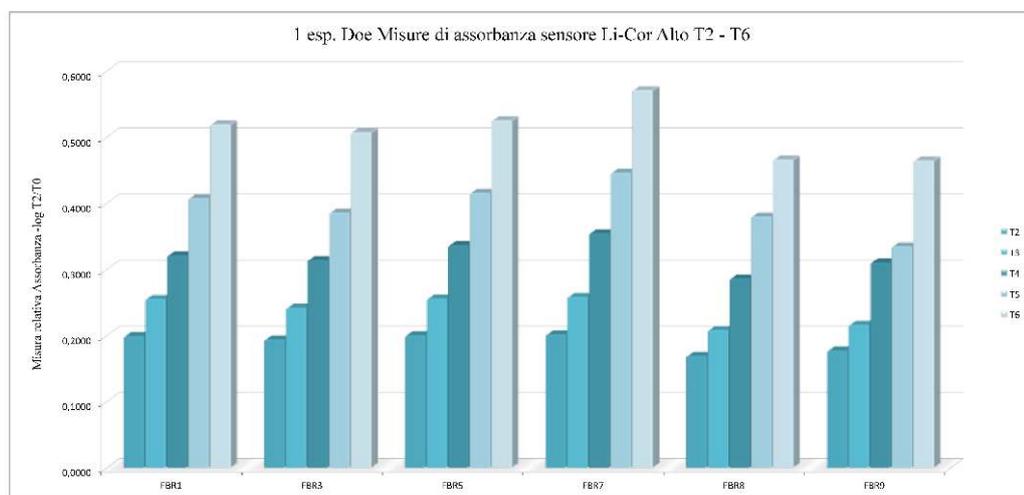
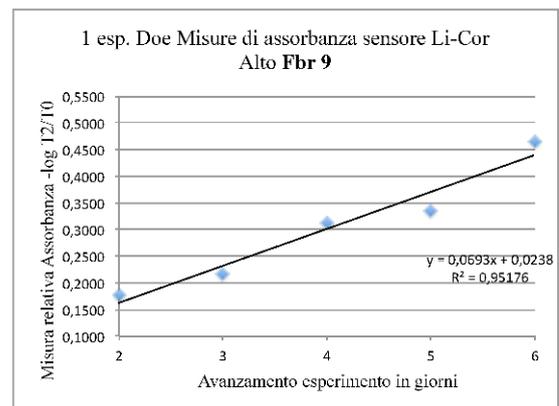
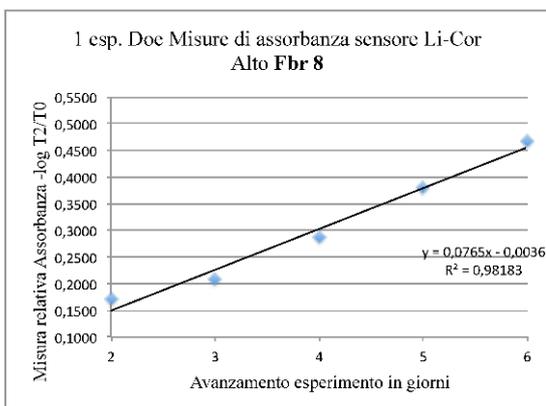
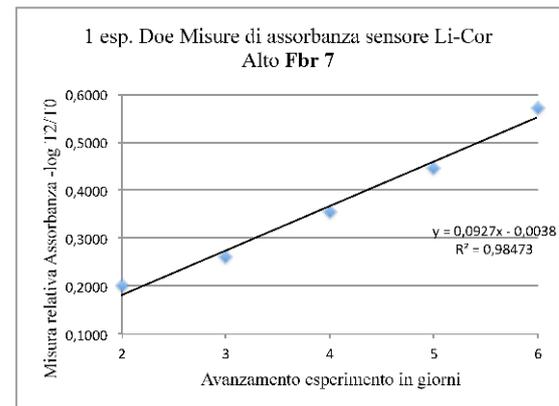
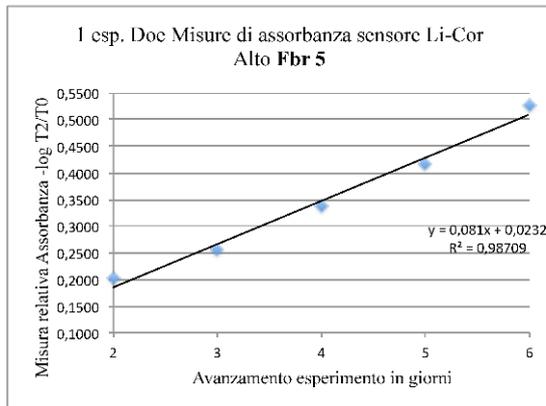
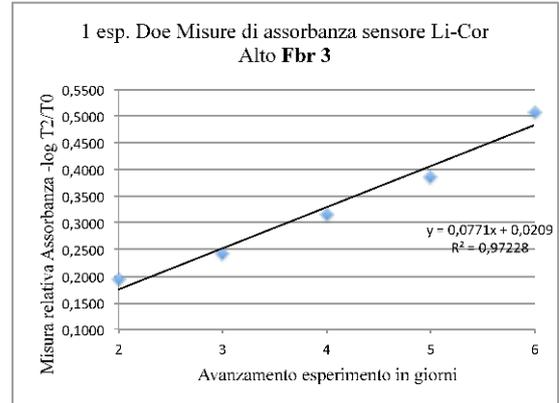
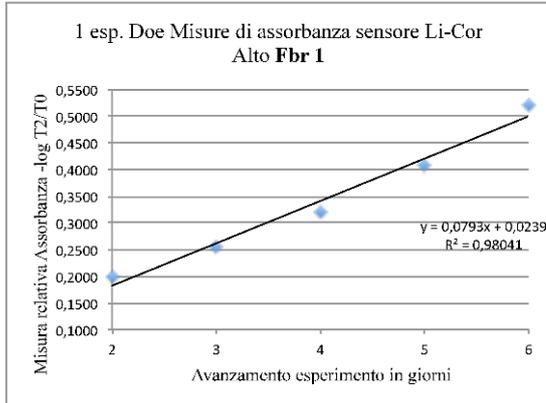


Figura 61: Misure di assorbanza ottenute con la sonda Li-Cor posizionata in alto durante l'avanzamento delle colture da T₂ a T₆ (giorni) nel primo esperimento del Doe.

Retta di regressione e coefficiente di correlazione di Pearson nelle misure Li-Cor

Primo esperimento del Doe – Posizione sensore Li-Cor Alto



L'analisi di regressione ha dato delle rette caratterizzate da punti ben allineati e con ottimi coefficienti di correlazione.

Primo esperimento del Doe (vedi tabella 11) – Posizione sensore Li-Cor Basso

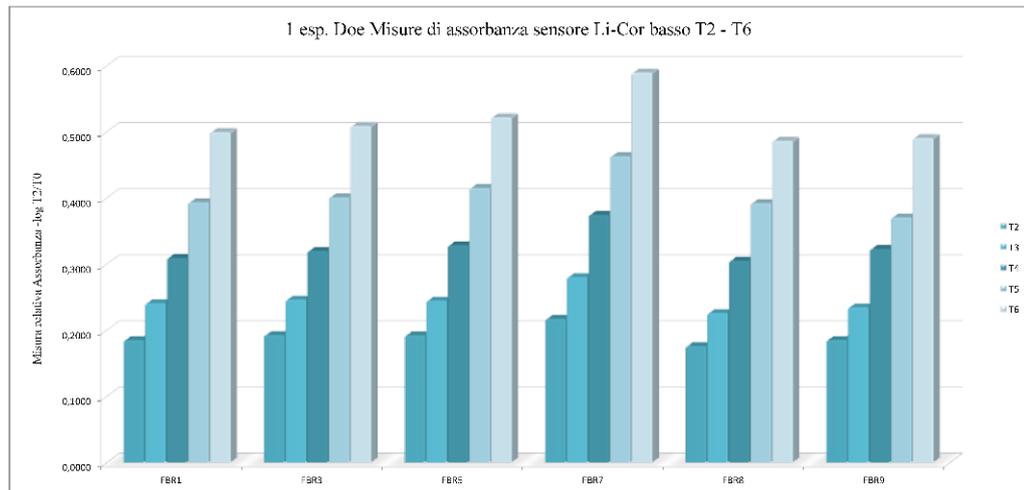
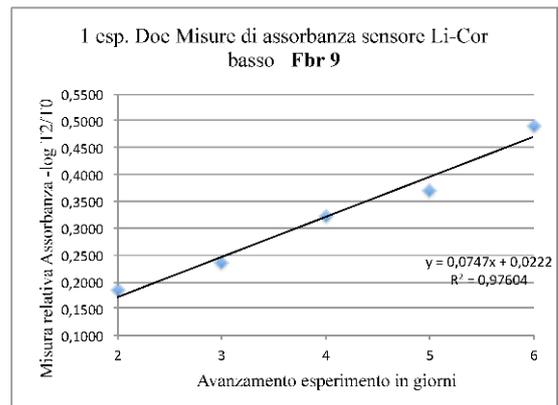
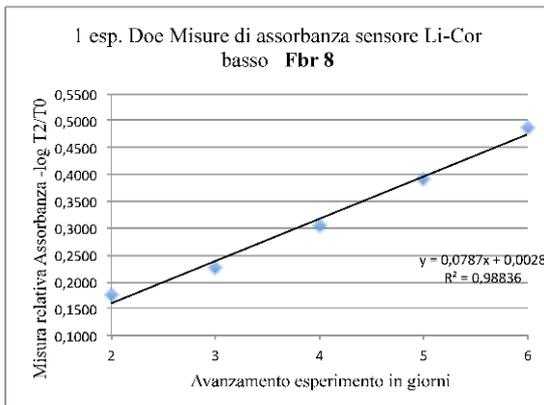
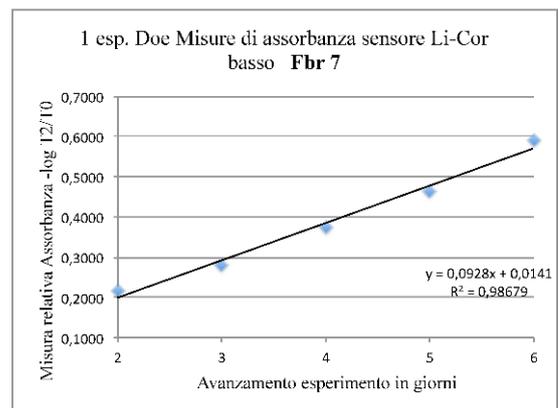
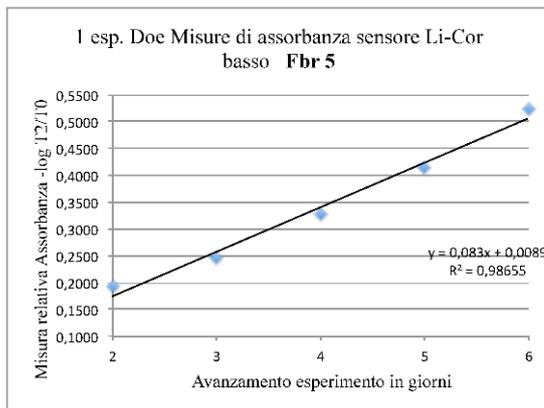
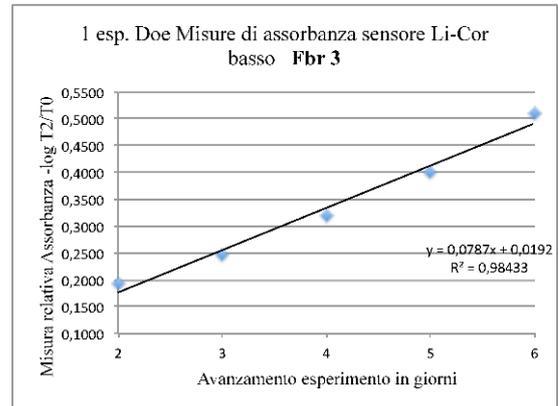
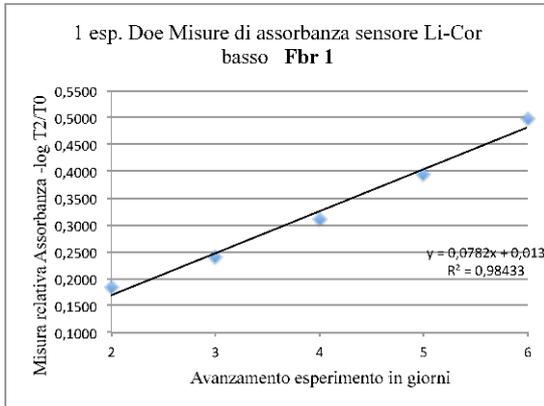


Figura 62: Misure di assorbanza ottenute con la sonda Li-Cor posizionata in basso durante l'avanzamento delle colture da T₂ a T₆ (giorni) nel primo esperimento del Doe.

Rette di regressione e coefficiente di correlazione di Pearson nelle misure Li-Cor

Primo esperimento del Doe – Posizione sensore Li-Cor Basso



Secondo esperimento del Doe (vedi tabella 12) – Posizione sensore Li-Cor Alto

Nei due grafici seguenti, per una migliore comprensione, viene riportata la misura sull'avanzamento delle colture da T1 a T3 e da T4 a T6, che altrimenti sarebbe stata incomprensibile a causa dell'elevato numero di informazioni.

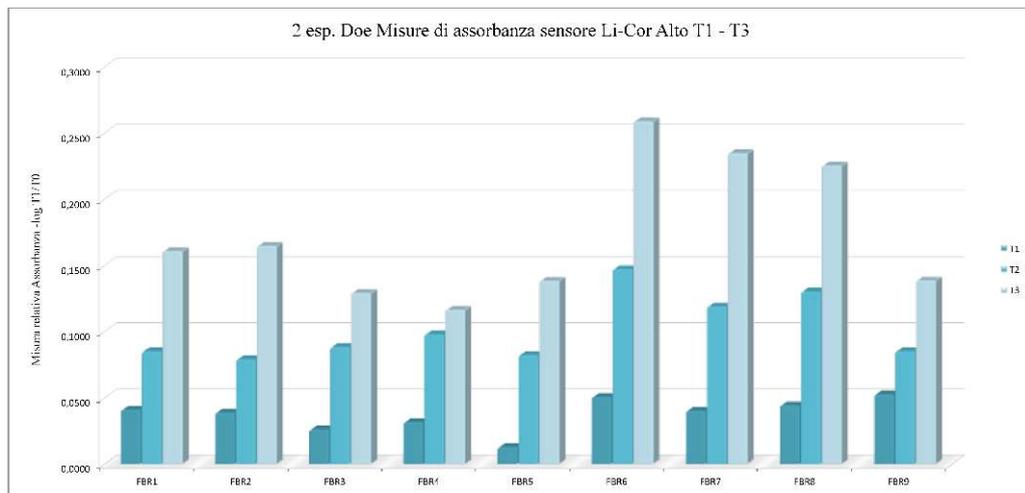


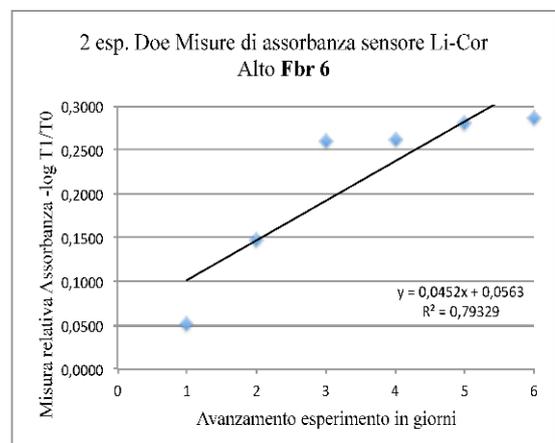
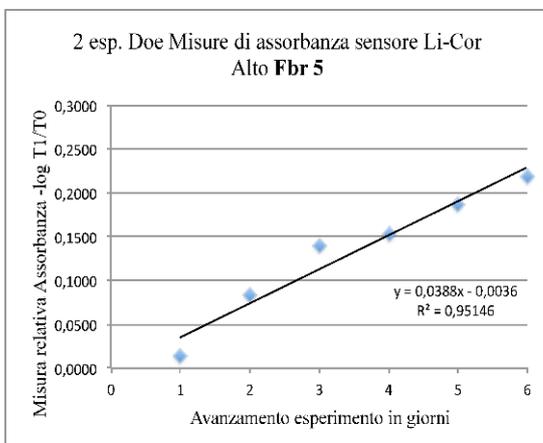
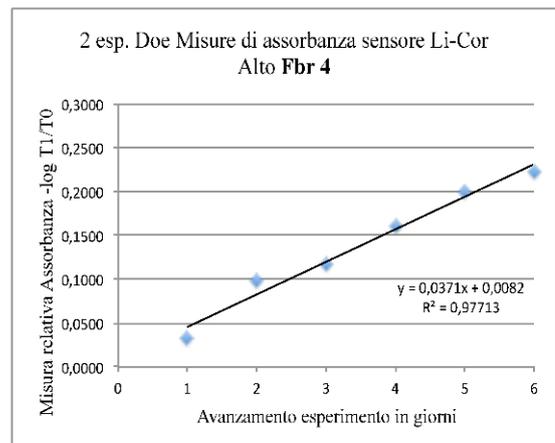
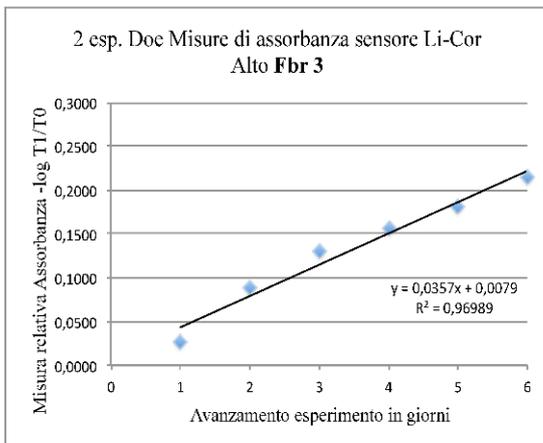
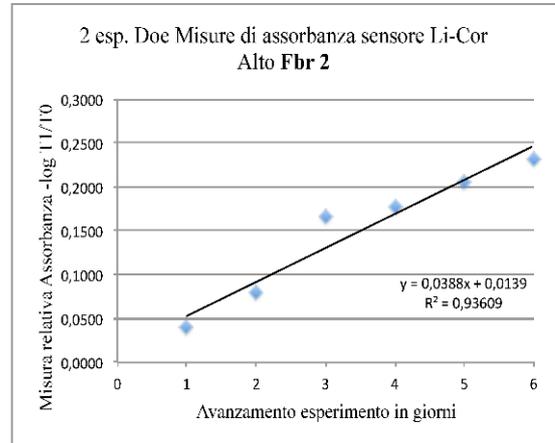
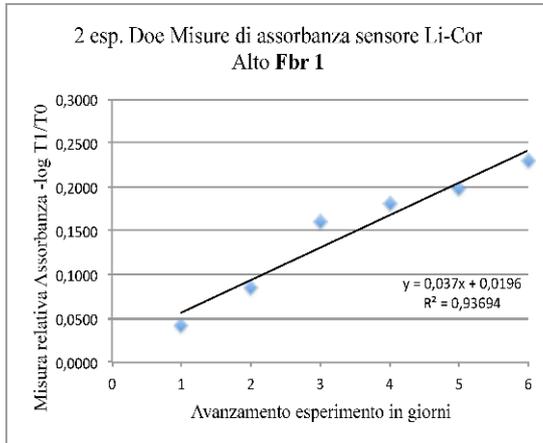
Figura 63: Misure di assorbanza ottenute con la sonda Li-Cor posizionata in alto durante l'avanzamento delle colture da T₁ a T₃ (giorni) nel secondo esperimento del Doe.

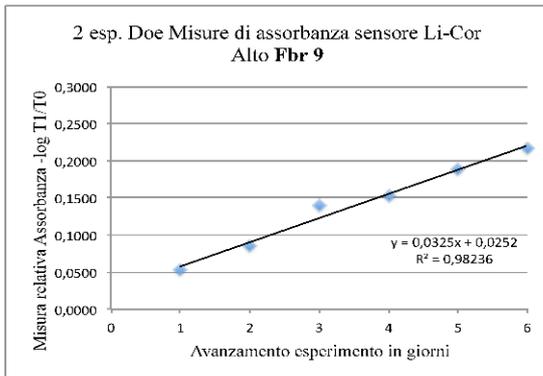
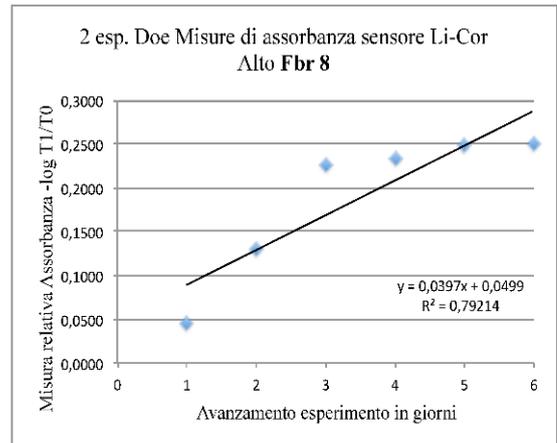
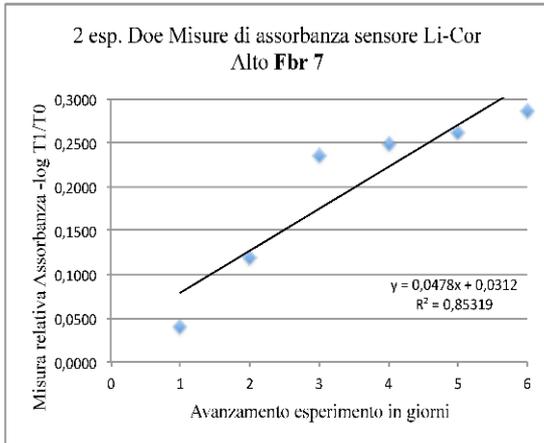


Figura 64: Misure di assorbanza ottenute con la sonda Li-Cor posizionata in alto durante l'avanzamento delle colture da T₄ a T₆ (giorni) nel secondo esperimento del Doe.

Retta di regressione e coefficiente di correlazione di Pearson nelle misure Li-Cor

Secondo esperimento del Doe – Posizione sensore Li-Cor Alto





Secondo esperimento del Doe (vedi tabella 12) – Posizione sensore Li-Cor Basso

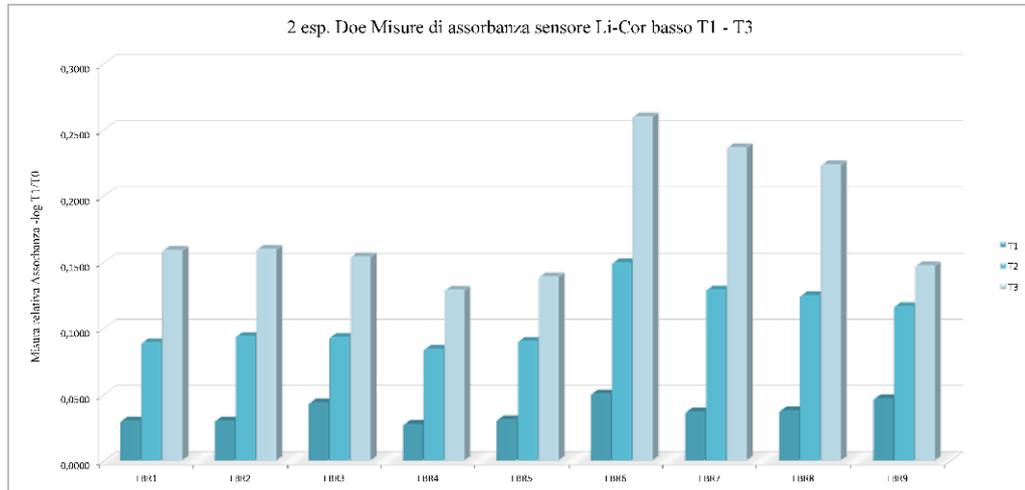


Figura 65: Misure di assorbanza ottenute con la sonda Li-Cor posizionata in basso durante l'avanzamento delle colture da T₁ a T₃ (giorni) nel secondo esperimento del Doe.

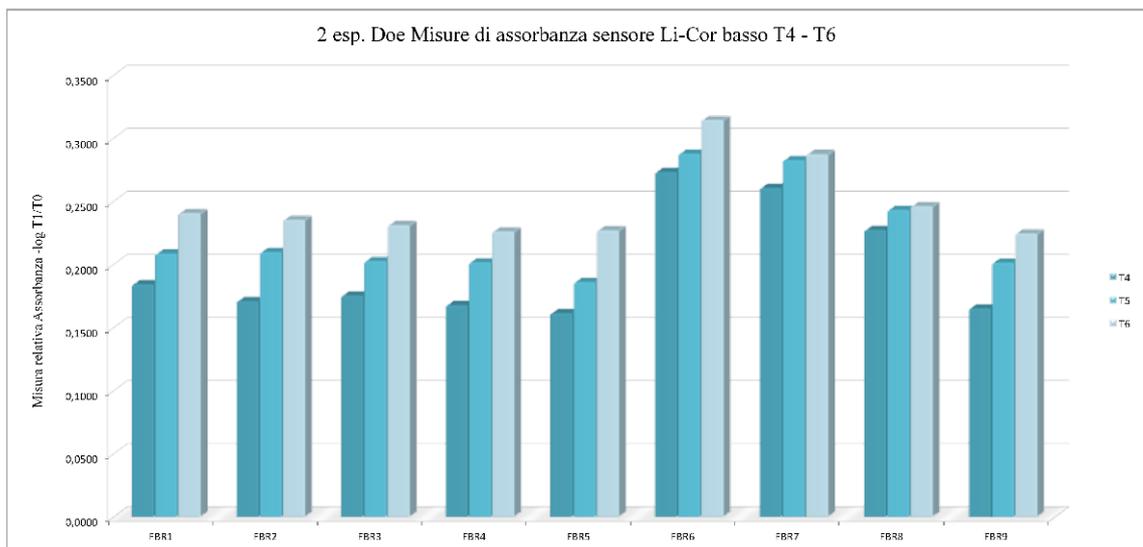
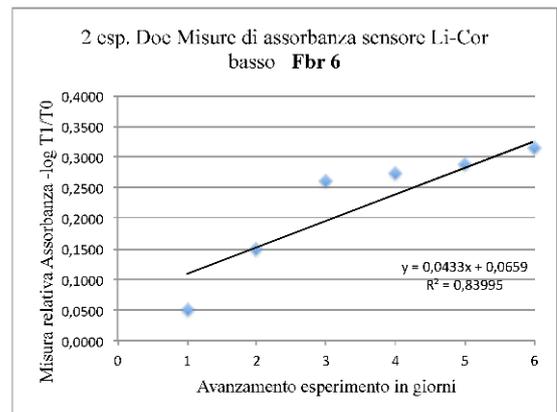
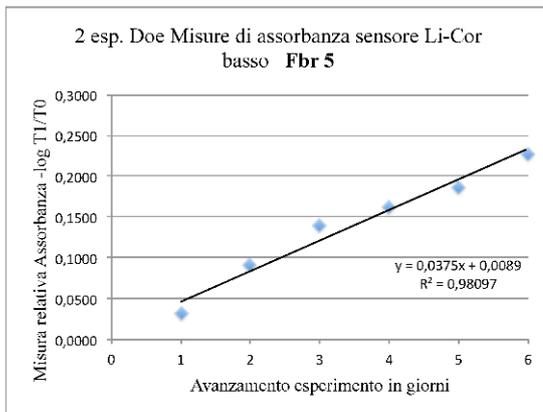
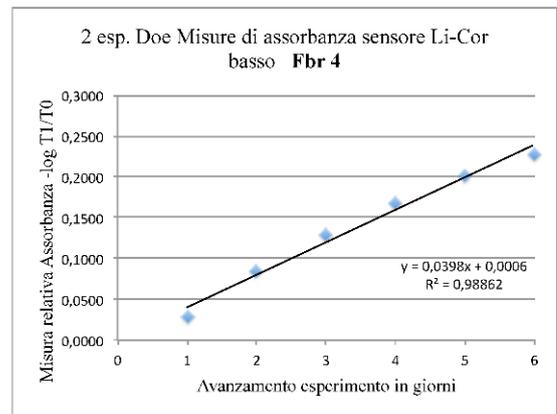
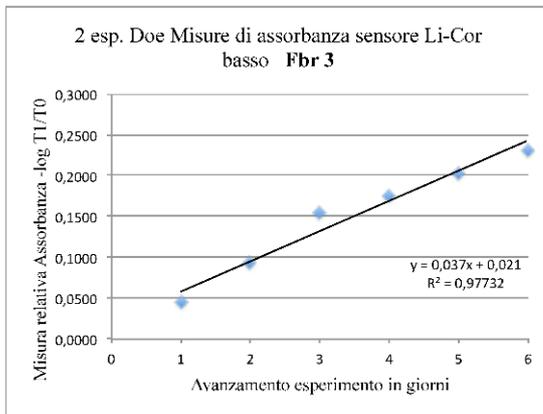
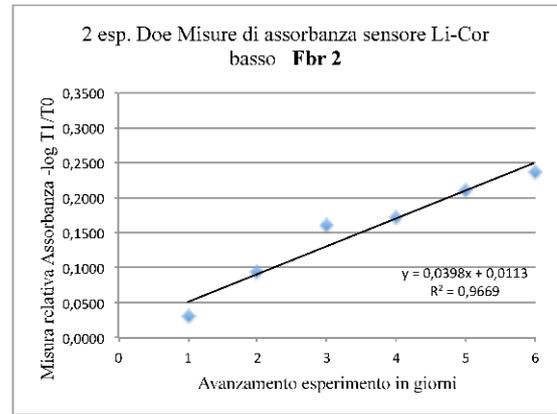
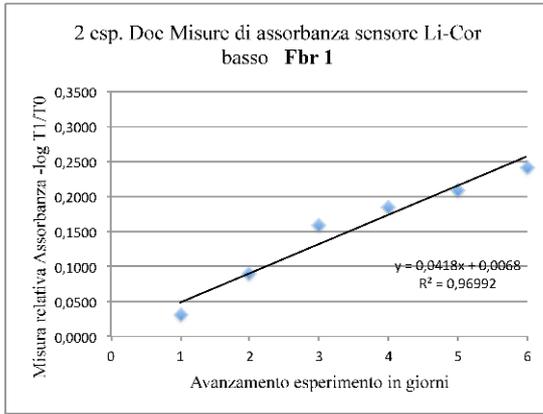
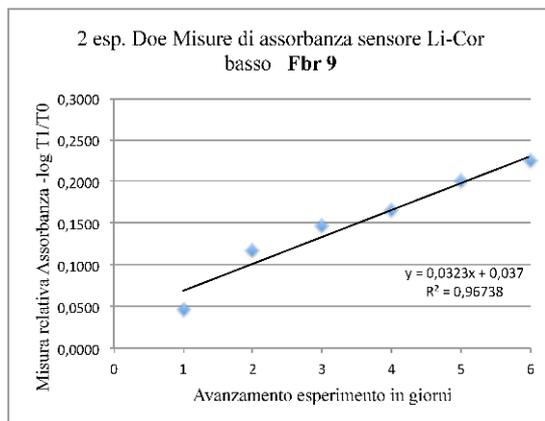
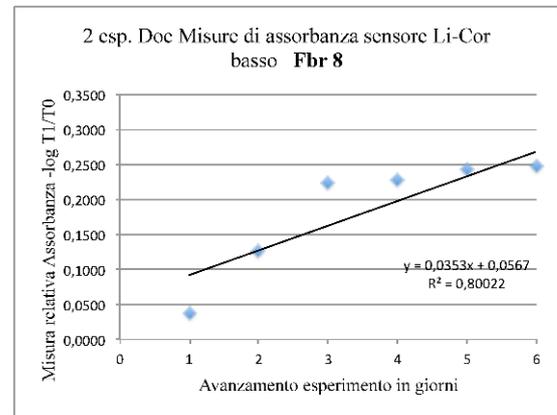
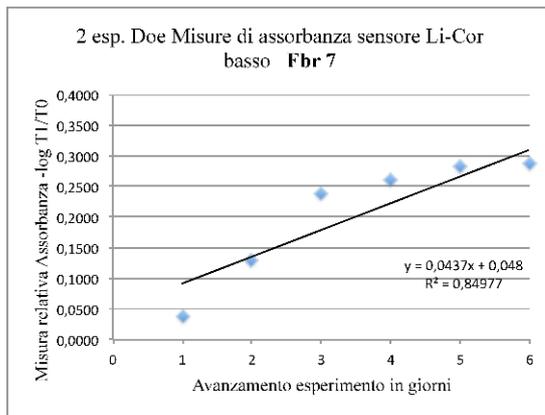


Figura 66: Misure di assorbanza ottenute con la sonda Li-Cor posizionata in basso durante l'avanzamento delle colture da T₄ a T₆ (giorni) nel secondo esperimento del Doe





I risultati ottenuti nei due esperimenti generalmente confermano la validità sperimentale delle osservazioni effettuate che hanno descritto fedelmente i valori di assorbanza nel tempo durante tutto il periodo di crescita microalgale.

Nella crescita osservata con il ceppo microalgale in esame, con i valori di concentrazione di partenza degli esperimenti e di termine nei 7 gg. questo metodo di misura ha mostrato la sua piena riproducibilità.

In conclusione, anche in queste misure di assorbanza è stato possibile individuare il diverso comportamento di risposta delle colture microalgali nei diversi programmi di stimolazione acustica a cui le stesse sono state sottoposte nei due esperimenti del disegno fattoriale.

4.5.5 Le registrazioni acustiche e i risultati ottenuti

Con l'idrofono preamplificato, paragrafo 3.7.3, sono state effettuate le registrazioni di bioacustica nei 9 fbr stimolati acusticamente nei diversi momenti della crescita delle colture microalgali, a partire dal terreno di coltura, terreno di colture più le microalghe al tempo zero e dopo tre e dieci giorni.



Figura 67: Particolare del posizionamento dell'idrofono nelle misure di bioacustica nei 9 fbr

Le registrazioni acustiche acquisite con la frequenza di campionamento di 44100 campioni al secondo, sono state rielaborate per la correzione in acqua con il software Spectra Plus presso il Dipartimento di Ingegneria del Ciriad dell'Università di Perugia con l'Ing. Francesco d'Alessandro (vedi Figura 68).

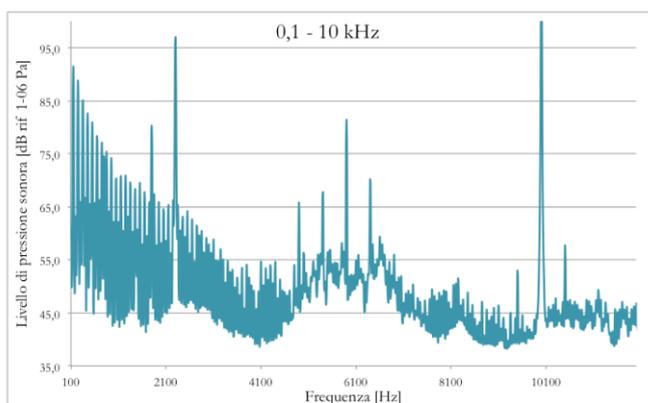


Figura 68: Elaborazione digitale FFT con il software Spectra Plus della traccia audio registrata nel fbr 1.

Dalle elaborazioni dei segnali per le misure effettuate nel Fbr 1 nel secondo esperimento del Doe, sono stati ottenuti i dati riportati in tabella 2, correggendo il valore della trasmissione del suono per le misure in acqua con la formula: $20 \times \log_{10}$ del valore della pressione in aria espressa in Pascal rapportata a 10^{-6} . Tale valore viene ottenuto dal prodotto tra $10^{-5} \times 10^{Lp}$

aria/20

fbr 1									
terreno coltura		T0			T3			T10	
freq	Lp (dB rif aria)	Lp (dB rif acqua)	Lp (dB rif aria)	Lp (dB rif acqua)	Lp (dB rif aria)	Lp (dB rif acqua)	Lp (dB rif aria)	Lp (dB rif acqua)	
10	34,4	60,5	29,0	55,0	27,8	53,8	38,8	64,8	
12,5	35,6	61,7	30,2	56,2	29,0	55,0	40,0	66,0	
16	40,0	66,0	37,4	63,4	35,5	61,5	41,7	67,8	
20	42,8	68,8	40,8	66,8	38,9	64,9	43,1	69,1	
25	49,0	75,0	46,3	72,3	45,7	71,7	48,3	74,3	
31,5	56,2	82,2	53,2	79,2	53,1	79,1	55,2	81,2	
40	73,3	99,3	70,3	96,3	70,3	96,3	72,2	98,3	
50	76,2	102,3	73,3	99,3	73,3	99,3	75,2	101,2	
63	72,3	98,3	69,4	95,4	69,3	95,4	71,3	97,3	
80	45,8	71,9	42,9	69,0	42,9	69,0	44,8	70,9	
100	39,2	65,2	34,4	60,4	35,5	61,5	37,0	63,1	
125	60,0	86,0	55,6	81,6	55,8	81,8	57,9	83,9	
160	69,4	95,4	65,1	91,1	65,3	91,3	67,3	93,3	
200	39,9	65,9	38,3	64,4	39,2	65,2	39,2	65,3	
250	66,6	92,6	63,0	89,1	63,2	89,2	64,8	90,9	
315	62,3	88,3	59,1	85,1	59,0	85,0	60,5	86,6	
400	60,4	86,5	57,4	83,4	57,3	83,3	58,9	84,9	
500	70,5	96,5	57,4	83,4	57,2	83,2	58,6	84,6	
630	55,9	81,9	54,1	80,1	54,0	80,0	55,1	81,1	
800	55,5	81,5	55,0	81,0	54,1	80,2	55,0	81,0	
1000	52,6	78,6	50,7	76,8	50,5	76,5	51,7	77,7	
1250	52,0	78,0	50,1	76,1	50,0	76,0	51,1	77,1	
1600	52,4	78,5	53,6	79,6	54,4	80,4	70,2	96,2	
2000	48,1	74,1	52,6	78,7	53,6	79,6	69,7	95,7	
2500	49,2	75,3	71,7	97,7	68,8	94,8	62,6	88,6	
3150	44,3	70,4	43,1	69,2	42,6	68,6	44,0	70,0	
4000	62,1	88,1	39,4	65,4	40,8	66,9	39,8	65,8	
5000	69,4	95,4	47,0	73,0	48,8	74,8	47,8	73,8	
6300	46,4	72,4	56,3	82,3	64,3	90,3	62,6	88,6	
8000	62,3	88,3	39,5	65,6	40,2	66,2	41,1	67,1	
10000	38,6	64,6	80,4	106,4	81,9	107,9	88,9	114,9	
12500	42,9	68,9	41,0	67,0	39,5	65,5	40,8	66,8	
16000	75,1	101,1	66,5	92,5	51,1	77,1	64,7	90,7	
20000	78,5	104,5	55,1	81,2	53,6	79,7	58,7	84,7	
Livello glob	83,5	109,5	82,5	108,6	83,3	109,4	89,4	115,5	

Tabella 15: Valori FFT della pressione acustica in acqua ottenuti dalle registrazioni con idrofono, elaborate con il Software Spectra Plus.

I valori della pressione acustica elaborati con il Software Spectra Plus sono stati ricorretti in acqua (rif. 10^{-6}) dB e sono stati rappresentati graficamente nella Figura 69.

Sono state elaborate tutte le tracce audio registrate in entrambi gli esperimenti del Doe al fine di rilevare il valore medio dell'intensità dei segnali acustici in acqua.

I valori ottenuti nei tre diversi momenti osservati durante l'avanzamento delle colture ha dato il seguente esito in valore medio:

1. Al valore di Intensità relativa -3 è stato riprodotto nelle colture un suono pari a 44 ± 2 dB re mPa;
2. Al valore di Intensità relativa +1,5 è stato riprodotto nelle colture un suono pari a 48 ± 2 dB re mPa;
3. Al valore di Intensità relativa +6 è stato riprodotto nelle colture un suono pari a 65 ± 2 dB re mPa;
4. Al valore di Intensità relativa -25 è stato riprodotto nelle colture un suono pari a 32 ± 2 dB re mPa.

Nello spettrogramma di Figura 69, si può osservare il comportamento delle onde acustiche registrate sempre nel fbr 1 durante l'avanzamento dell'esperimento a partire dal T_0 e dopo 3 e 10 giorni. Ad una crescita delle concentrazioni di cellule per mL nella coltura microalgale, generalmente si osserva una riduzione dell'intensità del segnale rilevato al T_{10} e ancora prima al T_3 , ad eccezione di alcune frequenze caratteristiche per le quali è stato osservato un fenomeno opposto.

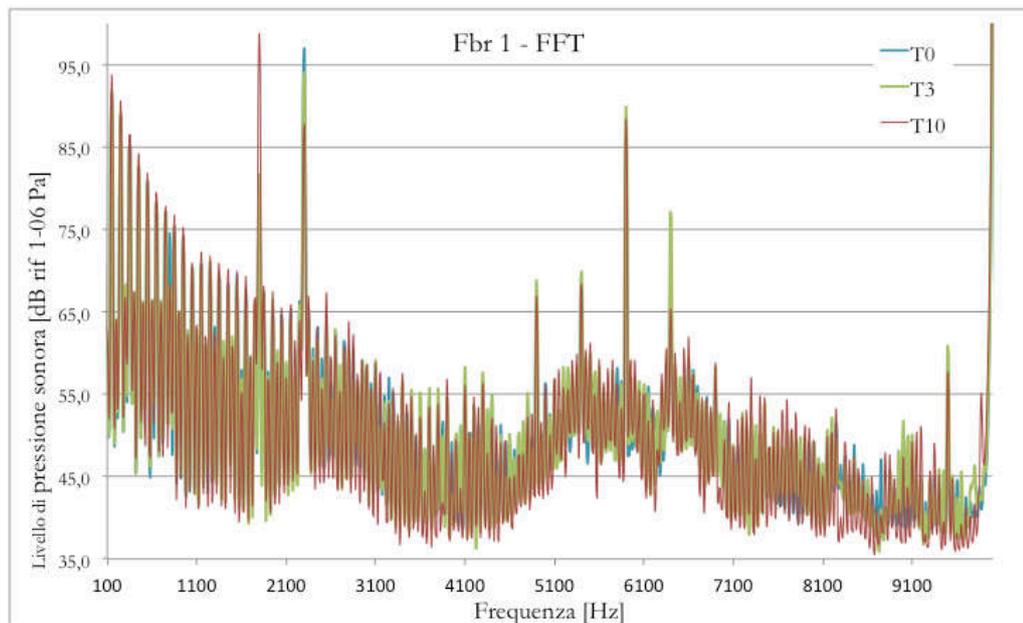


Figura 69: Misure dei livelli di pressione sonora rilevata con l'idrofono nel fbr 1 (0,1 – 10 kHz) al tempo zero (T_0), dopo tre e dieci giorni.

Nelle Figure 70, 71 e 72 sono stati selezionati intervalli nel range di frequenza 0,1 – 10 kHz dove si osserva l'alternanza dei due fenomeni cui sembrerebbe che, il campo acustico sistema alghe-fbr, all'aumento della concentrazione delle particelle per mL risponderebbe con una amplificazione del suono solo a determinate frequenze, con un effetto indiretto (di inerzia) dovuto alle frequenze di risonanza del vetro e antirisonanza prodotto dalla massa di acqua più alghe come si è visto nell'analisi modale di cui al paragrafo 4.1.1.

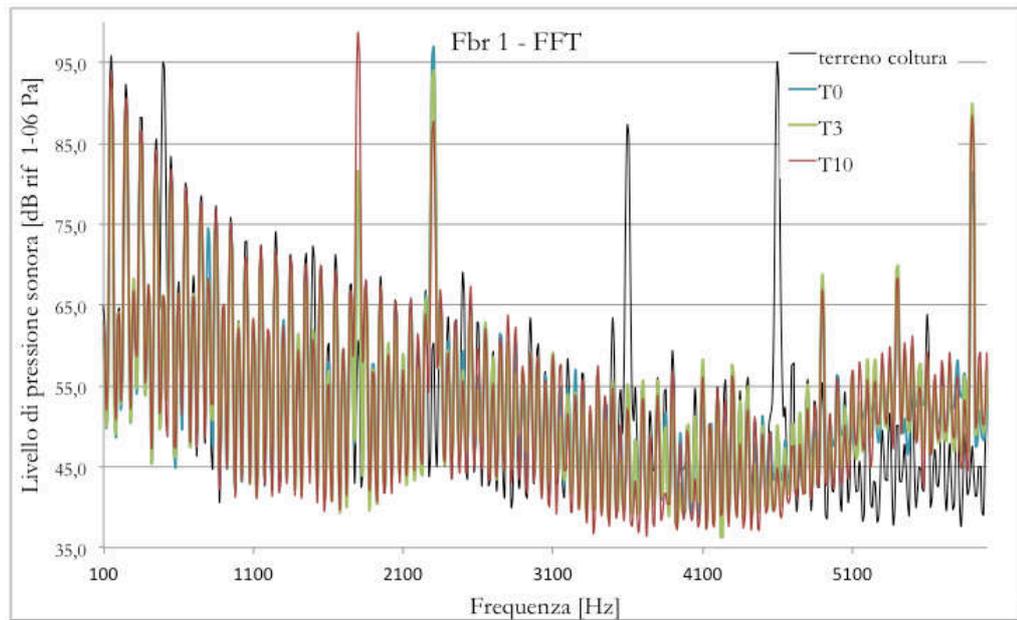


Figura 70: Misure dei livelli di pressione sonora rilevata con l'idrofono nel fbr 1 (0,1 – 10 kHz) solo con il terreno di coltura (senza l'inoculo microalgale), al tempo zero (T0), dopo tre e dieci giorni. Finestra da 0,1 a 6 kHz circa.

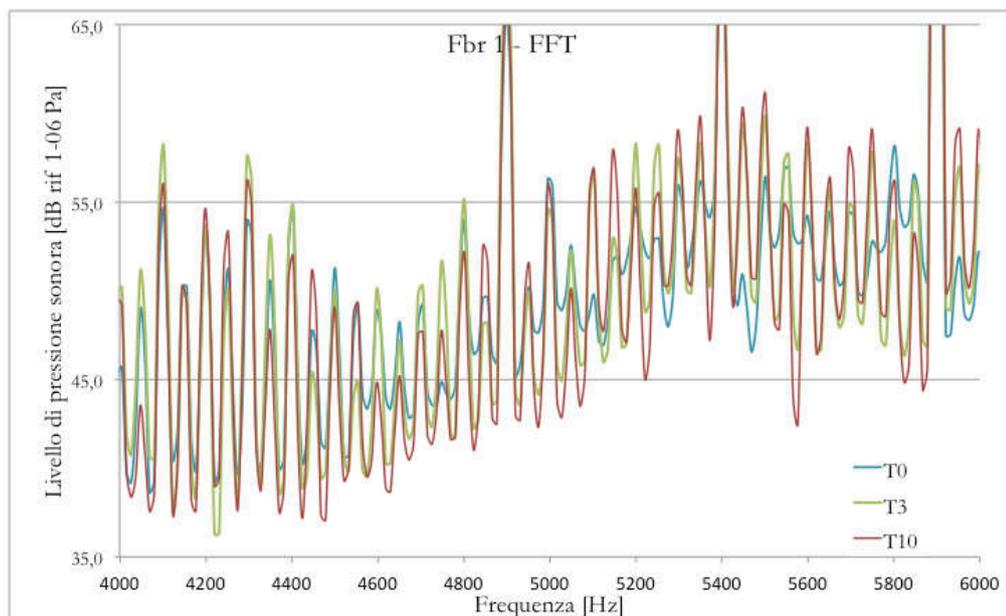


Figura 71: Misure dei livelli di pressione sonora rilevata con l'idrofono nel fbr 1 (0,1 – 10 kHz) al tempo zero (T0), dopo tre e dieci giorni. Finestra da 4 a 6 kHz circa.

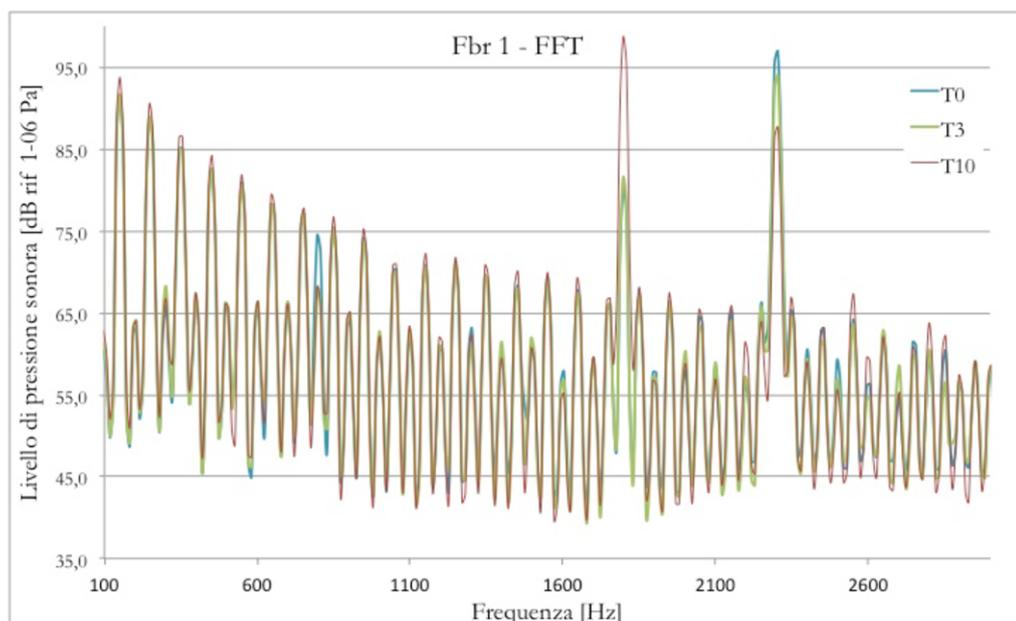


Figura 72: Misure dei livelli di pressione sonora rilevata con l'idrofono nel fbr 1 (0,1 – 10 kHz) al tempo zero (T0), dopo tre e dieci giorni. Finestra da 0,1 a 3 kHz circa.

Restringendo il campo di osservazione negli intervalli da 1776 a 1820 Hz e da 21.790 a 21.813 Hz circa (vedi Figura 73), è stato quindi osservato un diverso comportamento delle microalghe rispetto all'acqua: al crescere della concentrazione di microalghe per millilitro dal terzo al decimo giorno, è stato notato un incremento nel valore dell'intensità acustica della pressione misurata in acqua.

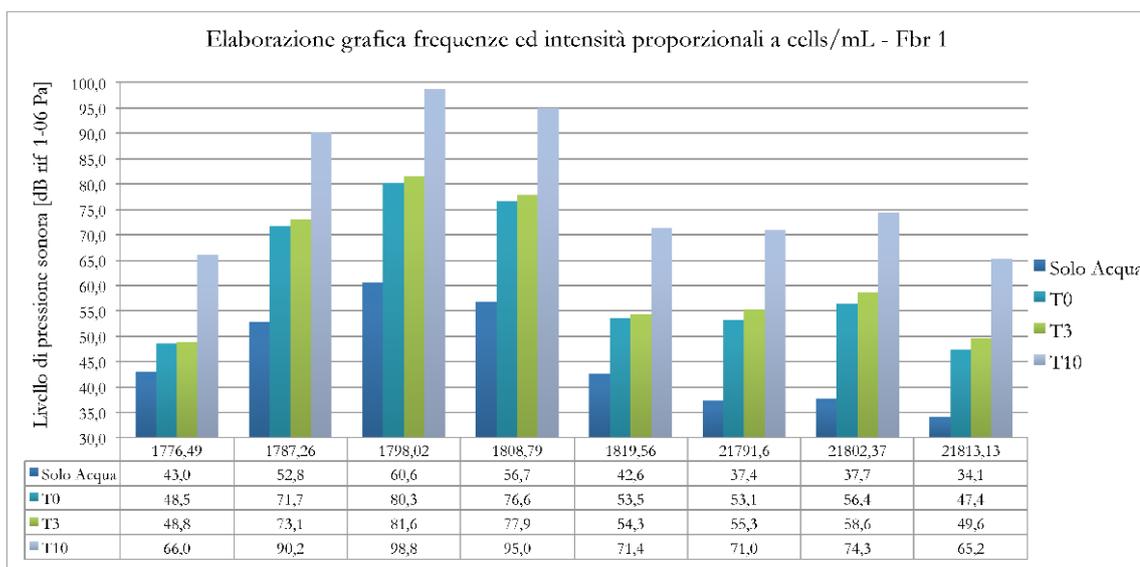


Figura 73: Elaborazione delle registrazioni acustiche ottenute nel Fbr 1 negli intervalli da 1776 a 1820 Hz e da 21.790 a 21.813 Hz circa.

Dalle elaborazioni grafiche con il Software Origin Pro sono state ottenute per ciascun fotobioreattore, le superfici di risposta tridimensionali mediante l'interpolazione tra i dati ottenuti dalle registrazioni audio del secondo esperimento del Doe e i corrispondenti valori della concentrazione di microalghe espressa in cellule per millilitro, misurata con il contacellule automatico Scepter e meglio descritta nel paragrafo 4.5.2.1 di questo Capitolo.

Qui di seguito in Figura 74 è rappresentata la superficie di risposta ottenuta nel fbr 1 durante l'avanzamento delle colture nel secondo esperimento del Doe.

Il suono inviato all'attuatore acustico per le misure di bioacustica è stato quello impiegato nel programma delle stimolazioni acustiche per frequenza e intensità, ed è stato riprodotto e registrato con l'idrofono posto in immersione a circa 10 cm. dal livello superiore della coltura microalgale come raffigurato in figura 67 e con una durata pari a 10 secondi.

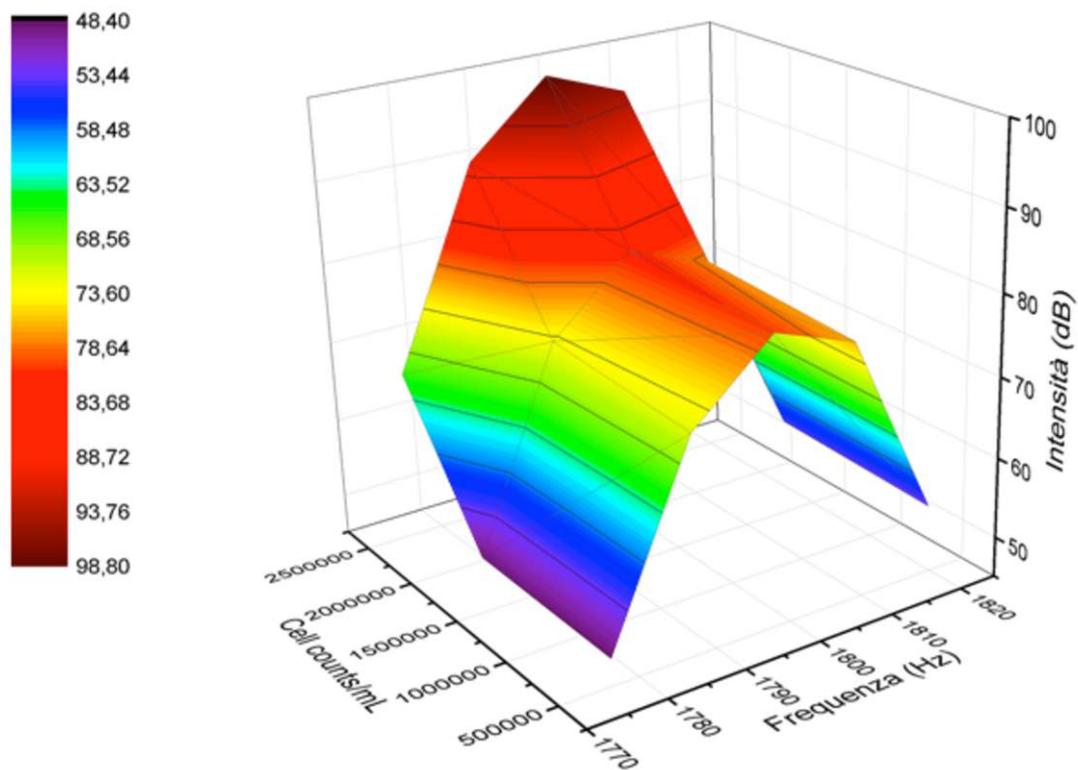


Figura 74: Campo acustico di risposta del fbr 1

In queste registrazioni di bioacustica e nel corso delle attività sperimentali, particolare attenzione è stata posta al rabbocco del terreno di coltura al momento dei prelievi di biomassa per le analisi e alle aliquote disperse in aria per evaporazione, in modo tale da non alterare le caratteristiche di riproduzione delle armoniche nei fbr.

I risultati ottenuti dalle registrazioni con l'idrofono e ricorretti in acqua hanno riconfermato l'esistenza di una correlazione tra il valore di intensità della pressione acustica misurata e la concentrazione di cellule per mL, a determinate frequenze dello spettrogramma.

Il campo acustico di risposta del sistema raffigurato in Figura 74, una volta fissati i parametri di frequenza e intensità del suono campionato da inviare al fbr per le misure di bioacustica, consente di ottenere nel tempo le informazioni sulla variazione della pressione acustica misurata in acqua.

Dai valori della pressione acustica rilevata dall'idrofono interpolati con i parametri di frequenza individuati nel campo acustico di ciascun fotobioreattore (superficie di risposta tridimensionale), sarà possibile estrapolare il corrispondente valore di concentrazione cellulare di microalghe presenti nel fbr.

Una volta fornite le istruzioni dei diversi campi acustici caratteristici di ciascun fotobioreattore al Software utilizzato per i programmi di stimolazione e di misura, sarà possibile automatizzare completamente la misura di bioacustica e ripeterla nel tempo senza alcun costo né tantomeno la presenza fisica di un operatore.

La riproducibilità del dato acquisito e, le informazioni di distribuzione dimensionale delle cellule per millilitro saranno ottenute quindi solo con una serie di misure allo Scepter contattelle automatico limitate a pochi ma rappresentativi campioni nel corso della crescita delle colture microalgali.

L'idrofono impiegato potrà essere poi sostituito da un qualsiasi microfono impermeabilizzato che, seppure con una diversa sensibilità, potrà tranquillamente assolvere tale funzione dopo essere stato caratterizzato insieme al fbr di riferimento.

4.6 Le Analisi al microscopio elettronico TEM

Gli esami di microscopia elettronica a trasmissione hanno evidenziato per la *Scenedesmus obliquus* una morfologia simile a quanto presente in letteratura, e le dimensioni misurate sono in accordo con quelle rilevate con l'esame al microscopio ottico e al granulometro laser (Figura 75). Com'è possibile invece osservare in Figura 77, le cellule di *S. obliquus*, trattate nel fbr con le stimolazioni acustiche, rispetto a quelle di controllo (Figura 76) sembrano derivare da aggregati separati durante le stimolazioni.

Infatti con le onde acustiche si è osservata una sostanziale riduzione degli aggregati, le cui conferme sono state ottenute con gli esami granulometrici di conta cellulare. Questo effetto potrebbe essere il fenomeno più importante che incrementando il rapporto superficie/volume della coltura cellulare riesce a ricevere un maggior flusso fotonico, rendendo più efficiente la fotosintesi.

Non è chiaro, come mai questo ceppo microalgale, nelle sue fasi evolutive tende ad associarsi in gruppi di 3-4 individui, ma non essendo dotato di moto proprio, questo microorganismo, con questa particolare conformazione riesce a aumentare la sua superficie nel tentativo di rallentare la sua sedimentazione verso il basso.

Certamente nella sperimentazione pilota e nei due esperimenti del disegno fattoriale Doe, sono state osservate le separazione dei cenobi su campioni di microalghe caratterizzati da una buona vitalità, rappresentata dalla crescita esponenziale durante l'avanzamento delle colture con effetti più o meno evidenti a seconda dei programmi di stimolazione impiegati.

Nella Figura 77 si osservano, infatti, cellule singole aventi la conformazione geometrica caratteristica a forma di mezza luna rovesciata verso l'esterno, propria dei cenobi. La presenza di queste cellule staccate e la riduzione complessiva degli aggregati cellulari come si diceva è stata osservata con una maggiore frequenza nelle colture stimolate acusticamente.

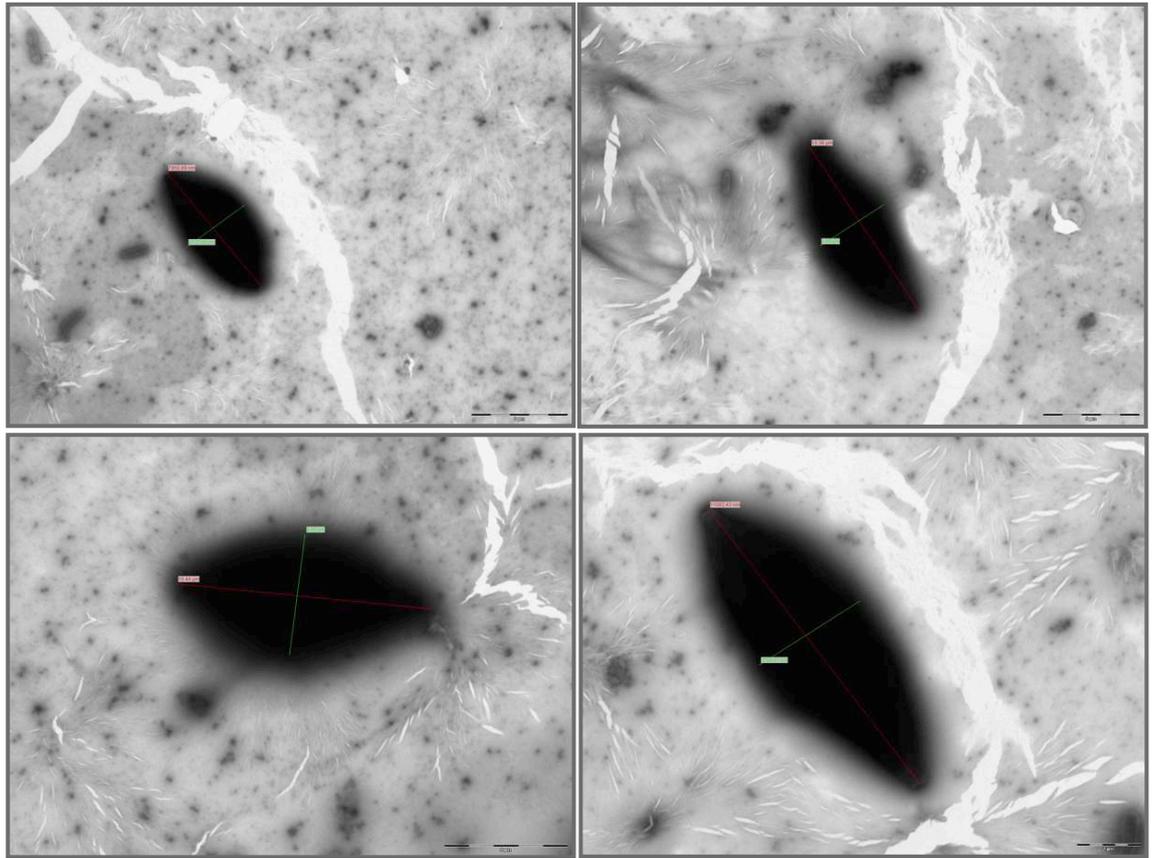


Figura75: Nella foto ottenuta con il microscopio elettronico Tem è chiaramente visibile la morfologia della microalga *S. obliquus* impiegata in questa sperimentazione di bioacustica. Su ciascuna foto sono stati tracciati i diametri minore e maggiore e determinato statisticamente le dimensioni medie dell'ellisse prolato.

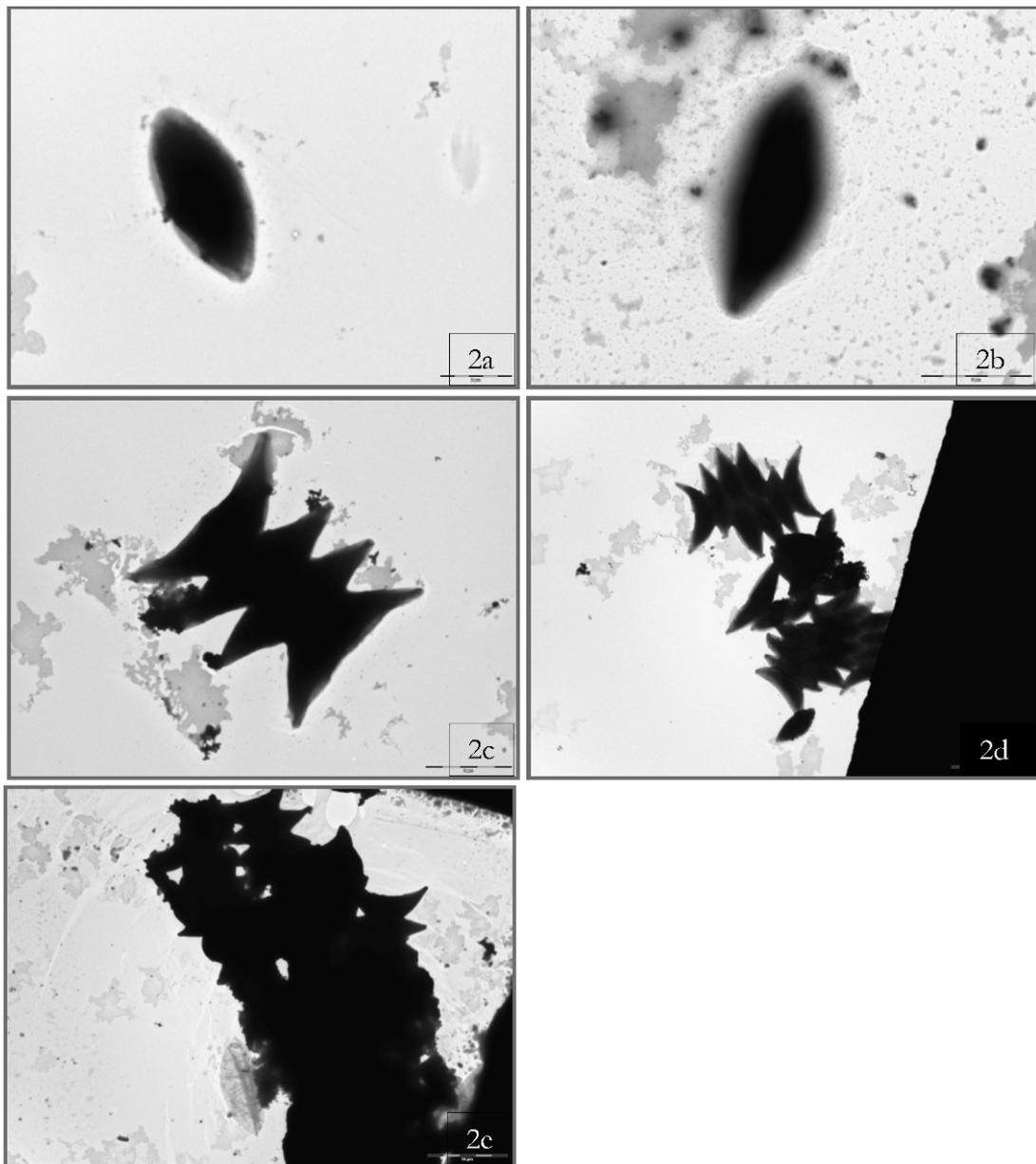


Figura 76: Nella foto ottenuta con il microscopio elettronico Tem sono raffigurate cellule della microalga *S. obliquus* impiegata in questa sperimentazione di bioacustica. Nei riquadri 2c, 2d e 2e, si osservano i cenobi composti da 4 cellule in cui quelle poste alle estremità assumono la forma di mezza luna.

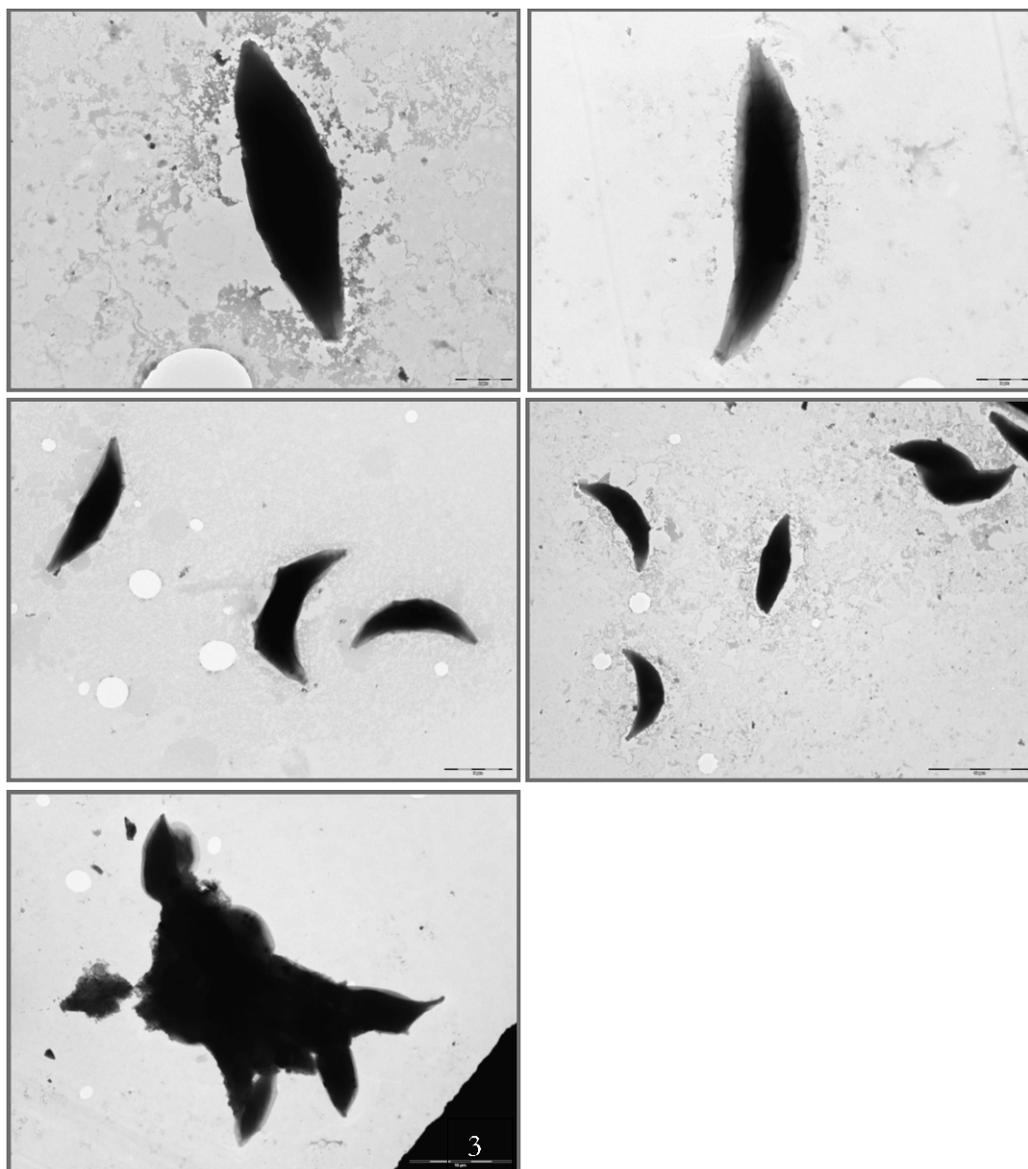


Figura 77: Nella foto ottenuta con il microscopio elettronico Tem sono raffigurate cellule della microalga *S. obliquus* impiegata in questa sperimentazione di bioacustica. Nei riquadri si osservano cellule singole aventi la conformazione geometrica a mezza luna come nella composizione dei cenobi. La presenza di queste cellule staccate dai cenobi e la riduzione complessiva degli aggregati cellulari è stata osservata con una maggiore frequenza nelle colture stimolate acusticamente.

4.7 Analisi di Microscopia in fluorescenza

Dalle analisi delle immagini acquisite con la di microscopia in fluorescenza su campioni di microalghe sottoposte a diversi programmi di stimolazione acustica, è stata ottenuta conferma di quanto osservato con le successive analisi Spettrofluorimetriche riguardo alla presenza di cromofori e al diverso rapporto osservato di clorofilla a e b (Chl *a*, Chl *b*).

La mancanza di informazioni in merito alla concentrazione di clorofille non ha permesso di normalizzare gli spettri di emissione in fluorescenza sulla base del contenuto in clorofilla. Ciò è stato dovuto all'impossibilità di procedere con l'estrazione delle clorofille su un numero di campioni così elevato e ripetuto negli 8/10 giorni di durata dell'esperimento del Doe.

Non era chiaro infatti se nei campioni oggetto di studio vi fossero state cellule morte, rotte o addirittura la presenza di cromofori che anche da soli rispondono alle frequenze di eccitazione falsando il dato di misura.

Con le immagini di microscopia in fluorescenza queste presunzioni sono state in parte escluse come è possibile osservare in Figura 78 dove la nitidezza delle immagini delle cellule che hanno risposto in fluorescenza, ha permesso di esaminare i contorni morfologici delle cellule che si sono dimostrati ben delineati, cosa che altrimenti non sarebbe stata possibile se nel campione fossero stati presenti cromofori esterni provenienti da cellule morte o rotte che, con i loro stati emissivi, avrebbero reso le immagini meno nitide.

Sempre dall'esame delle immagini è emersa un'altra importante osservazione:

gli effetti più marcati nella divisione dei cenobi di cellule è stata osservata nelle frequenze più elevate del Doe, 4950 Hz. Questo preliminare effetto era già stato osservato con le analisi di microscopia elettronica TEM (vedi paragrafo 4.6), rispetto alla coltura di controllo con il segnale acustico sweep che, nell'esperimento pilota ha stimolato le colture ad una intensità cinque volte superiore.

Alla luce dei risultati ottenuti sia dalle indagini Spettrofluorimetriche che dalle analisi di microscopia in fluorescenza sono emerse importanti considerazioni in assenza delle quali sarebbe stato davvero difficile ottenere informazioni sull'efficienza e sulla variazione di composizione posta in atto dalle cellule in risposta allo stress meccanico osservata nel diverso rapporto tra Chl *a*/Chl *b*. E cioè: l'assenza di fluorescenza potrebbe essere imputabile proprio ad un diverso rapporto qualitativo dei cromofori che partecipano ai fenomeni emissivi, e quindi osservabili a diverse bande di eccitazione.

Le condizioni sperimentali migliori sarebbero quelle di proseguire nelle attività sperimentali con indagini Spettrofluorimetriche e di microscopia in fluorescenza effettuando, in tempo

reale o comunque nelle stesse identiche condizioni entro poco tempo dalla cessazione del programma di stimolazione giornaliero, l'estrazione delle clorofille.

Questo permetterebbe di ottenere valori di concentrazione delle clorofille affidabili e rappresentativi, indispensabili per la normalizzazione degli spettri di fluorescenza, consentendo così di ottenere informazioni più accurate.

Le analisi di microscopia in fluorescenza sono state ottenute eccitando i campioni con un filtro a 480 nm, così come indicato nel paragrafo 3.4.4 materiali e metodi. I campioni osservati hanno mostrato comportamenti diversi a seconda dei programmi di stimolazione acustica a cui sono stati esposti.

In particolare, per le colture di controllo è emersa una maggiore presenza di aggregati cellulari, che talvolta non hanno risposto in emissione (fluorescenza) nonostante siano stati eccitati sempre alla stessa frequenza.

Relativamente ai campioni di microalghe stimulate acusticamente alla frequenza di 100 Hz, possiamo affermare che le risposte in fluorescenza appaiono di maggiore intensità e numero relativamente maggiore di cellule, mostrando una morfologia più regolare e caratteristica dell'ellisse prolato.

Per le colture stimulate ad una frequenza più elevata 10 kHz, è stato invece osservata una maggiore presenza di cellule di *Scenedesmus obliquus* dalla forma più tondeggiate, che complessivamente ha risposto con una minore intensità di fluorescenza e presentava un numero minore di aggregati.

Purtroppo le analisi non sono state effettuate in tempo reale, e comunque dopo oltre un'ora dal termine della stimolazione acustica. E' quindi probabile che il sistema di conservazione abbia in parte influito sull'esito di queste analisi. Si ritiene pertanto opportuno in futuro, data la validità della metodica impiegata, di effettuare tale analisi entro un'ora dal termine della stimolazione acustica, mantenendo le cellule entro tale periodo nelle stesse condizioni di temperatura al fine di non perdere importanti informazioni sulla presenza di aggregati e sulla variazione nella composizione delle clorofille.

Altra caratteristica che aggiunge valore alla tecnica di analisi della microscopia fluorimetrica è la rapidità di esecuzione delle analisi che permette in breve tempo di testare un numero notevole di campioni acquisendo le relative immagini digitali rispetto alla Microscopia Elettronica dove invece occorre una laboriosa preliminare preparazione del campione (con un microscopio a 1000 ingrandimenti), con la inevitabile perdita di informazioni.

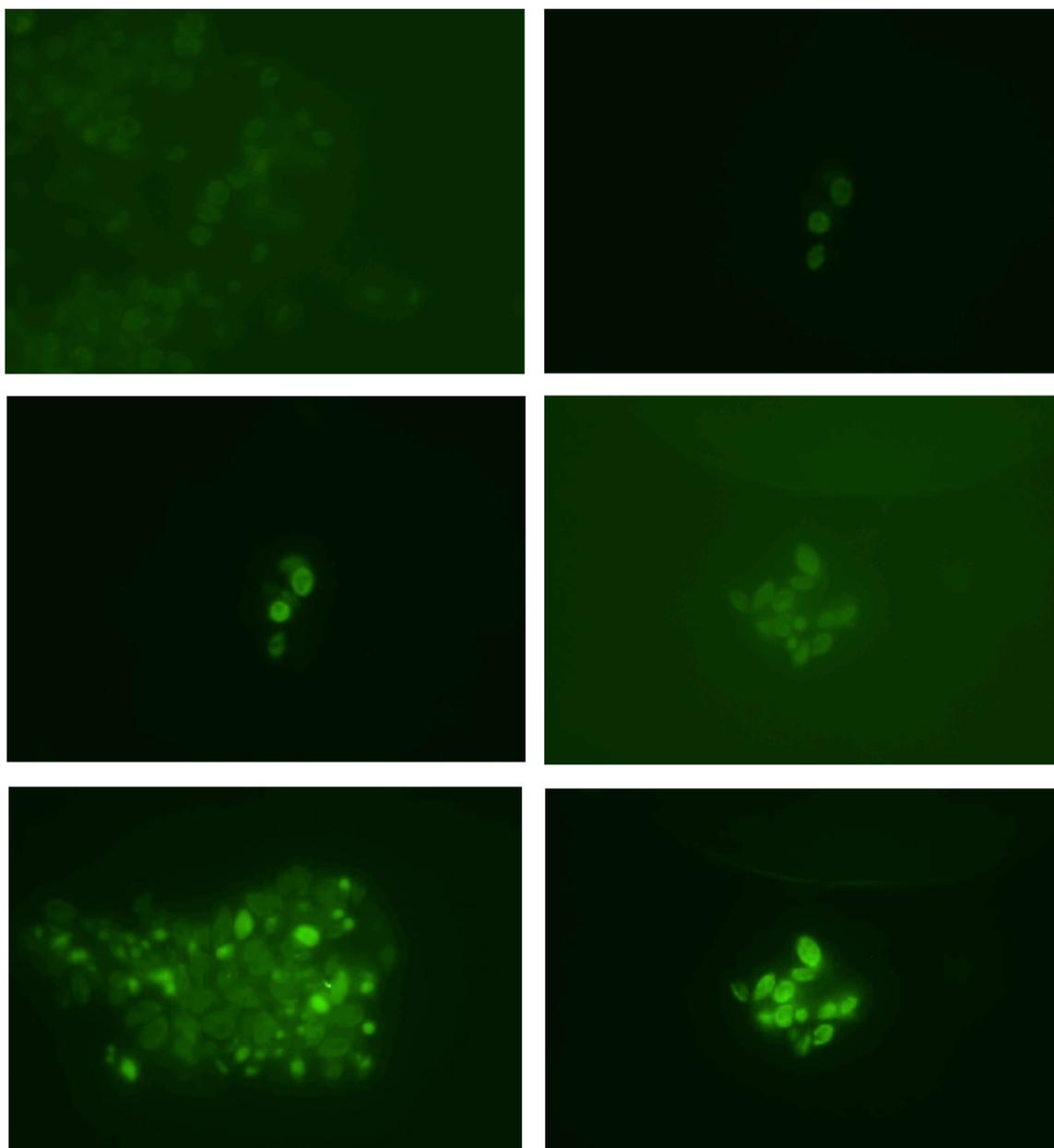


Figura 78: Analisi di microscopia in fluorescenza della *Scenedesmus obliquus* eccitata con la frequenza di 480 nm e risposta in fluorescenza a 527 nm.

Il monitoraggio dei fenomeni emissivi in fluorescenza delle cellule microalgali può aiutare a descrivere l'efficienza fotosintetica delle cellule sottoposte a diversi programmi di stimolazione acustica. Altri autori riferiscono che in presenza di fattori di stress si possono riscontrare riduzioni della concentrazione di clorofilla totale (Chl *a* + Chl *b*), variazioni del rapporto clorofilla *a*/clorofilla *b* (Chl *a*/Chl *b*) (Demmig Adams and Adams 1996; Merzlyak and Gitelson, 1995).

L'azione di fattori di stress induce anche variazioni nell'efficienza del fotosistema II che possono essere rilevate attraverso la stima della fluorescenza della clorofilla.

La fluorescenza clorofilliana si verifica in competizione con i processi fotochimici radiativi e quindi ad una maggiore emissione corrisponde una minore efficienza fotosintetica complessiva e una dissipazione di calore; una variazione nei fenomeni di emissione in fluorescenza delle clorofille può fornire informazioni riguardo ad una variazione nell'efficienza dell'attività fotosintetica (Papageorgiou and Govindjee, 2004).

L'efficienza fotochimica del PSII al buio F_v/F_m , il Performance Index (Strasser et al. 1999), l'efficienza fotochimica effettiva alla luce $\Delta F/F_m'$ (Genty et al., 1989) e il Quenching non fotochimico, sono variabili ampiamente utilizzate per diagnosticare condizioni di stress (Clark et al. 2000; Strasser et al. 2000).

Esami accurati di cristallografia elettronica delle proteine di membrana del fotosistema II ha rivelato la presenza di importanti subunità nel pigmento fotoattivo delle molecole presenti all'interno di questo grande complesso di proteine di membrana (Barber James and Kühlbrandt Werner, 1999) che potrebbero fornire preziose informazione sui fenomeni adattativi delle cellule in risposta alla meccano-trasduzione. Si ritiene pertanto, alla luce di queste preliminari conferme sperimentali e attraverso la collaborazione con il Prof. James Barber dell'Imperial College di Londra e del Laboratorio Biosolar Lab di Alessandria diretto dal Prof. Guido Saracco e dalla responsabile Dott.ssa Alessandra Pagliano, di proseguire con ulteriori approfondimenti finalizzati ad una sempre migliore comprensione degli effetti osservati che, per la rilevanza mostrata nelle percentuali massime di rate di crescita microalgale ottenibile, potrebbero mettere in luce un'interessante nuovo scenario su un eventuale e sensibile incremento di efficienza nel fotosistema II.

Gli effetti della meccanotrasduzione sulle cellule di Scenedesmus obliquus

Le diverse cinetiche di crescita ottenute con i differenti suoni testati nella sperimentazione pilota e nel design of experiment ci hanno spinto ad approfondire gli aspetti correlati alla risposta della cellula microalgale sotto l'azione di uno stimolo meccanico, quale quello prodotto dai suoni nel campo delle frequenze udibili.

Le stimolazioni con i suoni di frequenza compresa nel range da 0,1 - 6 kHz, hanno incrementato in maniera diversa le cinetiche di crescita, accelerando i processi di duplicazione cellulare e, senza dubbio questa maggiore attività ha influito sul metabolismo e sul consumo stesso di nutrienti, ma non è del tutto chiaro il fenomeno di attivazione della cellula a seguito dello stimolo meccanico.

Si è quindi deciso di esplorare il comportamento della cellula vegetale sotto l'azione di uno stress meccanico, a partire dal modello meccanico della cellula biologica di Zinin et al., 2005. Questi autori attribuiscono al cambiamento delle caratteristiche di viscosità del fluido interno alla cellula la possibile causa dell'alterazione della frequenza di risonanza cellulare.

Essi infatti hanno dimostrato con le simulazioni acustiche che all'aumentare della viscosità interna della cellule di *B. emersonii*, la sua frequenza di risonanza si riduceva proporzionalmente del 26%. Un'altra osservazione sperimentale sulla risonanza delle cellule di microalghe sottoposte alla frequenza acustica di 1 MHz è stata prodotta da Miller, 1986.

In un recente lavoro di Hartmann et al., 2005 è stato studiato lo stress meccanico provocato sulle strutture cellulari di un lievito sottoposto ad elevata pressione idrostatica, mettendo in evidenza non solo le deformazioni strutturali della membrana, ma anche l'inattivazione di

proteine di membrana a causa della trasmissione indotta da queste perturbazioni al doppio strato lipidico (Kilimann et al., 2005; Ulmer et al., 2002; Knorr, 2004).

Inoltre Hartmann et al., 2005 riconoscono come particolarmente sensibili a questi effetti le geometrie cellulari allungate. La forma astiforme di *E. coli* e di *P. aeruginosa* si sono dimostrate infatti più sensibili all'applicazione di pressione idrostatica. Ciò darebbe ulteriore importanza alle precedenti osservazioni relative alla particolare morfologia della *Scenedesmus obliquus* e alle sue caratteristiche reologiche e di viscosità, come si è visto nel paragrafo 1.4.

Le cellule rispondono allo stress meccanico principalmente con dei cambiamenti sulla tensione della membrana plasmatica, lo stress shear, la pressione idrostatica, e la compressione (Apodaca, 2012). Ma oltre alle forze esterne alla cellula bisogna considerare anche le forze interne alla cellula, generate dalla pressione osmotica. La cellula risponde a questi stimoli esterni modificando una serie di fattori tra cui non solo la divisione cellulare, la crescita dimensionale, la trasduzione dei segnali, l'espressione genica, l'attivazione dei canali ionici di membrana, ma anche la conversione fotochimica e persino la morte.

I fattori ambientali influenzano gli organismi cellulari con stress meccanici. Per questo motivo diviene sempre più interessante capire quali effetti possano produrre sulle cellule vegetali queste interazioni di forze meccaniche.

E' stato dimostrato come Suoni di bassa frequenza ed intensità, abbiano prodotto effetti al metabolismo e alla membrana plasmatica ossia allo strato esterno della cellula che rileva prima le variazioni dell'ambiente in cui è immersa.

Zhao et al., 2002 hanno investigato il fenomeno con suoni di intensità inferiore ai 100 dB di frequenze par a 400, 800, 4000 Hz per un'ora. Alla frequenza di 400 Hz e 90 dB è stato osservato il cambiamento più vistoso. L'incremento è quasi lineare entro un certo range di intensità sonora oltre il quale si inverte il fenomeno. Ma gli effetti della trasduzione all'interno della cellula ancora sono poco chiari. Chiaramente ci sono delle evidenze su come gli stress ambientali possano cambiare le funzioni delle proteine di membrana.

L'interazione tra i fosfolipidi e le molecole proteiche e il cambiamento della struttura molecolare influenza e regola la fluidità dell'intera membrana. Gli aumenti di fluidità correlano con aumenti della permeabilità all'acqua dalla membrana plasmatica cellulare e si è visto come questo migliore afflusso da e per la cellula di acqua, abbia influito positivamente sulla riduzione dello stress osmotico sulla crescita di *Escherichia coli*. Da questo possiamo dedurre che il cambiamento della struttura secondaria della membrana proteina può

comportare l'aumento della fluidità della membrana plasmatica.

E' stato quindi esplorato il diverso comportamento delle cellule vegetali sotto l'azione di stress ambientali di diversa natura, ivi incluse le sollecitazioni meccaniche prodotte dalle stimolazioni acustiche. Lo scopo era di individuare una metodologia di analisi che fosse idonea a rappresentare in che modo queste cellule interpretino questi segnali e quali azioni e/o modificazioni biochimiche e di altra natura esse mettano in campo per sottrarsi a queste inattese perturbazioni.

Si è reso, quindi, necessario approfondire gli effetti della meccano-trasduzione della cellula in modo da individuare e in seguito ottimizzare il rendimento energetico del processo microalgale di biosintesi in base alle frequenze acustiche ritenute più efficienti.

Sono state individuate sostanzialmente tre diverse metodologie di analisi estremamente diverse tra loro per cercare di spiegare i meccanismi messi in campo dalle cellule in risposta alle azioni di compressione e rarefazione prodotti nel mezzo dai suoni impiegati nelle stimolazioni.

5.1 Le risposte biochimiche allo stress meccanico

Le tecniche ordinarie di analisi non permettono di ottenere informazioni dettagliate sui meccanismi molecolari che stanno alla base dei cambiamenti nell'efficienza fotosintetica delle microalghe e nella composizione biochimica delle stesse.

I diversi comportamenti e le diverse cinetiche di crescita osservate nelle colture stimolate con le onde acustiche rispetto a quelle di controllo hanno dimostrato di aver prodotto anche effetti macroscopici molto diversi tra di loro per quanto riguarda il colore e la torbidità dell'acqua nei fbr Richardson et al., 1983 riferivano in merito alla strategia adattativa della *Scenedesmus obliquus* che, a seguito dell'incremento delle concentrazioni nel numero di individui e del conseguente fenomeno di ombreggiamento, fa ridurre la densità del flusso fotonico nelle colture microalgali.

Ma un altro importante aspetto da considerare, quando si lavora con le colture cellulari in batch riguarda senza dubbio il bilanciamento energetico delle cellule che, per il loro sostentamento in certe fasi evolutive, degradano le proteine accumulate rilasciando nel

mezzo di coltura i relativi prodotti di degradazione. Questo fenomeno diventa ancora più importante laddove si assiste ad una rapida risposta ad uno stimolo che genera un elevato rate di divisione cellulare, come nel caso delle stimolazioni acustiche.

Sulla base di queste importanti considerazioni è stata avviata un'indagine articolata in due fasi.

Nella prima fase è stata eseguita un'approfondita ricerca bibliografica per apprendere meglio i meccanismi che hanno prodotto le evidenze sperimentali discusse nel capitolo 4 e che si è trovato essere recentemente supportato da altri autori (Cai et al., 2013; Shi Rhen et al., 2012).

Nella seconda fase si è cercato di acquisire informazioni sulle dinamiche del profilo biochimico delle cellule microalgali, in presenza ed assenza di stimolazione acustica.

Le misure di efficienza dei fotosistemi nel tempo sono state ottenute con fluorimetro portatile AquaPen, misurando in modo dinamico le variazioni dei parametri di efficienza dell'apparato fotosintetico prima e dopo le stimolazioni acustiche.

Ulteriori analisi dei campioni di microalghe allo Spettrofluorimetro sono state effettuate alla ricerca di informazioni sulla composizione e, quindi, di eventuali modifiche del profilo biochimico dei complessi cellulari di *Scenedesmus obliquus* a seguito di stimolazioni acustiche.

Con la tecnica infrarosso FTIR, è stato investigato il rapporto carboidrati/proteine che da evidenza bibliografica (Giordano et al., 2001) risulterebbe anch'esso collegato con l'efficienza dei fotosistemi coinvolti.

Le attività e gli approfondimenti bibliografici della I fase di studio sugli effetti della meccanotrasduzione e le tecniche di indagine sulle metodologie FTIR descritte nel paragrafo 3.4.3 sono state eseguite con la assidua collaborazione ed il prezioso contributo della PhD Prof.ssa Paola Sassi e delle Dott.sse Maria Ricci e Sara Mattana. Lo sviluppo ulteriore delle analisi e approfondimenti descritti nei paragrafi 5.3 e 5.5 sono state invece realizzati con la collaborazione della PhD Prof.ssa Loredana Latterini della PhD Prof.ssa Paola Sassi e della Dott.ssa Sara Mattana.

I fase: approfondimento bibliografico

5.1.1 L'attivazione dei Canali ionici

Ci sono molte evidenze sperimentali che attestano, in seguito a stimolo meccanico, l'attivazione dei canali ionici del calcio, la cui concentrazione aumenta nella cellula dopo la meccano-trasduzione (Knight et al., 1992).

Similmente alle cellule animali, anche in quelle vegetali esiste una rete di trasmissione dello stimolo meccanico, che mette in collegamento le strutture di citoscheletro, membrana plasmatica e parete cellulare. Questa rete si basa su molecole linker contenenti peptidi RGD (arg-gly-asp) simili alle integrine. Questi peptidi connettono i microtubuli alla membrana plasmatica, che contiene canali ionici per il Ca^{2+} . Un particolare tipo di guaine di membrana (Hechtian strands) lega la membrana plasmatica alla parete cellulare attraverso l'actina e i peptidi simili all'integrina attaccati all'interno della membrana, che facilitano l'apertura e la chiusura dei canali di membrana attivati dall'estensione della superficie della cellula (Jaffe et al., 2002; Telewski, 2006).

I canali ionici mecano-sensibili (MS) sono delle proteine di membrana che hanno la capacità, attraverso i loro pori, di aprirsi e chiudersi in conseguenza a forze meccaniche risultanti da gravità, pressione osmotica e suono. Ogni proteina di membrana capace di adottare molteplici conformazioni con diverse sezioni trasversali può essere considerata mecano-sensibile (Haswell et al., 2011; Jensen et Haswell, 2012).

I canali MS sono all'equilibrio tensione-dipendente tra due stati, chiuso e aperto, che differiscono per la conduttanza. Quando i canali ionici si trovano nel loro stato aperto, come risposta a forze meccaniche, permettono il passaggio di ioni, soprattutto Ca^{2+} e K^+ , attraverso la membrana, in modo da originare una corrente ionica che può diventare segnale elettrico (meccano-trasduzione). La tensione di membrana così generata può essere trasmessa direttamente nel canale attraverso il doppio strato lipidico o confluire indirettamente ad altre componenti cellulari.

I canali MS sono un eccellente strumento per lo studio dell'interazione tra le proprietà meccaniche della membrana e la struttura e la funzione delle proteine.

Importanti evidenze sperimentali sono state ottenute da due tipi di canali ionici, isolati dalla membrana plasmatica di *Escherichia coli*: MscS e MscL rispettivamente canali meccano-sensibili a bassa e ad alta conduttività, proteine non selettive, abbondantissime nei batteri. In questo caso sono state studiate le interazioni tra le proprietà dei lipidi e la funzione delle proteine. MscL e MscS reagiscono direttamente ai cambiamenti nella tensione di membrana tramite l'apertura dei pori della proteina. L'interazione con la membrana è un aspetto fondamentale della loro funzione. (Jensen et Haswell 2012; Haswell et al., 2011; Sukharev et Anishkin, 2004).

Diversi studi su MscL hanno evidenziato che c'è un'effettiva corrispondenza idrofobica tra la proteina e la membrana, tanto che il decrescere dello spessore della membrana permette una più rapida ed efficace apertura del canale.

Nel mondo degli eucarioti, sono stati studiati membri facenti parte della famiglia delle proteine MscS in tutti i genomi di piante finora prese come oggetto di analisi, tra cui di grande evidenza le 10 proteine "MscS-relative" presenti nel genoma di *Arabidopsis thaliana* e in molti, ma non tutti, i genomi fungini (Haswell et al., 2011).

5.1.2 Il metabolismo cellulare e l'espressione genica

In molti studi riguardanti la meccano-trasduzione è stato attestato un effetto del suono sul metabolismo di cellule vegetali, lieviti e batteri. (Matsushashi et al., 1998)

Wang Xiujuan e collaboratori (Xiujuan et al., 2002) hanno studiato l'effetto del suono sulle piantine di Crisantemi trattati a una frequenza di 1000 Hz e a un'intensità di 100 dB a tempi diversi. I risultati dimostrano che l'attività degli "enzimi protettivi" aumenta in modo differente. Questi enzimi, perossido dismutasi (POD), catalasi (CAT) e superossido dismutasi (SOD) sono chiamati protettivi perché decompongono l' H_2O_2 e eliminano le specie radicaliche di O_2^- .

Gli studi effettuati sulle cellule del lievito *S. cerevisiae* dimostrano che stimolazioni acustiche a differenti frequenze (100 Hz e 10 kHz) inducono risposte metaboliche diverse (Aggio et al, 2011).

Jeong et al., 2008, riferiscono come particolari frequenze acustiche (125 Hz, 250 Hz e 1 kHz) stimolano la sintesi delle proteine ALDOLASI e RUBISCO, due complessi enzimatici coinvolti rispettivamente nella glicolisi e nella fotosintesi e questo potrebbe spiegare non solo la variazione nei rapporti tra proteine e carboidrati, ma una diversa efficienza nei processi fotosintetici ad opera delle stimolazioni meccaniche.

Sono stati individuati geni la cui espressione è sensibile alla stimolazione da onde acustiche. La regolazione genica da onde acustiche è stata dimostrata attraverso l'analisi dell'espressione dell'mRNA.

L'espressione dell'mRNA del gene ALD (gene che codifica per la proteina aldolasi, che catalizza la condensazione tra la gliceraldeide 3 fosfato e il fosfodiidrossiacetone, ad esempio nella glicolisi) aumenta in modo significativo con un trattamento a 125 e 250 Hz, mentre diminuisce con un trattamento a 50 Hz. Questo comportamento è un indice della presenza di un meccanismo di risposta frequenza-specifico.

Gli esperimenti sono stati eseguiti su una pianta di riso transgenica contenente il gene chimerico derivante dalla fusione del promoter del gene ALD e dal gene reporter GUS. (Un gene reporter è un gene la cui attività è facilmente monitorabile mediante istochimica o metodi immunologici; esso codifica per un prodotto genico che può essere utilizzato per studiare l'attività di sequenze regolatrici di un altro gene di interesse). In base al tipo di stimolo meccanico viene modificata l'espressione di particolari geni.

I geni di cui è stata valutata la possibile alterazione dell'espressione genica a seguito di stimolazione acustica sono quelli codificanti per:

- Rubisco : enzima fondamentale della fotosintesi
- Aldolasi fruttosio 1,6-bifosfato: enzima fondamentale della glicolisi
- Proteina DNA J-like
- Calreticulina

II fase: le metodologie di analisi impiegate

*5.2 Le tecniche fluorimetriche di analisi impiegate per indagare gli effetti della meccanotrasduzione sulle cellule di *Scenedesmus obliquus**

Le cellule microalgali, a differenza dei lieviti e batteri, regolano il proprio metabolismo di conversione dell'energia fotochimica mediante l'assorbimento della luce. I fotoni devono quindi raggiungere velocemente i centri di reazione all'interno dei cloroplasti presenti nel nucleo centrale della *Scenedesmus obliquus* e sulla membrana.

A seconda dello stato fisiologico del microrganismo, è possibile sfruttare la fluorescenza prodotta dai centri di reazione quando sono irradiati da un fascio di luce saturante e calcolarne i tempi di decadimento.

Questo indice è in grado di esprimere l'efficienza nella conversione energetica visto che la fluorescenza rappresenta un fenomeno dissipativo di energia e quindi contrapposto al valore di massima efficienza. Al crescere della fluorescenza diminuisce l'efficienza fotosintetica.

Con l'impiego di queste tecniche è possibile ottenere informazioni dinamiche utili a riscontrare eventuali variazioni di efficienza nella conversione energetica della luce ad opera delle microalghe e, soprattutto, di composizione ovvero di modifica dell'ambiente oggetto di analisi ovvero delle clorofille e quindi dei cromofori che contribuiscono alla conversione fotochimica con i loro centri di reazione.

Osservando gli spettri, questi evidenziano due bande distinte a 630 e 685 nm, la cui intensità relativa cambia nei diversi momenti di lettura (avanzamento in giorni) per ciascun fbr e in relazione, soprattutto, ai diversi programmi o cicli di stimolazione acustica a cui le microalghe sono state sottoposte.

Possiamo attribuire la presenza di almeno due diverse clorofille e in particolare si osserva tra le bande un leggero shift (spostamento laterale) dovuto a una qualche modificazione dell'ambiente delle Chl *a* 685 nm e Chl *b* 645 nm. Ciò induce a pensare a una presenza diversa di contenuto in clorofilla.

E' stata osservata una variazione d'intensità relativa con l'avanzamento del tempo dell'esperimento su entrambi le bande delle clorofille e ciò rimanda, infatti, a un diverso contributo di clorofille presenti nei campioni di microalghe esaminati e quindi un numero diverso di cromofori che assorbono ed emettono elettroni durante il processo fotosintetico.

5.3 Risultati complessivi delle analisi allo Spettrofluorimetro

Dalle analisi allo Spettrofluorimetro sono emerse importanti informazioni in merito al comportamento delle cellule microalgali sotto l'azione di un flash saturante, con la loro inequivocabile risposta in fluorescenza che, in taluni casi ha mostrato risposte diverse a seconda del programma di stimolazione.

La normalizzazione di tutti gli spettri di analisi con le concentrazioni cellulari alla luce dei risultati ottenuti poneva qualche perplessità in merito ad eventuale presenza nei campioni esaminati di cromofori appartenenti a cellule rotte o morte.

Gli esami di microscopia in fluorescenza hanno escluso questa remota possibilità evidenziando che, nelle immagini digitali relative agli esperimenti del Doe non hanno rilevato la presenza di fluorofori e cromofori esterni alle cellule.

I tempi di conservazione dei campioni sembrano aver giocato un ruolo fondamentale sui risultati ottenuti con l'impiego di questa tecnica, per cui si consiglia nei prossimi esperimenti di eseguire queste misure entro un'ora al massimo dal termine delle stimolazioni acustiche, in modo da ottenere maggiori informazioni.

Sarà interessante poter confrontare questi esami fluorimetrici con il metodo ossimetrico di misura dell'ossigeno molecolare liberato in acqua, rilevabile dal sensore Presens Fibox3 a fibra ottica in parte già impiegato in questa sperimentazione.

In Figura 1 è stato schematizzato il programma completo delle stimolazioni acustiche del Doe, in modo da evidenziare le diverse frequenze acustiche testate per durata e intensità relativa dei segnali riprodotti nei fbr, in modo da rendere paragonabili i diversi effetti osservati sulle intensità delle emissioni in fluorescenza dei campioni esaminati.

		Durata giornaliera delle Stimolazioni Acustiche del Doe										
		30 minuti	6,30 Ore	12,30 Ore								
Area delle Stimolazioni acustiche	100 Hertz	<table border="1"> <tr><td>Fbr 3</td></tr> <tr><td>100 Hz</td></tr> <tr><td>6</td></tr> <tr><td>30 min</td></tr> </table>	Fbr 3	100 Hz	6	30 min		<table border="1"> <tr><td>Fbr 7</td></tr> <tr><td>100 Hz</td></tr> <tr><td>6</td></tr> <tr><td>12,30 h</td></tr> </table>	Fbr 7	100 Hz	6	12,30 h
	Fbr 3											
	100 Hz											
6												
30 min												
Fbr 7												
100 Hz												
6												
12,30 h												
5 kHz + (Sweep 0,1-5 kHz)			<table border="1"> <tr><td>Fbr 5</td></tr> <tr><td>Sweep</td></tr> <tr><td>-25</td></tr> <tr><td>12,30 h</td></tr> </table>	Fbr 5	Sweep	-25	12,30 h					
Fbr 5												
Sweep												
-25												
12,30 h												
10 kHz	<table border="1"> <tr><td>Fbr 2</td></tr> <tr><td>10 kHz</td></tr> <tr><td>6</td></tr> <tr><td>30 min</td></tr> </table>	Fbr 2	10 kHz	6	30 min	<table border="1"> <tr><td>Fbr 9</td></tr> <tr><td>10.050 Hz</td></tr> <tr><td>1,5</td></tr> <tr><td>6,30 h</td></tr> </table>	Fbr 9	10.050 Hz	1,5	6,30 h		
Fbr 2												
10 kHz												
6												
30 min												
Fbr 9												
10.050 Hz												
1,5												
6,30 h												

Legenda:	 Primo esperimento del Doe	esempio:	<table border="1"><tr><td>Fbr</td></tr></table>	Fbr	Fbr
	Fbr				
 Secondo esperimento del Doe	<table border="1"><tr><td>100 Hz</td></tr><tr><td>6</td></tr><tr><td>30 min</td></tr></table>	100 Hz	6	30 min	Frequenza di lavoro Intensità rel. Strum. scala da -25 a +6 (min e max) durata stimolazione
100 Hz					
6					
30 min					

Figura 1: Programmi delle stimolazioni acustiche testate nel Doe. Nelle colonne è riportata la durata delle stimolazioni acustiche su base giornaliera: un solo ciclo di 30 minuti, 4 cicli da 30 minuti nell'intervallo di 6,30 ore e 7 cicli da 30 minuti nell'intervallo di 12,30 ore.

5.3.1 Misure allo Spettrofluorimetro dei campioni del primo esperimento del Doe

Nel primo esperimento del Doe, **il fbr 3** stimolato acusticamente alla **frequenza di 100 Hz** per un periodo **di 30 minuti al giorno** (Figura 2), al tempo T_6 (dopo 6 giorni dall'inizio dell'esperimento) ha una intensità ridotta della metà (0,1) nella lunghezza d'onda pari a 645/647 nm e quindi una maggiore presenza di clorofilla b (Chl *b*) rispetto al valore di avvio dell'esperimento T_0 (0,2). Questo valore di intensità nella regione delle Chl *b* è abbastanza altalenante durante l'avanzamento dell'esperimento in cui si osservano due punti di flesso con inversione tendenza decrescente in T_2 e T_5 .

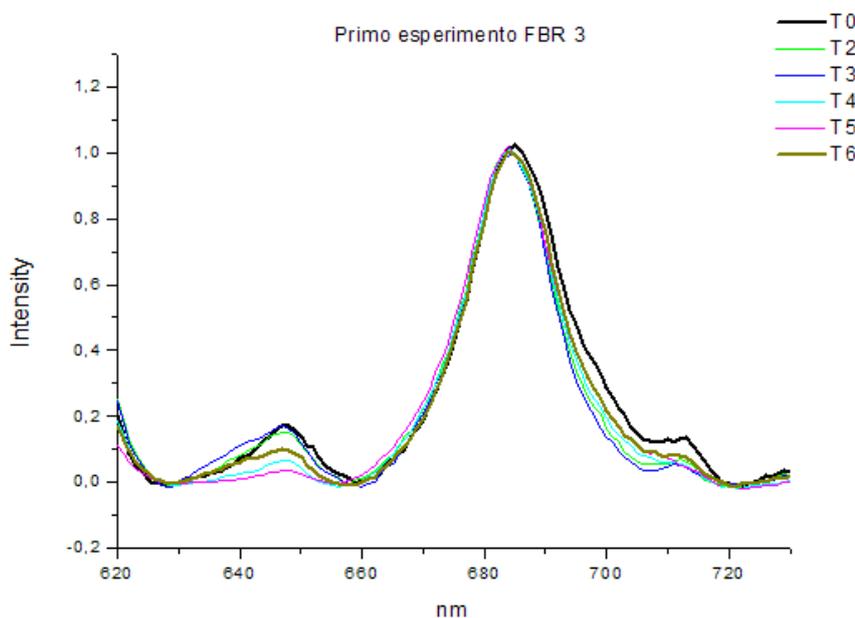


Figura 2: Analisi allo Spettrofluorimetro del campione di microalghe stimolato alla frequenza di **100 Hz** per **30 minuti al giorno** a intensità relativa massima **+6**. Nel grafico è stato normalizzato a 1 il valore di intensità rilevato alla lunghezza d'onda di 685 nm della Chl *a* durante l'avanzamento dell'esperimento da T_0 a T_6 , e sono emerse sostanziali modificazioni sull'ambiente delle Chl *b*, alla lunghezza d'onda di 645/647 nm.

Sempre in riferimento al primo esperimento del Doe, **il fbr 7** stimolato acusticamente alla **frequenza di 100 Hz per un periodo di 12,30 ore al giorno** (vedi Figura 3), al tempo T_6 (dopo 6 giorni dall'inizio dell'esperimento) ha una intensità circa cinque volte superiore (0,5) nella lunghezza d'onda pari a 645/647 nm e quindi una maggiore presenza di Chl *b* rispetto all'avvio dell'esperimento, T_0 .

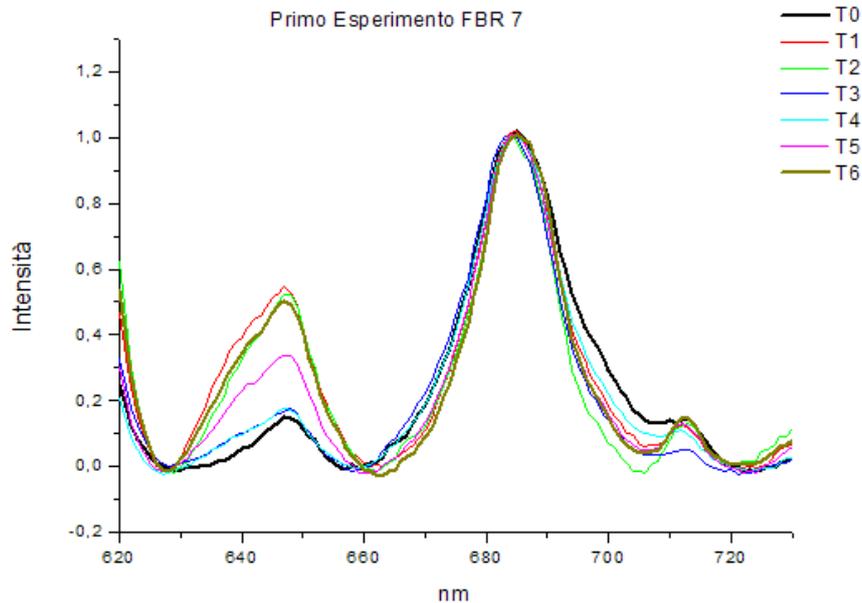


Figura 3: Analisi allo Spettrofluorimetro del campione di microalghe stimolato alla frequenza di **100 Hz** per **12,30 ore al giorno** a intensità relativa massima **+6**. Nel grafico è stato normalizzato a 1 il valore di intensità rilevato alla lunghezza d'onda di 685 nm della Chl *a* durante l'avanzamento dell'esperimento da T_0 a T_6 , e sono emerse sostanziali modificazioni sull'ambiente delle Chl *b*, alla lunghezza d'onda di 645/647 nm.

Un'inversione di tendenza si osserva al tempo T_3 , dove l'emissione in fluorescenza nella regione dello spettro delle Chl *b* subisce un rapido declino fino quasi a raggiungere il T_0 , per poi rimanere stabile nel T_4 . L'intensità di emissione in fluorescenza nella medesima regione dello spettro delle Chl *b* subisce quindi un rapido incremento dal T_5 e questo trend di crescita leggermente altalenante permane fino al T_6 .

Osservando il comportamento delle colture microalgali stimolate a bassa frequenza 100 Hz e con un'intensità relativa massima +6, quest'analisi ci dà le prime informazioni sulla modifica dell'ambiente delle Chl *b* in relazione alla durata delle stimolazioni giornaliere che sono state impiegate nei fbr 3 e 7.

Riassumendo, **alla frequenza di lavoro di 100 Hz e intensità relativa +6**, cicli giornalieri di stimolazioni acustiche pari a:

- 30' minuti provocano una **riduzione** dell'intensità di fluorescenza **del 50%**
- 12,30 ore provocano un **incremento** di intensità di fluorescenza **pari a 5 volte**

nella regione osservata delle Chl *b*.

Questa informazione sul comportamento osservato di una modifica sull'ambiente delle Chl *b* deve essere interpretata come un adattarsi della cellula alle diverse condizioni di stress prodotto non soltanto dalle oscillazioni meccaniche impresse dalle onde acustiche in acqua sulla membrana cellulare e sugli organi interni.

In queste colture in batch, occorre tenere conto soprattutto delle modificazioni dell'ambiente in cui le alghe si muovono e cioè nel terreno di coltura in cui vanno a depositarsi metaboliti e scarti cellulari che ne fanno variare le caratteristiche turbidimetriche nel trasferimento della luce.

Una modificazione così pronunciata nei pigmenti messa in atto dalle cellule microalgali potrebbe derivare dalla necessità di organizzarsi per catturare la quantità di fotoni necessaria ad attivare la conversione fotochimica.

L'incremento della crescita e della velocità nei diversi programmi di stimolazione in queste colture in batch, può determinare una diversa proporzione nel rapporto tra i sali presenti nel terreno: nitrati e fosfati e anche di vitamine.

Certamente, per questo motivo, come si è visto nel capitolo 4 Risultati e Discussione, in entrambi gli esperimenti, quello pilota e nel Doe, durante l'avanzamento delle colture si è manifestato un sensibile e rapido incremento nelle divisioni cellulari alle frequenze acustiche più basse nell'intervallo considerato, che è stato poi in parte raggiunto dopo diversi giorni sia dal controllo che dalle altre frequenze testate eccezion fatta per quelle limite dei 10 kHz ritenute poco efficienti.

Ad esempio, proprio in merito al funzionamento del fotosistema II in un'altra specie algale appartenente alla stessa famiglia della *Scenedesmus obliquus*, Kaftan et al., 1999 osservano che durante la fase iniziale di luce del fotoperiodo, la capacità fotosintetica delle cellule aumenta, mentre la concentrazione e l'attività dei centri di reazione del PSII rimane relativamente

costante. Questo tasso di efficienza fotosintetica viene mantenuto per un periodo pari a 3-4 ore e corrisponde ad una fase di rapida crescita delle colture cellulari.

Durante questo periodo in cui l'attività fotosintetica delle cellule è massima, si ha la massima espressività di efficienza del PSII. A seguire, una volta che la cellula ha accumulato riserve sufficienti per la divisione cellulare successiva, l'attività fotosintetica diminuisce e all'interno delle cellule avvengono profonde riorganizzazioni sulle membrane tilacoidali.

Durante questa fase, per le cellule non è prioritaria la fissazione energetica e pertanto inizia una riduzione dei centri di reazione del PSII, che assumerà il valore minimo durante la fase della divisione cellulare.

Al rapido incremento del tasso di evoluzione dell'ossigeno nelle prime due ore segue il lento declino fino all'inizio della fase al buio in cui ha inizio la divisione cellulare.

Sempre nel primo esperimento del Doe, **il fbr 9** stimolato acusticamente alla **frequenza di 10.050 Hz (10 kHz)** per un periodo **di 6,30 ore al giorno** (Figura 4), dopo 1 giorno dall'inizio dell'esperimento (T_1) raggiunge il massimo di intensità (0,2) nella lunghezza d'onda pari a 645/647 nm e quindi una maggiore presenza di Chl *b* rispetto al quarto giorno dall'avvio dell'esperimento (T_4) in cui l'intensità di emissione in fluorescenza è pari a 0,02.

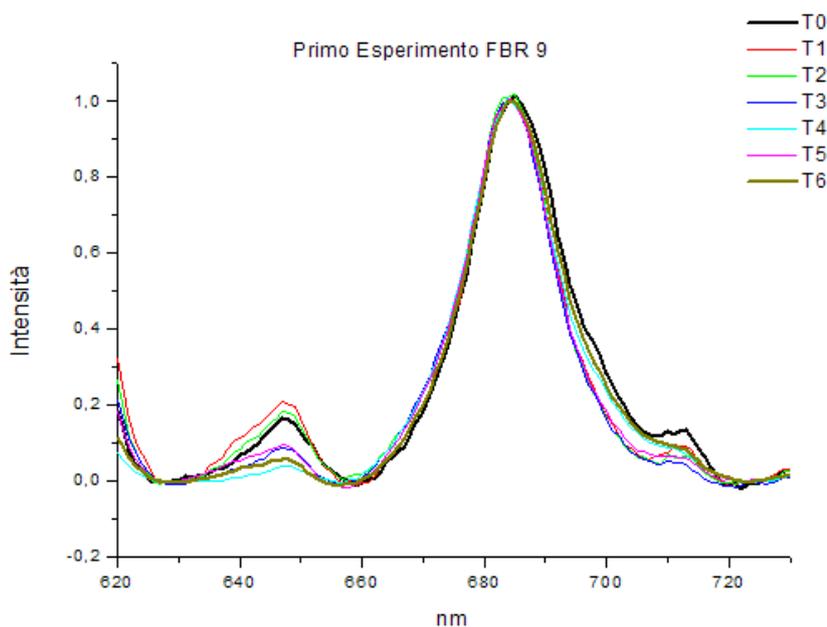


Figura 4: Analisi allo Spettrofluorimetro del campione di microalghe stimolato alla frequenza di 10.050 Hz (**10 kHz circa**) per **6,30 ore al giorno** a intensità relativa **+1,5**. Nel grafico è stato normalizzato a 1 il valore di intensità rilevato alla lunghezza d'onda di 685 nm della Chl *a* durante l'avanzamento dell'esperimento da T_0 a T_6 , e sono emerse sostanziali modificazioni sull'ambiente delle Chl *b*, alla lunghezza d'onda di 645/647 nm.

Il massimo valore di intensità dell'emissione in fluorescenza misurato nel fbr 9 pari a 0,2 dopo un giorno dall'inizio dell'esperimento, nel fbr 7 è stato di quasi tre volte superiore (ha superato 0,5) nonostante quest'ultimo abbia lavorato con una durata giornaliera delle stimolazioni acustiche del 50% circa.

Nel confronto tra i diversi programmi di stimolazione acustica nei fbr 9 e 3 per interpretare correttamente gli effetti più o meno evidenti bisogna considerare:

1. che la frequenza delle stimolazioni acustiche tra i due fbr è di un'ordine di grandezza superiore (0,1-10 kHz);
2. che il tempo di stimolazione (numero dei cicli) è inferiore del 50% circa;
3. che l'intensità relativa del segnale acustico che giunge nelle colture è ridotto di quattro volte rispetto al valore (+6) impiegato nel testare la frequenza 100 Hz.

Tenuto conto delle osservazioni sopra indicate, dalla lettura degli spettri in Figura 4, un'inversione di tendenza si osserva al tempo T_1 , dove l'emissione in fluorescenza nella regione dello spettro delle Chl *b* subisce un rapido declino fino quasi a raggiungere il T_4 , per poi subire un incremento nel T_5 e un declino fino al T_6 .

Questo valore di intensità nella regione delle Chl *b* qui è abbastanza altalenante durante l'avanzamento dell'esperimento. Si osservano due punti di inversione di tendenza decrescente in T_1 e T_5 , e questo comportamento è stato osservato per diversi valori di intensità di fluorescenza anche nel fbr 3 stimolato solo 30 minuti al giorno con un segnale acustico di frequenza 10 volte inferiore (100 Hz) e intensità relativa di segnale 4 volte superiore (+6).

Nelle diverse condizioni sperimentali il sistema risponde producendo più o meno clorofille di tipo diverso. Lo stimolo a cui corrispondono tutti quei valori di crescita (in intensità) modifica l'ambiente probabilmente provocando un'alterazione nella composizione dei centri di reazione. Non è chiaro però se questa modifica nella composizione dei centri di reazione che assorbono la luce è una necessità delle cellule per rispondere allo stress indotto dalle onde acustiche oppure se queste alterazioni dipendano dalla diversa composizione del terreno di coltura.

5.3.2 Misure allo Spettrofluorimetro dei campioni del secondo esperimento del Doe

Nel secondo esperimento del Doe, il **fbr 2** stimolato acusticamente alla **frequenza di 10 kHz** per un periodo di **30 minuti al giorno** (Figura 5), già all'avvio dell'esperimento (T_0) assume il livello massimo di intensità (0,4) nella lunghezza d'onda pari a 645/647 nm e quindi una maggiore presenza di Chl *b* che progressivamente diminuisce fino al terzo giorno dall'avvio dell'esperimento (T_3) con un valore prossimo allo zero. Poi risale a T_4 , per decrescere nuovamente fino ad azzerarsi di nuovo dopo sei giorni dall'inizio dell'esperimento (T_6).

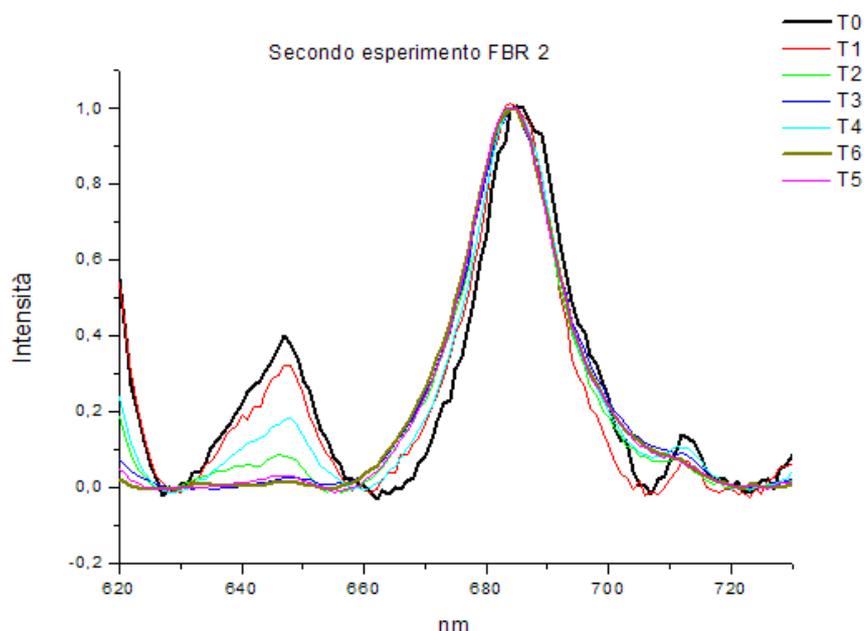


Figura 5: Analisi allo Spettrofluorimetro del campione di microalghe stimolato alla frequenza di 10.050 Hz (**10 kHz circa**) per **30 minuti al giorno** a intensità relativa massima **+6**. Nel grafico è stato normalizzato a 1 il valore di intensità rilevato alla lunghezza d'onda di 685 nm della Chl *a* durante l'avanzamento dell'esperimento da T_0 a T_6 , sono emerse sostanziali modificazioni sulle Chl *b*, alla lunghezza d'onda di 645/647 nm.

Nel fbr 2 il contributo in intensità nella banda delle Chl *b* durante l'avanzamento dell'esperimento, si è progressivamente ridotto, fino ad annullarsi.

Ciò che è stato osservato è il valore di intensità dell'emissione in fluorescenza già all'inizio dell'esperimento: al tempo T_0 assume il massimo valore (0,4) per poi annullarsi completamente.

Considerando, inoltre, che durante l'esperimento le forme spettrali della luce artificiale non sono cambiate, nè tanto meno l'intensità, diventa difficile spiegare come mai le cellule abbiano adattato le clorofille (riducendo la Chl *b* fino ad azzerarla), soprattutto in considerazione del fatto che la coltura ha ricevuto una sola stimolazione giornaliera di breve durata (solo 30 minuti), ma di frequenza pari ad un'ordine di grandezza più elevato rispetto al comportamento ottenuto a parità di programma (durata della stimolazione) e frequenza pari a soli 100 Hz.

Questo risultato induce a pensare al protocollo sperimentale con cui sono state eseguite queste misure allo Spettrofluorimetro. Il tempo di conservazione in frigo a (+4 °C) è stato più lungo per i campioni del Primo esperimento del Doe e questo potrebbe aver influito sul minore valore di intensità nei segnali di fluorescenza misurati a seguito di eccitazione del campione con lo Spettrofluorimetro. Infatti, proprio in merito alle capacità adattative delle specie microalgali sotto l'effetto della temperatura, Thompson, 1989 ha osservato un notevole cambiamento con un aumento di dieci volte del livello di fosfolipidi e la desaturazione degli acidi grassi nei cloroplasti con la produzione appunto di acido palmitico⁹ e acido oleico. Gli acidi grassi vengono prodotti dal cloroplasto e utilizzati da enzimi nel reticolo endoplasmatico per la formazione di fosfolipidi necessari alla produzione di membrane come azione adattativa di difesa a condizioni ambientali estreme dovute all'abbassamento della temperatura.

Il problema della conservazione avrebbe potuto essere, anche, una conseguenza delle condizioni estreme derivanti da assenza di luce, oltre che della bassa temperatura. Benengama et Goto, 2010 riferiscono in merito alla strategia adattativa di organismi fotosintetici in risposta a limitazione di luce. In particolare hanno evidenziato per la prima volta che l'alga unicellulare *Euglena gracilis*, risponde ai fenomeni adattativi della tolleranza shade con un aumento del rapporto tra Chl *a* / Chl *b*, contraddicendo l'ipotesi generalmente accettata della diminuzione di questo rapporto tra clorofille nell'adattamento a quantità di

⁹ Come si vedrà nel paragrafo successivo, sono state notate per gli stessi campioni la presenza dell'acido palmitico che potrebbe essere stato sintetizzato dalle membrane cellulari come fenomeno adattativo per garantire la vitalità dell'organismo cellulare alle condizioni estreme di bassa temperatura.

luce inferiore. Nel caso da noi osservato è accaduta la stessa cosa (aumento del rapporto) per la forte diminuzione della risposta in fluorescenza delle Chl *b* durante l'avanzamento delle colture. Conseguentemente all'aumento delle clorofille impiegate per la cattura di una maggiore quantità di fotoni, nei fenomeni adattativi queste cellule fotosintetiche rispondono con una diminuzione del tasso di crescita riducendo al minimo le proprie funzioni vitali per limitare il dispendio energetico (Anderson et al., 1995).

Nel secondo esperimento del Doe, **il fbr 5** stimolato acusticamente alla **frequenza Sweep lineare** (compreso nell'intervallo tra 0,1 e 6 kHz della durata di 10 secondi ciclicamente ripetuto) per un periodo **di 12,30 ore al giorno** (vedi Figura 6), già all'avvio dell'esperimento (T_0) assume il livello massimo di intensità (appena inferiore a 0,4) nella lunghezza d'onda pari a 645/647 nm e quindi una maggiore presenza di Chl *b* che progressivamente diminuisce fino al terzo giorno dall'avvio dell'esperimento (T_3) con un valore prossimo allo zero. Poi l'intensità dell'emissione in fluorescenza s'incrementa fino al quinto giorno dall'inizio dell'esperimento (T_5) per poi decrescere al termine dell'esperimento T_6 .

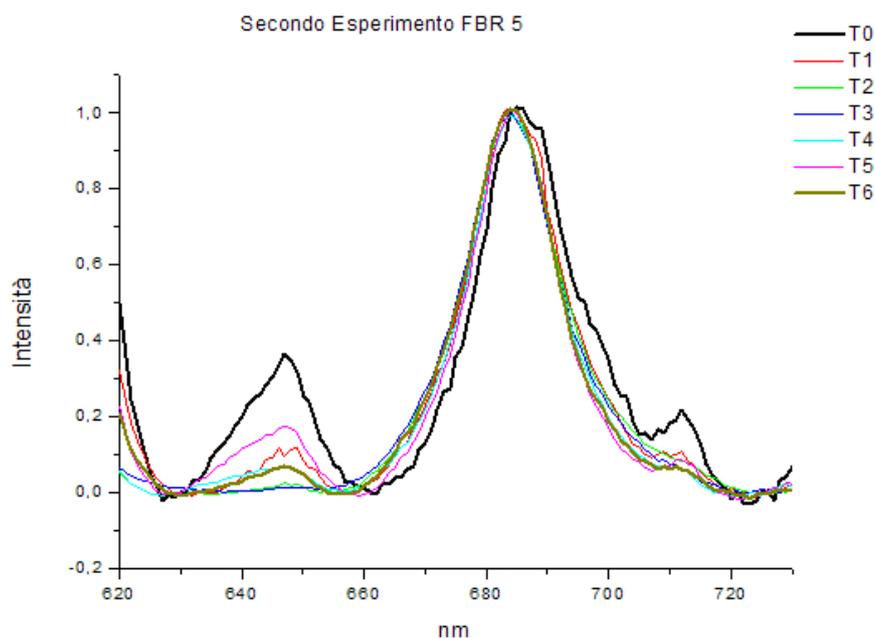


Figura 6: Analisi allo Spettrofluorimetro del campione di microalghe stimolato alla frequenza **Sweep lineare** da 100 Hz a 6 kHz **per 12,30 ore al giorno** e intensità relativa -25. Nel grafico è stato normalizzato a 1 il valore di intensità rilevato alla lunghezza d'onda di 685 nm della Chl *a* durante l'avanzamento dell'esperimento da T_0 a T_6 , sono emerse sostanziali modificazioni sulle Chl *b*, alla lunghezza d'onda di 645/647 nm.

Anche lo Sweep, riprodotto con una intensità di segnale acustico 5 volte inferiore rispetto all'esperimento pilota, ha evidenziato un comportamento simile a quello osservato con la frequenza di 10 kHz del fbr 2, con una riduzione complessiva del contributo in intensità nella banda delle Chl *b* durante l'avanzamento dell'esperimento, anche se in modo altalenante, raggiungendo la soglia limite al tempo T_3 e poi T_6 .

Nel secondo esperimento del Doe, **il fbr 7** stimolato acusticamente alla **frequenza di 4.950 Hz** per un periodo **di 6,30 ore al giorno** (vedi Figura 7), già all'avvio dell'esperimento (T_0) assume il livello massimo di intensità (appena inferiore a 0,3) nella lunghezza d'onda pari a 645/647 nm e quindi una maggiore presenza di Chl *b* che progressivamente diminuisce dal primo giorno dall'inizio dell'esperimento fino al terzo giorno (T_3). Poi dal quarto giorno il valore dell'intensità continua a diminuire.

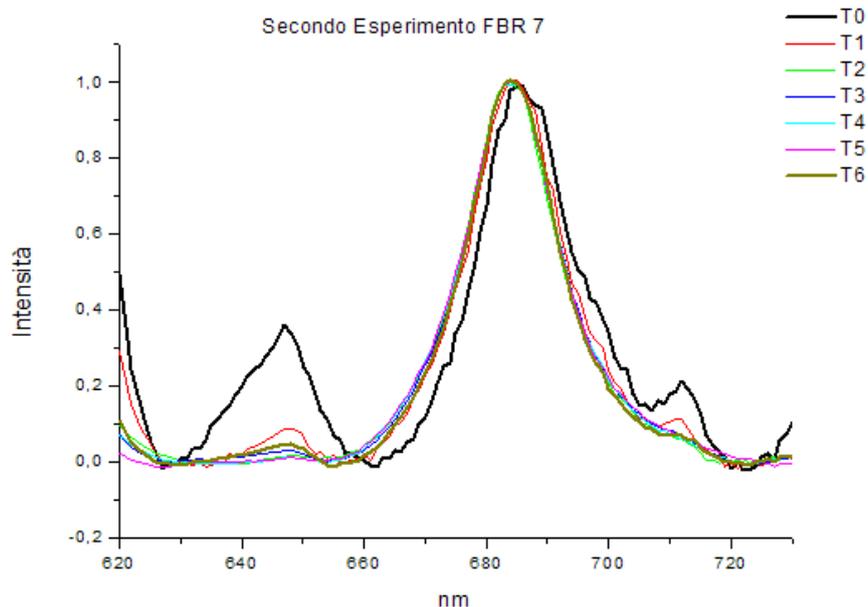


Figura 7: Analisi allo Spettrofluorimetro del campione di microalghe stimolato alla frequenza di **4.950 Hz** per **6,30 ore al giorno** a intensità relativa **+1,5**. Nel grafico è stato normalizzato a 1 il valore di intensità rilevato alla lunghezza d'onda di 685 nm della Chl *a* durante l'avanzamento dell'esperimento da T_0 a T_6 , sono emerse sostanziali modificazioni sulle Chl *b*, alla lunghezza d'onda di 645/647 nm.

Anche alla frequenza di 4.950 Hz, sono stati osservati importanti riduzioni sull'intensità dei segnali di fluorescenza misurati dallo Spettrofluorimetro, con le stesse progressioni di riduzione delle Chl *b* come nel fbr 2 a 10 kHz, ma l'informazione che qui si ottiene e' in accordo con quanto è emerso dal disegno fattoriale e cioè della mancanza di una dipendenza dal tempo dei programmi di stimolazione, essendo le alte frequenze preponderanti rispetto ad esso forse per gli effetti di leggera inibizione sulla crescita.

5.4 Le analisi con il fluorimetro portatile AquaPen AP 100 (Photon System Instruments)

Con il fluorimetro portatile AquaPen sono state acquisite importanti informazioni sulle energie degli stati emissivi mediante le misure con il protocollo OJIP con il quale è stato possibile determinare l'efficienza fotosintetica delle microalghe sottoposte a diversi programmi di stimolazione acustica.

In particolare, le analisi fluorimetriche sono state eseguite su campioni prelevati durante l'avanzamento delle colture microalgali, cercando di acquisire informazioni prima e subito dopo la prima stimolazione acustica della durata di 30 minuti per ciascun fbr, alla ricerca di eventuali variazioni sull'efficienza fotosintetica da attribuire alla perturbazione sonora.

Durante le attività sperimentali, sono state provate le diverse funzionalità dello strumento, riuscendo a collezionare un rilevante dataset di misure sperimentali. Dall'elaborazione dei dati ottenuti, in questa fase intermedia delle attività sperimentali, in cui l'obiettivo principale era quello di riuscire ad individuare le stimolazioni acustiche più performanti per incrementare le cinetiche di crescita della *Scenedesmus obliquus*, si è deciso di impiegare il protocollo OJIP, poiché la sua rapidità di effettuazione consentiva di ottenere velocemente le informazioni sull'efficienza dei processi fotosintetici relativamente ai 9 fbr stimolati acusticamente.

Queste misure sono state effettuate con un ritardo massimo di 5 minuti dalla cessazione dello stimolo acustico. L'idea era quella di capire se le vibrazioni, trasmesse in acqua, avessero in qualche modo favorito la penetrazione della luce nel mezzo di coltura e se le cellule stimulate fossero state in grado di incrementare la loro efficienza.

In proposito sono stati presi accordi con il Prof. James Barber dell'Imperial College di Londra presso il suo laboratorio in Italia: il BioSolar Lab di Alessandria dove la responsabile la Dott.ssa Cristina Pagliano era in attesa di ricevere i tilacoidi estratti dai campioni di microalghe esposti a diversi programmi di stimolazione acustica per valutarne l'efficienza fotosintetica del fotosistema II con la tecnica di evoluzione dell'ossigeno.

L'intenzione era infatti quella di utilizzare i risultati ottenuti per confermare o escludere che gli effetti positivi sulla crescita algale riscontrati in seguito alle stimolazioni acustiche.

In questo caso, l'incremento del rapporto superficie/volume offerto dal maggior numero di cellule capaci di attivare i propri fotosistemi di conversione dell'energia luminosa, avrebbe ha senza dubbio favorito la penetrazione della luce nella coltura, incrementando l'efficienza

fotosintetica. E' importante ricordare che le analisi allo Scepter confermano la riduzione degli aggregati cellulari nelle cellule trattate con i programmi acustici di stimolazione.

Nell'effettuazione dei prelievi e delle misure di fluorimetria con l'AquaPen è stata posta particolare attenzione al tempo intercorso tra l'inizio delle stimolazioni acustiche, autoregolato nel valore di 1,30 ore in modo tale che il programma delle stimolazioni acustiche della durata di 12,30 h fosse stato ricompreso solo nella fase di luce in accordo con quanto individuato da altri autori (Cai et al., 2013; Jiang et al., 2012; Weinberger and Das, 1972) e da Kaftan¹⁰ et al, 1999.

Queste osservazioni trovano conferma nel rapido incremento del tasso di evoluzione dell'ossigeno nelle prime due ore con il lento declino fino all'inizio della fase al buio in cui ha inizio la divisione cellulare.

Per una migliore comprensione dei risultati, sono stati messi a confronto gli spettri misurati prima (Pre) e dopo (Post) la stimolazione acustica, scelti in un intervallo ampio di frequenza e di durata delle stimolazioni: 0,1 – 5 e 10 kHz in cui sono state ottenute risposte diverse tra di loro per quanto riguarda il rate di crescita, il numero e le dimensioni delle cellule stimulate. In pratica l'AquaPen nel protocollo di misura impiegato OJIP: consente di misurare la fluorescenza transitoria emessa dalla clorofilla con un elevato irraggiamento di luce. Con questa funzionalità è possibile monitorare nel tempo l'efficienza.

Partendo da campioni adattati al buio per 10 minuti circa, dopo il primo flash di luce saturante, la fluorescenza del PSII aumenta con una cinetica trifasica O-J, J-I e I-P; Le tre fasi sono state interpretate in questo modo: la fase (O-J) corrisponde a una riduzione completa dell'accettore primario di elettroni QA del PSII, il rilascio di quenching di fluorescenza durante la fase (J-I) è controllato dal donatore di elettroni del PSII (attività water-splitting) e la terza fase (I-P) corrisponde al rilascio di quenching di fluorescenza da lpool di plastochinone ossidato. In questo modo la fase di fluorescenza (J-I) è un utile indicatore dell'attività di water-splitting, in cui viene raggiunta la massima intensità di fluorescenza subito dopo inizia il lento decadimento.

Nei 4 step di misura del protocollo OIJP, partendo dal flash saturante F_0 della durata di 50 μ s, lo strumento in questo protocollo di misura rileva l'intensità di fluorescenza F_j a 2 ms, F_i a 60 ms.

¹⁰ Considerazioni dell'autore già indicate nel precedente paragrafo 5.2.2

Dal raffronto tra le misure effettuate in ciascun fbr prima della stimolazione acustica e al termine del primo ciclo giornaliero della durata di 30 minuti, generalmente è stata osservata una riduzione nel valore di intensità della fluorescenza massima al termine della stimolazione acustica.

La curva di induzione della fluorescenza nelle clorofille ha esibito la forma Ojip tipica delle microalghe verdi (Strasser et al., 2000 - Schansker et al., 2005)

La curva di induzione della fluorescenza partendo dal valore minimo di fluorescenza F_0 (O) raggiunge il massimo valore della fluorescenza F_m (P) attraversando di punti di flessione intermedi J e I, con la conseguente fluorescenza transitoria OIJP (Strasser et al. 1995).

OJIP Test - Legenda parametri fotosintetici	
Bckg	Background
F ₀	F ₀ = F _{50μs} , fluorescence intensity at 50 μs
F _j	F _j = fluorescence intensity at J-step (at 2 ms)
F _i	F _i = fluorescence intensity at i-step (at 60 ms)
F _m	F _m = maximal fluorescence intensity
F _v	F _v = F _m - F ₀ (maximal variable fluorescence)
V _j	Rendimento della fluorescenza indotta $V_j = (F_j - F_0) / (F_m - F_0)$
V _i	Rendimento della fluorescenza indotta $V_i = (F_i - F_0) / (F_m - F_0)$
F _m /F ₀	
F _v /F ₀	
F_v/F_m	Variazioni nell'efficienza fotonica del fotosistema II (PSII) $(F_m - F_0) / F_m$
M ₀	$M_0 = TR_0 / RC - ET_0 / RC = 4 (F_{300} - F_0) / (F_m - F_0)$
Area	Area between fluorescence curve and F _m (background subtracted)
Fix Area	Area below the fluorescence curve between F _{40μs} and F _{1s} (background subtracted)
S _m	$S_m = Area / (F_m - F_0)$ (multiple turn-over)
S _s	S _s = the smallest S _m turn-over (single turn-over)
N	$N = S_m \cdot M_0 \cdot (1 / V_j)$ turn-over number QA
Phi_P ₀	$\Phi_{P_0} = 1 - (F_0 / F_m)$ (or F_v / F_m)
Psi_o	$\Psi_o = 1 - V_j$
Phi_E ₀	$\Phi_{E_0} = (1 - (F_0 / F_m)) \cdot \Psi_o$
Phi_D ₀	$\Phi_{D_0} = 1 - \Phi_{P_0} - (F_0 / F_m)$
Phi_P _{av}	$\Phi_{P_{av}} = \Phi_{P_0} (S_m / t_{FM})$ t _{FM} = time to reach F _m (in ms)
Pi_Abs	
ABS/RC	$ABS / RC = M_0 \cdot (1 / V_j) \cdot (1 / \Phi_{P_0})$
TR ₀ /RC	$TR_0 / RC = M_0 \cdot (1 / V_j)$
ET ₀ /RC	$ET_0 / RC = M_0 \cdot (1 / V_j) \cdot \Psi_o$
DI ₀ /RC	$DI_0 / RC = (ABS / RC) - (TR_0 / RC)$

Figura 8: OJIP Legenda dei parametri fotosintetici.

Parametri di fluorescenza

- F₀ Resa minima di fluorescenza in campioni adattati al buio.
Livello di fluorescenza ottenuto quando tutti i QA sono ossidati e tutti i centri di reazione del PSII sono aperti. I processi non fotochimici sono minimizzati.
- F_m Resa massima di fluorescenza in campioni adattati al buio.
Livello di fluorescenza ottenuto quando tutti i QA sono ridotti ed i centri di reazione del PSII sono chiusi.
- F_v / F_m Efficienza quantica potenziale del PSII. Fluorescenza variabile su fluorescenza massima.
Efficienza dei complessi antenna del PSII nell'assorbire la luce e convertirla in energia chimica (QA ridotti).
- V_j o V_i sono i rendimenti della fluorescenza indotta della Chl *a*
- F₀/F_m indicatore dello stato fisiologico che oscilla tra 0 e 1

5.4.1 Le curve di induzione della fluorescenza delle clorofille con l'OJIP test AquaPen delle microalghe *S. obliquus* dopo due giorni dall'inizio del secondo esperimento del Doe

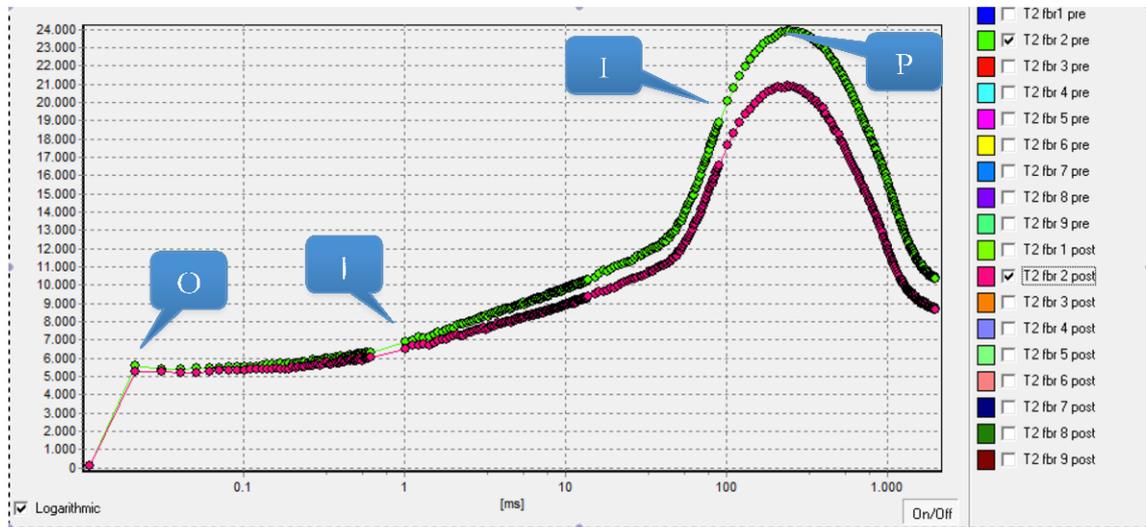


Figura 9: Effetto di induzione della fluorescenza delle microalghe **nel fbr 2** prima (curva di colore verde) e subito dopo la stimolazione acustica (curva di colore rosa) **della durata di 30 minuti**, alla frequenza di **10.050 Hz** (10 kHz circa per 30 minuti giornalieri a intensità relativa massima +6). Le misure sono state eseguite con il protocollo OJIP ed espresse in scala logaritmica. In ordinata valore relativo dell'intensità di fluorescenza.

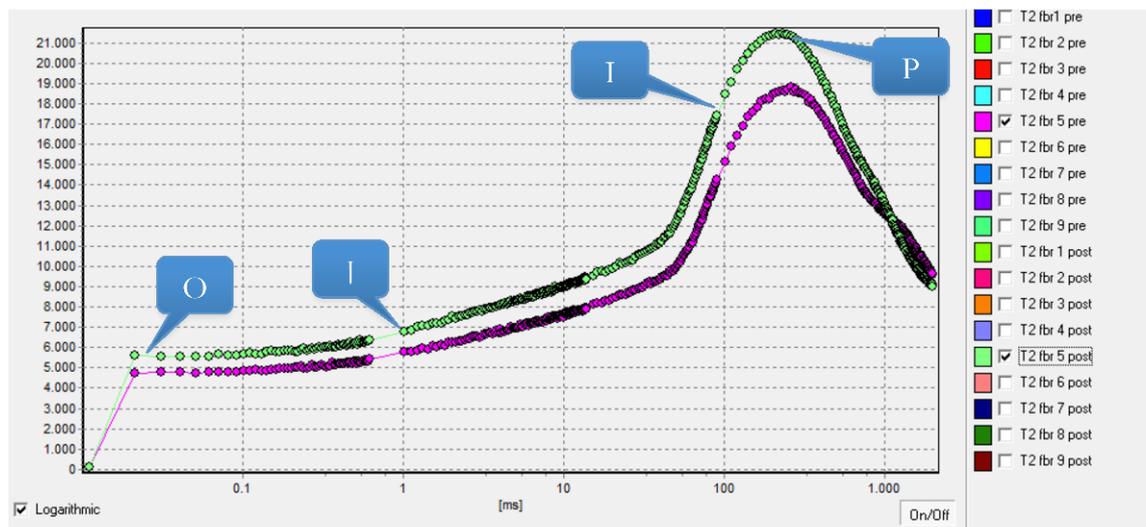
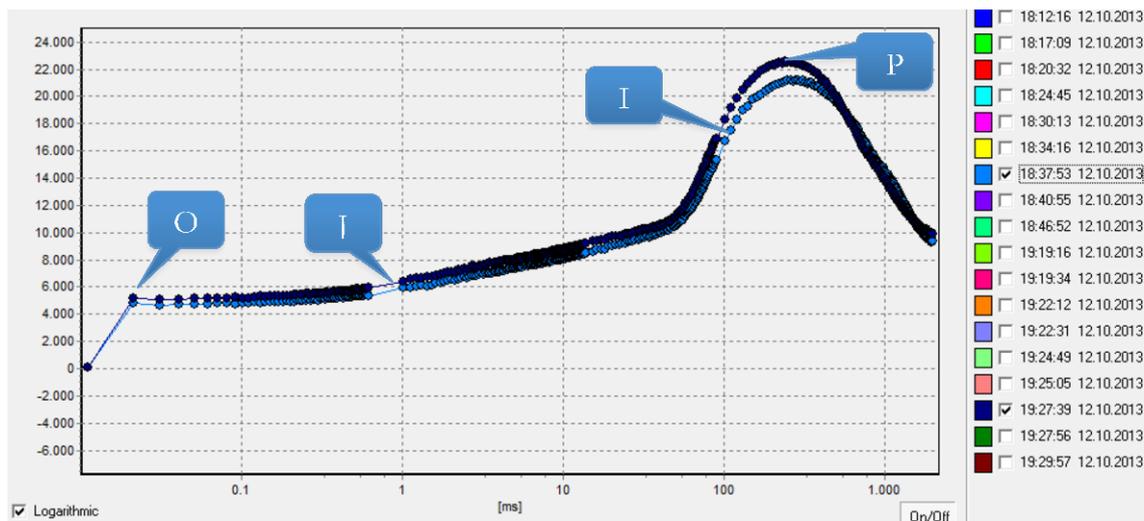


Figura 10: Effetto di induzione della fluorescenza delle microalghe **nel fbr 5** prima (curva di colore verde) e subito dopo la stimolazione acustica (curva di colore rosa) **della durata di 30 minuti** alla frequenza **Sweep lineare** (da 100 Hz a 6 kHz per 12,30 ore al giorno a intensità relativa -25). Le misure sono state eseguite con il protocollo OJIP ed espresse in scala logaritmica. In ordinata valore relativo dell'intensità di fluorescenza.



l'figura 11: Effetto di induzione della fluorescenza delle microalghe **nel fbr 7** prima (curva di colore verde) e subito dopo la stimolazione acustica (curva di colore rosa) **della durata di 30 minuti** alla frequenza di **(4.950 Hz** per 6,30 ore al giorno a intensità relativa **+1,5**). Le misure sono state eseguite con il protocollo OJIP ed espresse in scala logaritmica. In ordinata valore relativo dell'intensità di fluorescenza.

Da questi esami sui fbr 2, 5 e 7 del secondo esperimento del Doe, si è generalmente osservata una diminuzione dell'intensità massima di fluorescenza al termine del primo ciclo di stimolazione acustica emerso.

Ovviamente, dalle curve di induzione della fluorescenza, i campioni stimolati lo sweep acustico (impiegato per 12,50 ore al giorno nel fbr 2) hanno evidenziato valori inferiori di intensità di fluorescenza lungo tutti i tratti della curva OJIP, ma questa informazione da sola non è in grado di chiarire se, ad una riduzione della fluorescenza corrisponde in realtà un incremento di efficienza fotosintetica visto che tra i due processi in antagonismo tra loro, bisogna considerare anche i fenomeni dissipativi di calore.

Sono stati quindi elaborati i dati collezionati con il fluorimetro AquaPen nel corso dell'avanzamento dell'esperimento dal T_2 al T_{10} (vedi Tabelle dalla 1 alla 5) relativi sempre alle misure effettuate prima e subito dopo la prima stimolazione acustica giornaliera e sono stati espressi in forma grafica Spider-plot i parametri di fluorescenza indotta e resa quantica, e quelli fotosintetici del PSII, normalizzandoli al valore iniziale (pre) stimolazione.

OJIP TEST T2 Secondo esperimento del Doe						
	T2 fbr 2pre	T2 fbr2post	T2 fbr 5pre	T2 fbr 5post	T2 fbr 7pre	T2 fbr 7post
Bckg	99	109	109	119	119	119
Fo	5314	5085	4686	5434	4566	4995
Fj	7488	7109	6122	7388	6431	6999
Fi	11555	10359	8844	10439	9452	10030
Fm	23819	20818	18694	21336	21077	22482
Fv	18505	15733	14008	15902	16511	17487
Vj	0.117	0.129	0.103	0.123	0.113	0.115
Vi	0.337	0.335	0.297	0.315	0.296	0.288
Fm/Fo	4482	4094	3989	3926	4616	4501
Fv/Fo	3482	3094	2989	2926	3616	3501
Fv/Fm	0.777	0.756	0.749	0.745	0.783	0.778
Mo	0.099	0.101	0.083	0.110	0.073	0.091
Area	4587561	4036230	3895270	3964644	5358964	4206423
Fix Area	19873512	16603937	15060837	16782502	17585966	17977021
Sm	247909	256545	278075	249317	324569	240546
Ss	1184	1268	1242	1115	1554	1256
N	209366	202296	223854	223543	208838	191572
Phi_Po	0.777	0.756	0.749	0.745	0.783	0.778
Psi_o	0.883	0.871	0.897	0.877	0.887	0.885
Phi_Eo	0.686	0.659	0.673	0.654	0.695	0.689
Phi_Do	0.223	0.244	0.251	0.255	0.217	0.222
Phi_Pav	797120	802421	796458	802256	815916	774361
Pi_Abs	24064	20085	24361	17364	34573	26417
ABS/RC	1087	1043	1074	1203	0.821	1024
TRo/RC	0.845	0.789	0.805	0.897	0.643	0.796
ETo/RC	0.745	0.687	0.722	0.786	0.571	0.705
DLo/RC	0.243	0.255	0.269	0.306	0.178	0.227

Tabella 1: OJIP test effettuato dopo due giorni (T_2) dall'inizio dell'esperimento nei fbr 2,5,7 prima (pre) e al termine (post) della prima stimolazione acustica giornaliera della durata di 30 minuti, del secondo esp. del Doe.

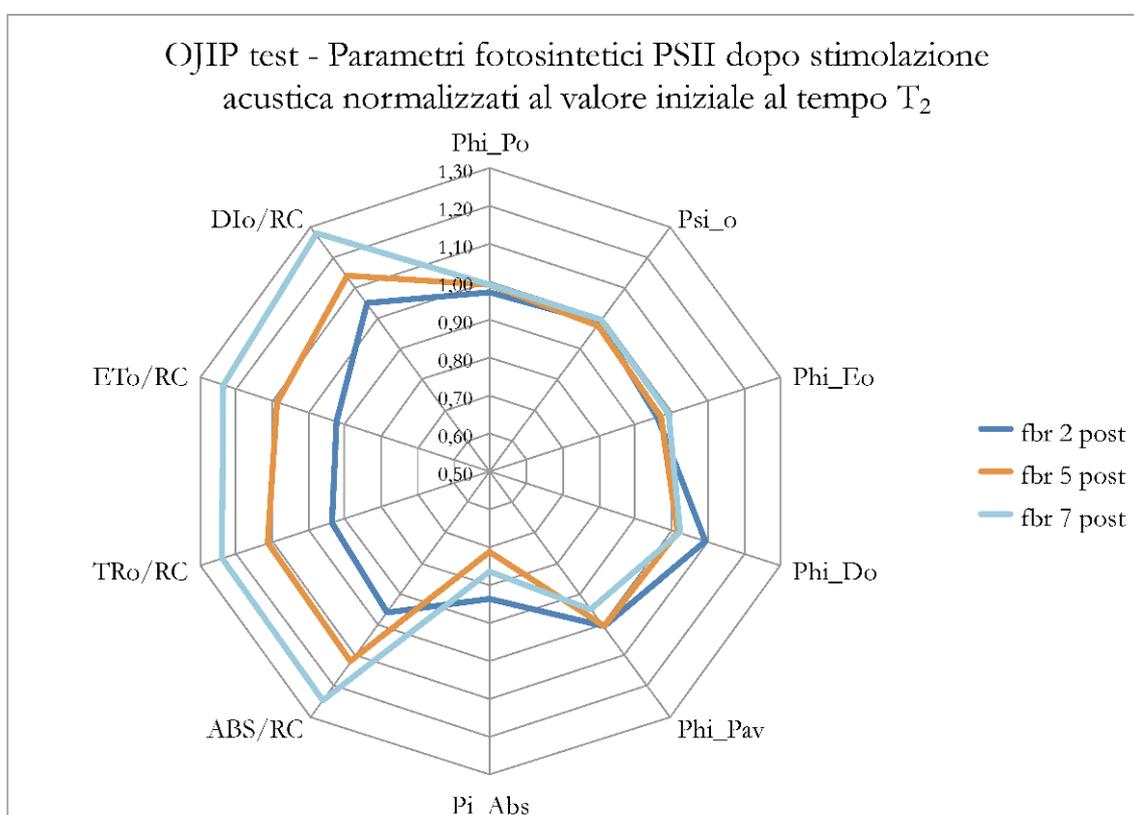
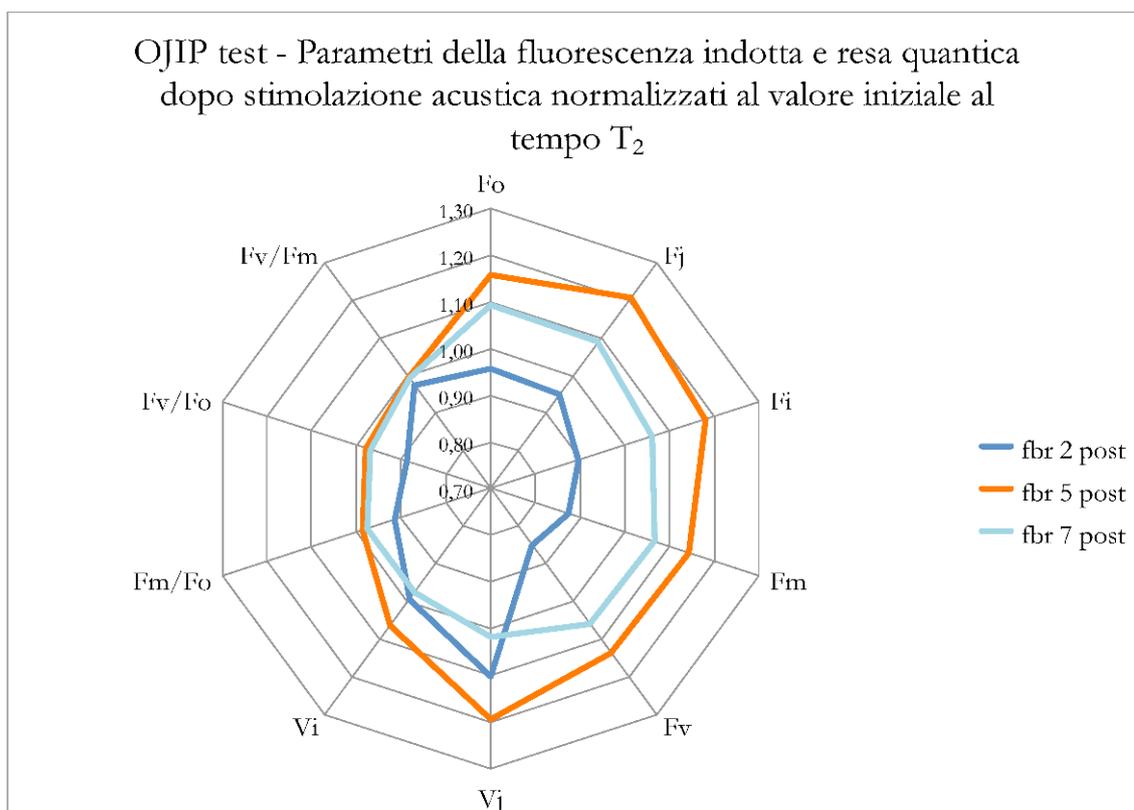


Figura 12: Spider-plot relativi ai parametri di fluorescenza indotta e resa quantica, e parametri fotosintetici del PSII, osservati dalle analisi AquaPen con il protocollo OJIP dopo due giorni dall'inizio dell'esperimento. I valori indicati sono stati normalizzati al valore iniziale (pre) stimolazione.

5.4.2 I dati di induzione della fluorescenza delle clorofille con l'OJIP test AquaPen delle microalghe *S. obliquus* dopo tre, cinque e otto giorni dall'inizio del secondo esperimento del Doe

OJIP TEST T3 Secondo esperimento del Doe						
	T3 fbr2 pre	T3 fbr2 post	T3 fbr5 pre	T3 fbr5 post	T3 fbr7 pre	T3 fbr7 post
Bckg	97	130	130	119	130	130
Fo	6827	6729	7022	5633	7087	7802
Fj	9558	8908	9590	7508	9070	10241
Fi	14142	13036	13979	10698	12809	14662
Fm	27277	24610	26789	21127	27439	29422
Fv	20450	17881	19767	15494	20352	21620
Vj	0.134	0.122	0.130	0.121	0.097	0.113
Vi	0.358	0.353	0.352	0.327	0.281	0.317
Fm/Fo	3995	3657	3815	3751	3872	3771
Fv/Fo	2995	2657	2815	2751	2872	2771
Fv/Fm	0.750	0.727	0.738	0.733	0.742	0.735
Mo	0.102	0.109	0.125	0.108	0.089	0.114
Area	4633954	4158751	4061944	3373562	5275407	4643250
Fix Area	22529686	19974397	21706639	16286005	22240347	23696601
Sm	226599	232579	205491	217733	259208	214766
Ss	1310	1116	1039	1119	1090	0.987
N	172916	208350	197809	194625	237902	217672
Phi_Po	0.750	0.727	0.738	0.733	0.742	0.735
Psi_o	0.866	0.878	0.870	0.879	0.903	0.887
Phi_Eo	0.650	0.638	0.642	0.645	0.669	0.652
Phi_Do	0.250	0.273	0.262	0.267	0.258	0.265
Phi_Pav	802780	798532	791287	791982	795707	782734
Pi_Abs	19094	15531	14452	16392	21498	15800
ABS/RC	1018	1233	1305	1219	1237	1379
TRO/RC	0.763	0.896	0.963	0.894	0.918	1014
ETo/RC	0.661	0.787	0.838	0.786	0.828	0.899
DIO/RC	0.255	0.337	0.342	0.325	0.320	0.366

Tabella 2: OJIP test effettuato dopo tre giorni (T_3) dall'inizio dell'esperimento nei fbr 2,5,7 prima (pre) e al termine (post) della prima stimolazione acustica giornaliera della durata di 30 minuti, del secondo esp. del Doe.

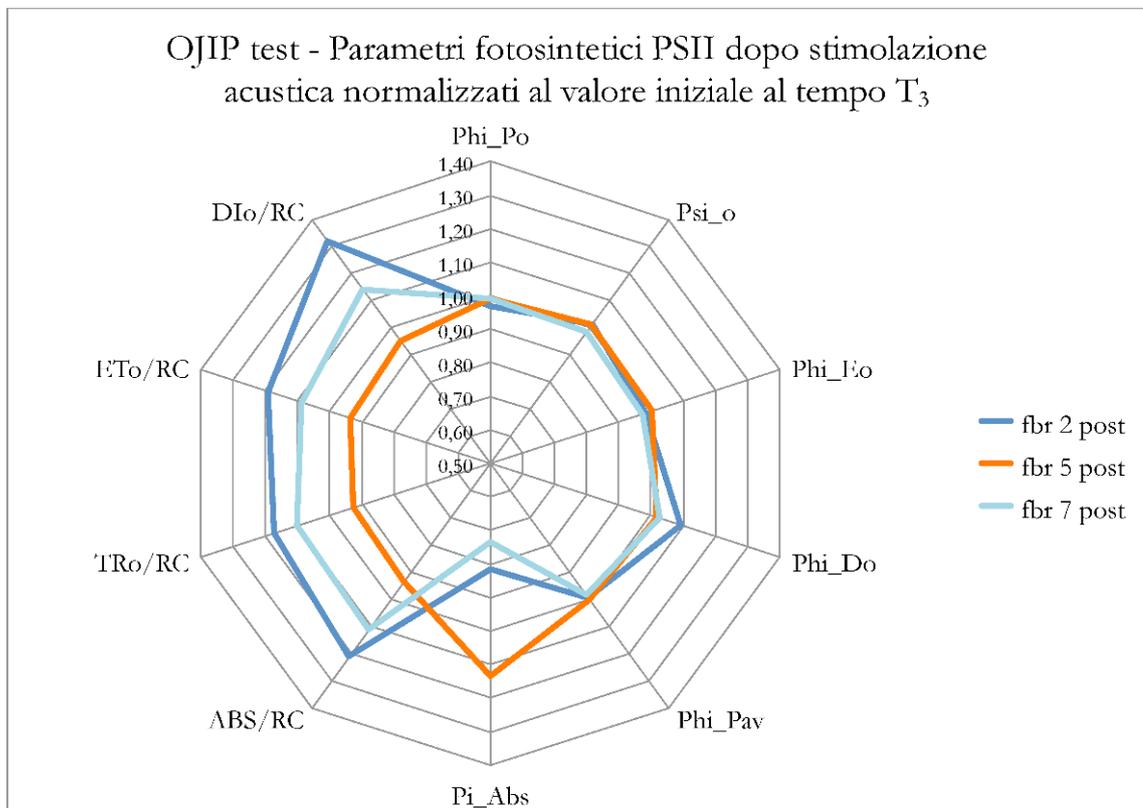
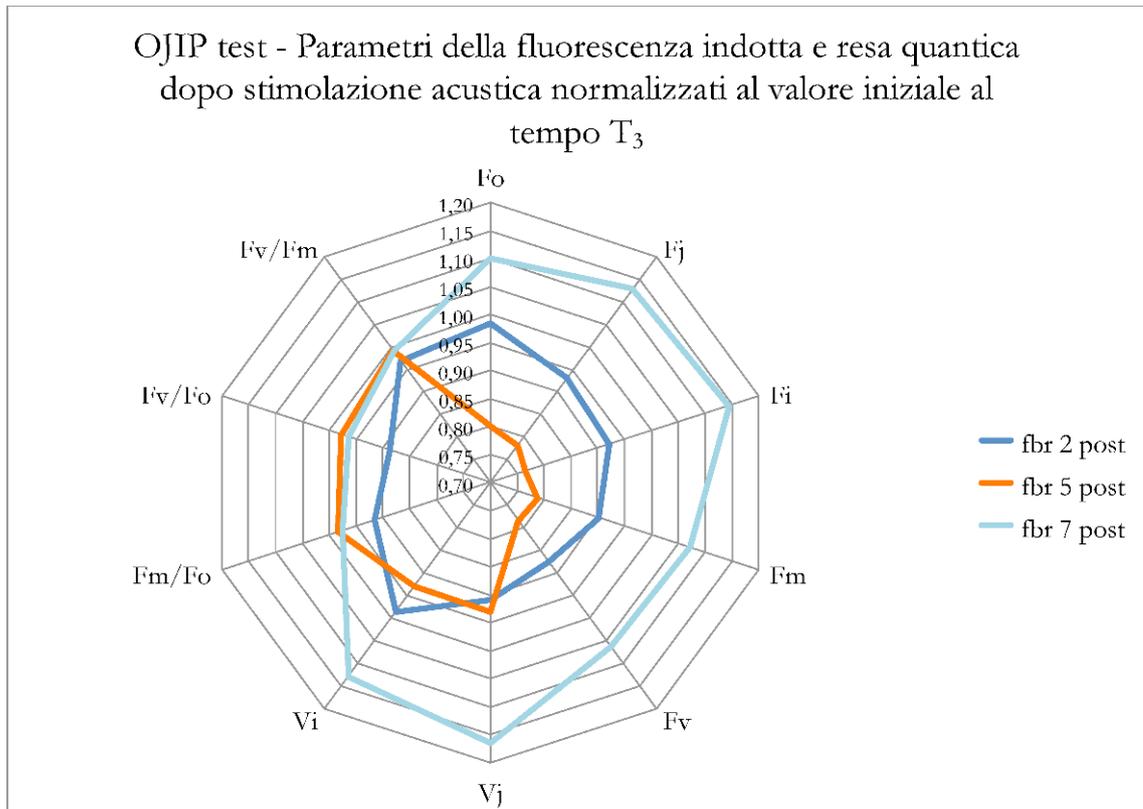


Figura 13: Spider-plot relativi ai parametri di fluorescenza indotta e resa quantica, e parametri fotosintetici del PSII, osservati dalle analisi AquaPen con il protocollo OJIP dopo tre giorni dall'inizio dell'esperimento. I valori indicati sono stati normalizzati al valore iniziale (pre) stimolazione.

OJIP TEST T5 Secondo esperimento del Doe						
	T5 fbr2 pre	T5 fbr2 post	T5 fbr5 pre	T5 fbr5 post	T5 fbr7 pre	T5 fbr7 post
Bckg	130	130	130	130	130	130
Fo	8225	7770	7835	8225	9525	9688
Fj	11086	10175	10533	11118	12484	12581
Fi	15702	14467	14987	15637	17913	17751
Fm	31795	28154	30397	30105	35892	34786
Fv	23570	20384	22562	21880	26367	25098
Vj	0.121	0.118	0.120	0.132	0.112	0.115
Vi	0.317	0.329	0.317	0.339	0.318	0.321
Fm/Fo	3866	3623	3880	3660	3768	3591
Fv/Fo	2866	2623	2880	2660	2768	2591
Fv/Fm	0.741	0.724	0.742	0.727	0.735	0.721
Mo	0.105	0.115	0.104	0.137	0.104	0.109
Area	5630506	4933431	4783009	4254888	6005285	5505635
Fix Area	25312222	21857502	23961559	23399934	28182480	26936925
Sm	238884	242025	211994	194465	227758	219365
Ss	1157	1028	1153	0.967	1083	1059
N	206404	235483	183864	201119	210285	207157
Phi_Po	0.741	0.724	0.742	0.727	0.735	0.721
Psi_o	0.879	0.882	0.880	0.868	0.888	0.885
Phi_Eo	0.651	0.639	0.653	0.631	0.652	0.638
Phi_Do	0.259	0.276	0.258	0.273	0.265	0.279
Phi_Pav	799057	790675	780431	778186	790637	784995
Pi_Abs	17797	14594	18144	12269	17424	15192
ABS/RC	1166	1344	1168	1423	1257	1309
TRo/RC	0.864	0.973	0.867	1034	0.923	0.944
ETo/RC	0.759	0.858	0.764	0.897	0.820	0.835
DLo/RC	0.302	0.371	0.301	0.389	0.334	0.365

Tabella 3: OJIP test effettuato dopo cinque giorni (T_5) dall'inizio dell'esperimento nei fbr 2,5,7 prima (pre) e al termine (post) della prima stimolazione acustica giornaliera della durata di 30 minuti, del secondo esp. del Doe.

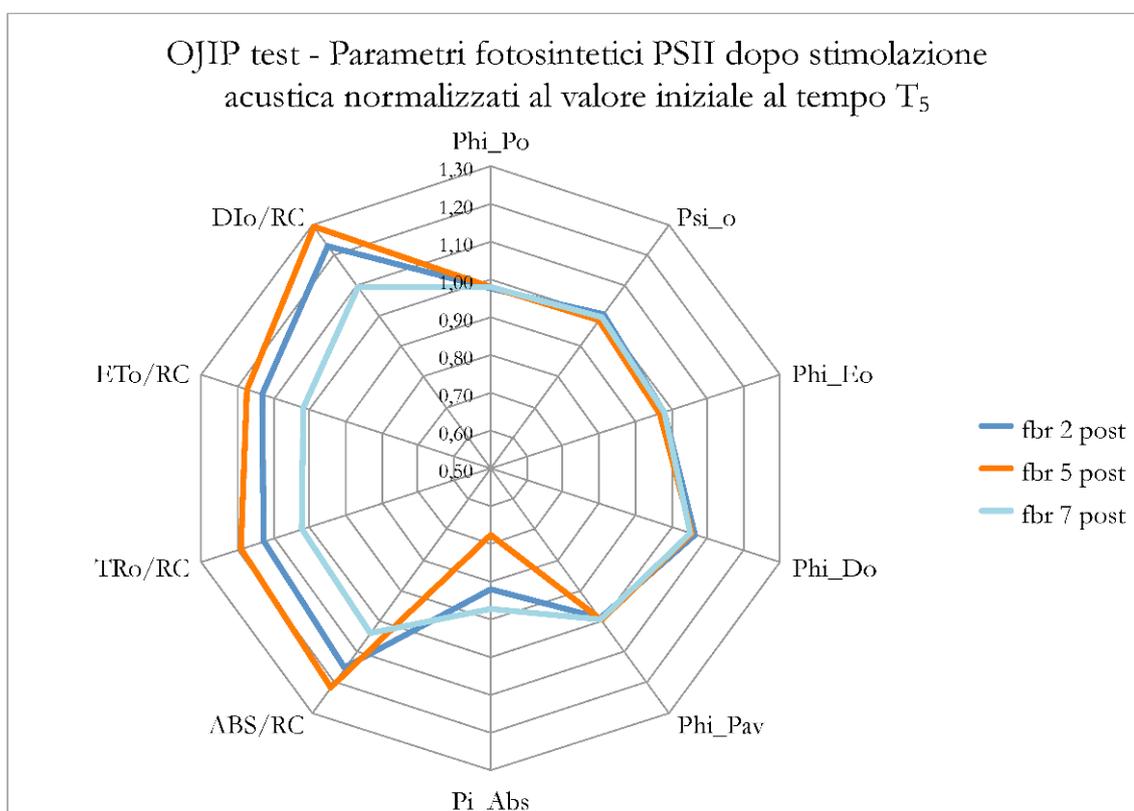
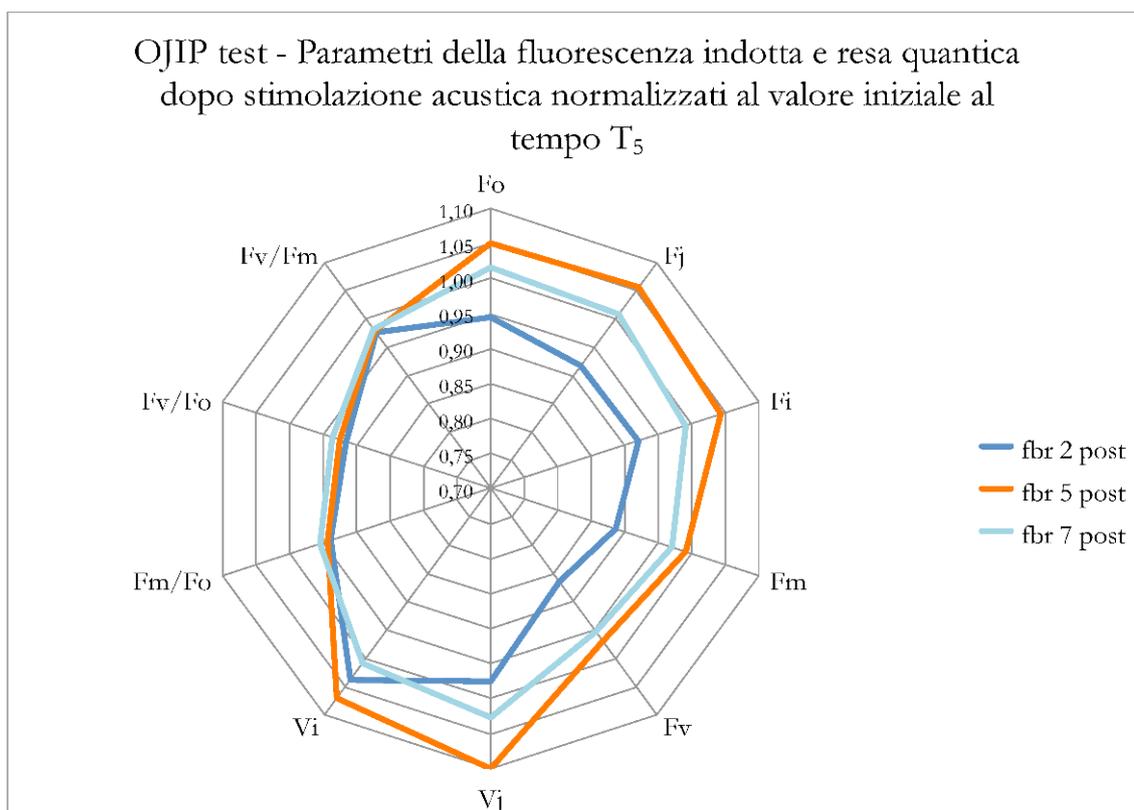


Figura 14: Spider-plot relativi ai parametri di fluorescenza indotta e resa quantica, e parametri fotosintetici del PSII, osservati dalle analisi AquaPen con il protocollo OJIP dopo cinque giorni dall'inizio dell'esperimento. I valori indicati sono stati normalizzati al valore iniziale (pre) stimolazione.

OJIP TEST T8 Secondo esperimento del Doe						
	T8 fbr2 pre	T8 fbr2 post	T8 fbr5 pre	T8 fbr5 post	T8 fbr7 pre	T8 fbr7 post
Bckg	130	130	130	130	130	130
Fo	11573	11313	12484	11541	10923	11638
Fj	15540	15475	16548	15052	14922	14890
Fi	20709	21229	22335	20742	19799	20319
Fm	40346	39565	41386	38298	36379	33193
Fv	28773	28252	28902	26757	25456	21555
Vj	0.138	0.147	0.141	0.131	0.157	0.151
Vi	0.318	0.351	0.341	0.344	0.349	0.403
Fm/Fo	3486	3497	3315	3318	3330	2852
Fv/Fo	2486	2497	2315	2318	2330	1852
Fv/Fm	0.713	0.714	0.698	0.699	0.700	0.649
Mo	0.113	0.134	0.131	0.122	0.164	0.163
Area	5620527	5200596	5844687	6048875	5162466	5137135
Fix Area	30504627	30483887	31874943	29233441	27679952	27289966
Sm	195340	184079	202224	226067	202800	238327
Ss	1220	1103	1077	1080	0.960	0.926
N	160133	166830	187694	209390	211167	257381
Phi_Po	0.713	0.714	0.698	0.699	0.700	0.649
Psi_o	0.862	0.853	0.859	0.869	0.843	0.849
Phi_Eo	0.615	0.609	0.600	0.607	0.590	0.551
Phi_Do	0.287	0.286	0.302	0.301	0.300	0.351
Phi_Pav	767027	765899	777574	783362	781341	807665
Pi_Abs	13525	11389	10646	11579	8403	6268
ABS/RC	1149	1269	1329	1326	1488	1663
TRo/RC	0.820	0.906	0.928	0.926	1041	1080
ETo/RC	0.707	0.773	0.798	0.805	0.878	0.917
DLo/RC	0.330	0.363	0.401	0.400	0.447	0.583

Tabella 4: OJIP test effettuato dopo otto giorni (T_8) dall'inizio dell'esperimento nei fbr 2,5,7 prima (pre) e al termine (post) della prima stimolazione acustica giornaliera della durata di 30 minuti, del secondo esp. del Doe.

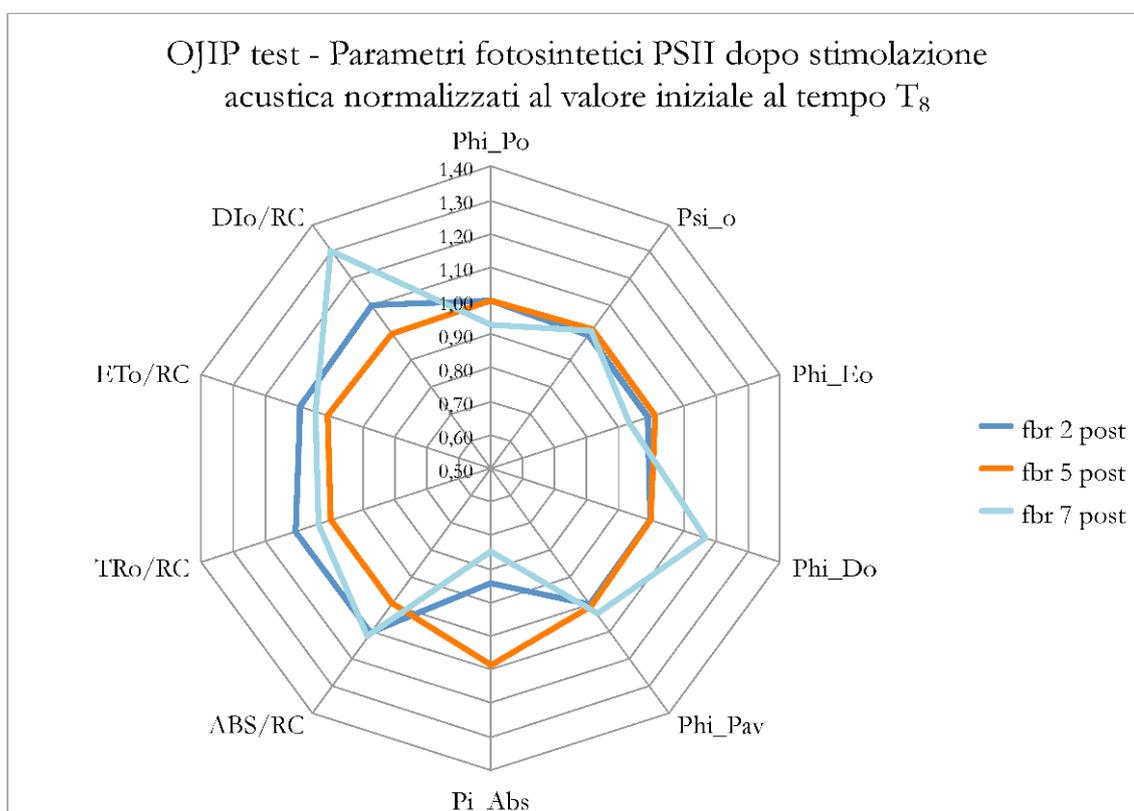
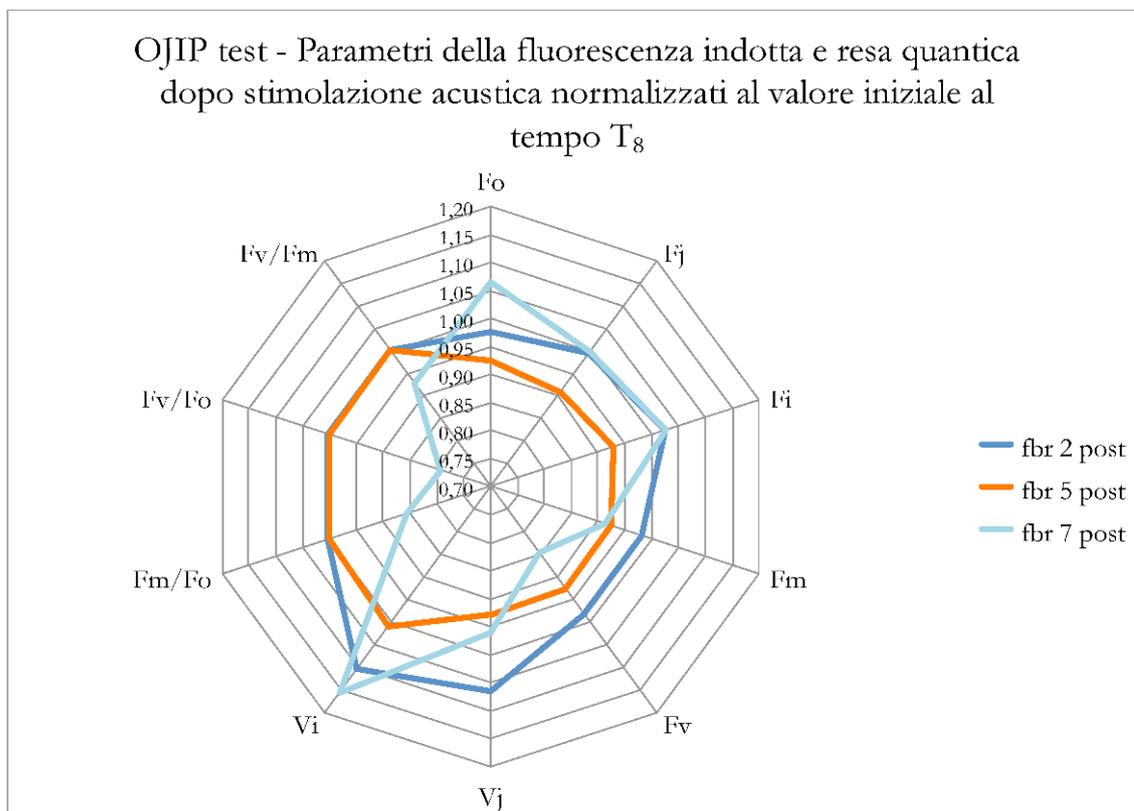


Figura 15: Spider-plot relativi ai parametri di fluorescenza indotta e resa quantica, e parametri fotosintetici del PSII, osservati dalle analisi AquaPen con il protocollo OJIP dopo otto giorni dall'inizio dell'esperimento. I valori indicati sono stati normalizzati al valore iniziale (pre) stimolazione.

5.4.3 Le curve di induzione della fluorescenza delle clorofille con l'OJIP test AquaPen delle microalghe *S. obliquus* dopo dieci giorni dall'inizio del secondo esperimento del Doe

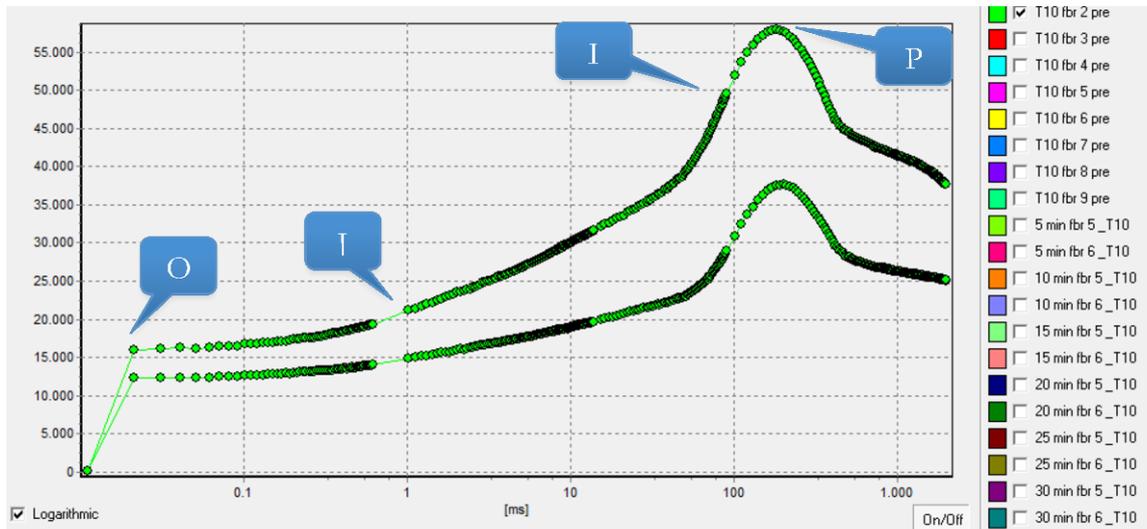


Figura 16: Effetto di induzione della fluorescenza delle microalghe **nel fbr 2** prima (curva di colore verde) e subito dopo la stimolazione acustica (curva di colore rosa) **della durata di 30 minuti**, alla frequenza di **10.050 Hz** (10 kHz circa per 30 minuti giornalieri a intensità relativa massima +6). Le misure sono state eseguite con il protocollo OJIP ed espresse in scala logaritmica. In ordinata valore relativo dell'intensità di fluorescenza. Delle due curve di colore verde, quella più in basso corrisponde alle misure ottenute al termine della stimolazione acustica (post).

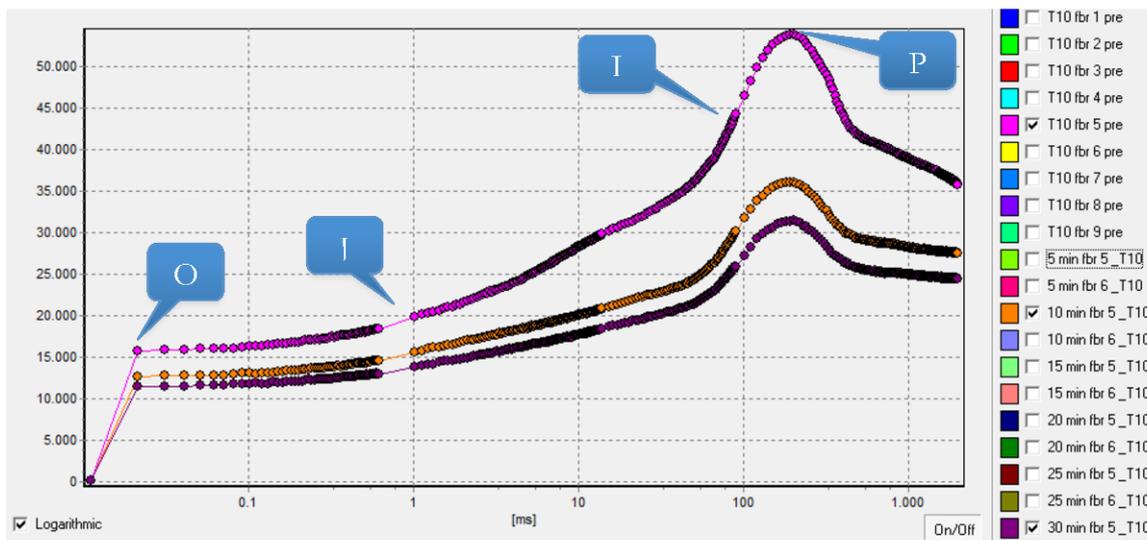


Figura 17: Effetto di induzione della fluorescenza delle microalghe **nel fbr 5** prima (curva di colore rosa), dopo 10 minuti dall'inizio della stimolazione acustica (curva di colore arancione) e subito dopo la stimolazione acustica (curva di colore viola) **della durata di 30 minuti** alla frequenza **Sweep lineare** (da **100 Hz a 6 kHz** per 12,30 ore al giorno a intensità relativa -25). Le misure sono state eseguite con il protocollo OJIP ed espresse in scala logaritmica. In ordinata valore relativo dell'intensità di fluorescenza.

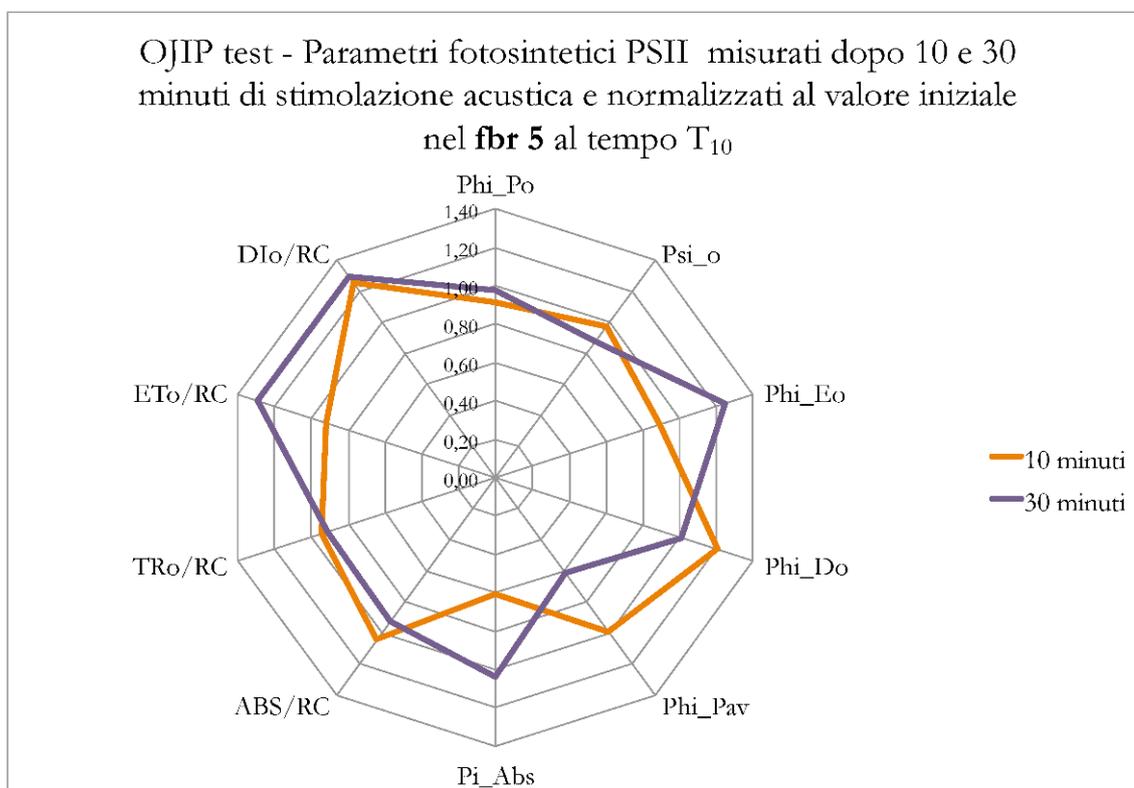
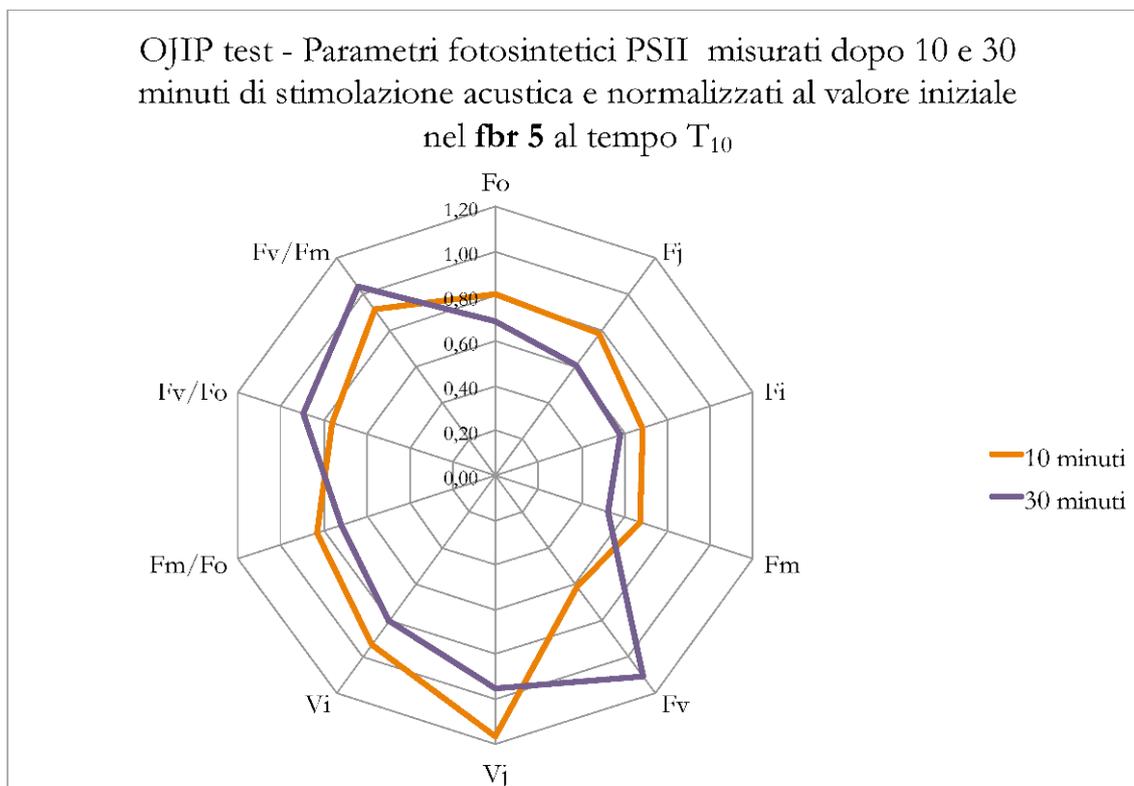


Figura 18: Spider-plot relativi ai parametri di fluorescenza indotta e resa quantica, e parametri fotosintetici del PSII, osservati dalle analisi AquaPen con il protocollo OJIP dopo dieci giorni dall'inizio dell'esperimento, relativamente al fbr 5 dopo 10 e 30 minuti di stimolazione acustica. I valori indicati sono stati normalizzati al valore iniziale (pre) stimolazione.

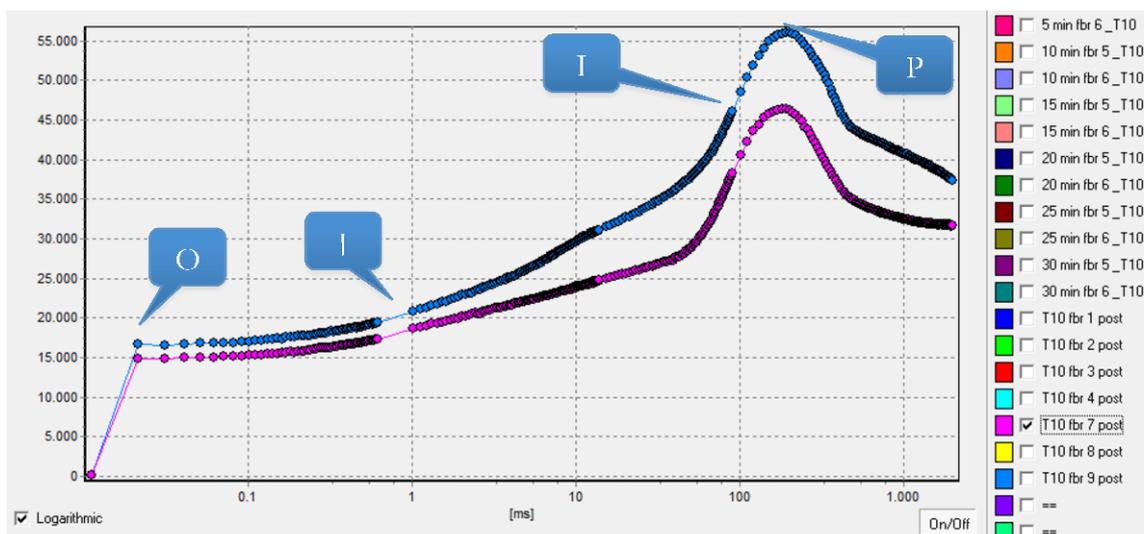


Figura 19: Effetto di induzione della fluorescenza delle microalghe **nel fbr 7** prima (curva di colore blu) e subito dopo la stimolazione acustica (curva di colore rosa) **della durata di 30 minuti** alla frequenza di **4.950 Hz** per 6,30 ore al giorno a intensità relativa **+1,5**. Le misure sono state eseguite con il protocollo OJIP ed espresse in scala logaritmica. In ordinata valore relativo dell'intensità di fluorescenza.

OJIP TEST T10 Secondo esperimento del Doe							
	T10 fbr 2 pre	T10 fbr 2 post	T10 fbr 5 pre	10 min fbr 5 _T	30 min fbr 5 _T	T10 fbr 7 pre	T10 fbr 7 post
Bckg	97	162	130	130	130	130	162
Fo	16125	12127	15670	12646	11378	16548	14825
Fj	23408	15768	21392	16743	14727	22757	20027
Fi	35502	21392	32771	22432	19896	34461	26464
Fm	57902	37485	53643	35924	31275	55918	46231
Fv	41777	25358	37973	23278	19897	39370	31406
Vj	0.174	0.144	0.151	0.176	0.168	0.158	0.166
Vi	0.464	0.365	0.450	0.420	0.428	0.455	0.371
Fm/Fo	3591	3091	3423	2841	2749	3379	3118
Fv/Fo	2591	2091	2423	1841	1749	2379	2118
Fv/Fm	0.722	0.676	0.708	0.648	0.636	0.704	0.679
Mo	0.149	0.149	0.151	0.168	0.157	0.145	0.153
Area	8497501	5923649	8813852	5257273	5195644	8648736	7064186
Fix Area	46028698	29062032	42947017	29792063	26060535	45018461	35956718
Sm	203401	233601	232108	225847	261127	219678	224931
Ss	1166	0.966	1000	1049	1072	1085	1081
N	174384	241749	232027	215208	243583	202377	208068
Phi_Po	0.722	0.676	0.708	0.648	0.636	0.704	0.679
Psi_o	0.826	0.856	0.849	0.824	0.832	0.842	0.834
Phi_Eo	0.596	0.579	0.601	0.534	0.529	0.593	0.567
Phi_Do	0.278	0.324	0.292	0.352	0.364	0.296	0.321
Phi_Pav	808038	783783	814924	805767	823960	807157	797417
Pi_Abs	10327	8153	9672	5860	5893	9711	7837
ABS/RC	1188	1530	1412	1471	1466	1308	1362
TRo/RC	0.857	1035	1000	0.953	0.933	0.921	0.925
ETo/RC	0.708	0.886	0.849	0.785	0.776	0.776	0.772
DIo/RC	0.331	0.495	0.413	0.518	0.533	0.387	0.437

Tabella 5: OJIP test effettuato dopo dieci giorni (T_{10}) dall'inizio dell'esperimento nei fbr 2,5¹¹,7 prima (pre) e al termine (post) della prima stimolazione acustica giornaliera della durata di 30 minuti, del secondo esp. del Doe.

¹¹ Relativamente al solo fbr 5 nelle misure con il fluorimetro AquaPen con l'OJIP test a dieci giorni dall'inizio dell'esperimento, è stata acquisita anche la misura intermedia dopo 10 minuti dall'inizio della stimolazione acustica.

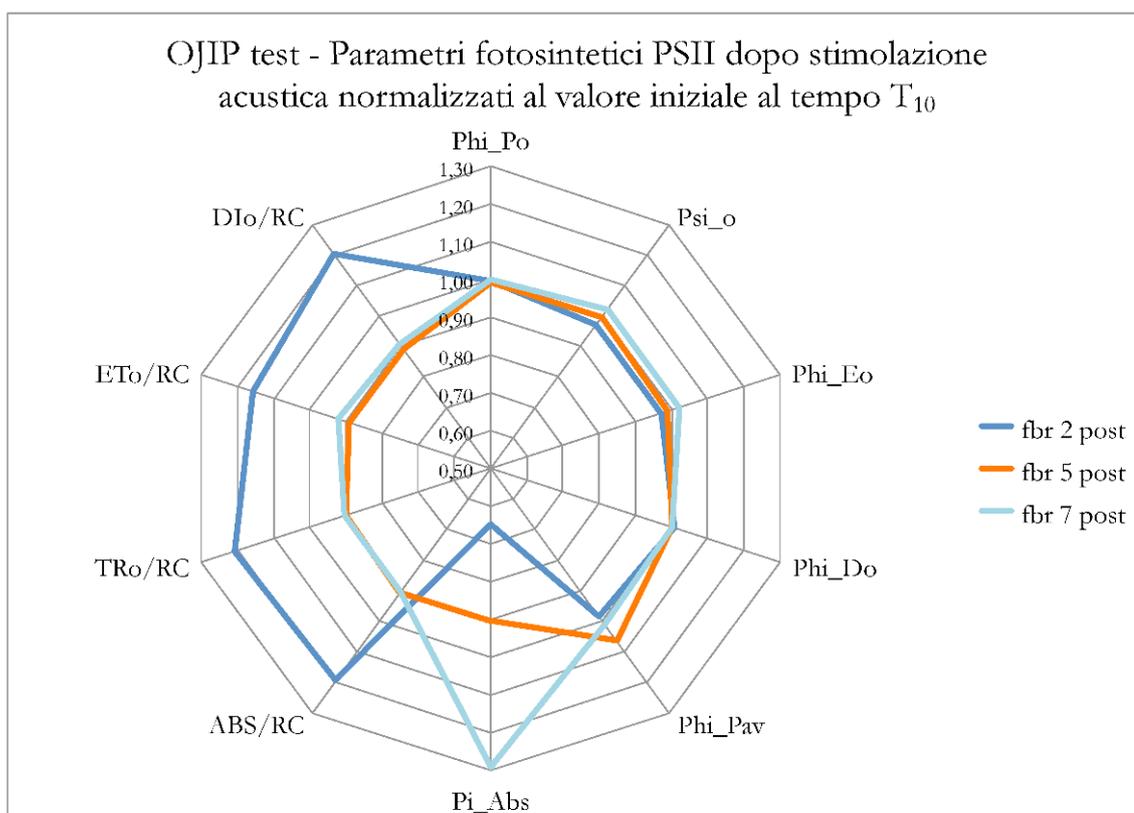
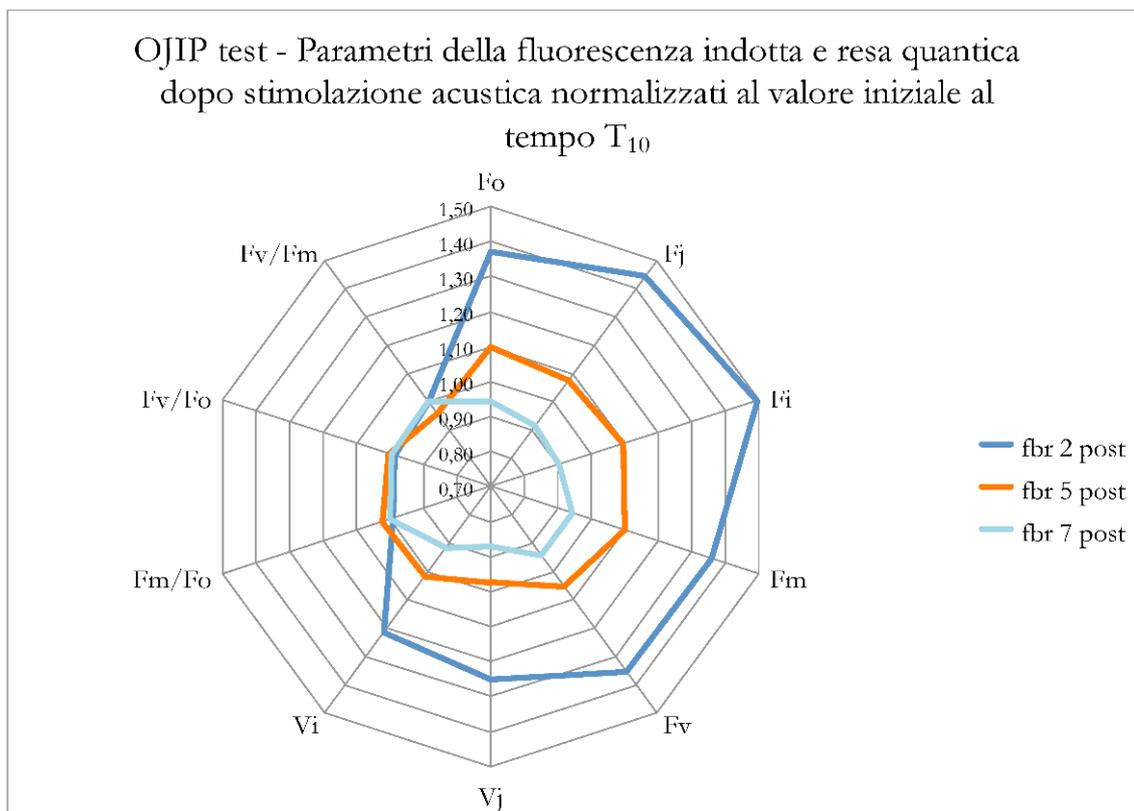


Figura20: Spider-plot relativi ai parametri di fluorescenza indotta e resa quantica, e parametri fotosintetici del PSII, osservati dalle analisi AqualPen con il protocollo OJIP dopo dieci giorni dall'inizio dell'esperimento. I valori indicati sono stati normalizzati al valore iniziale (pre) stimolazione.

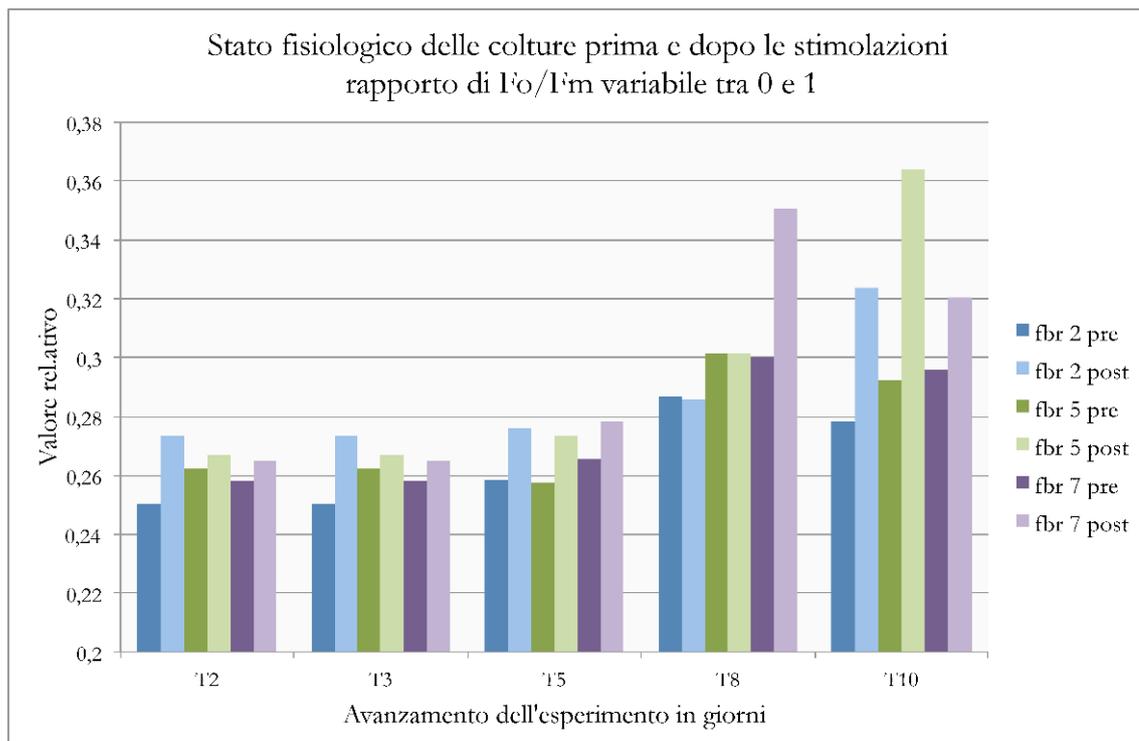
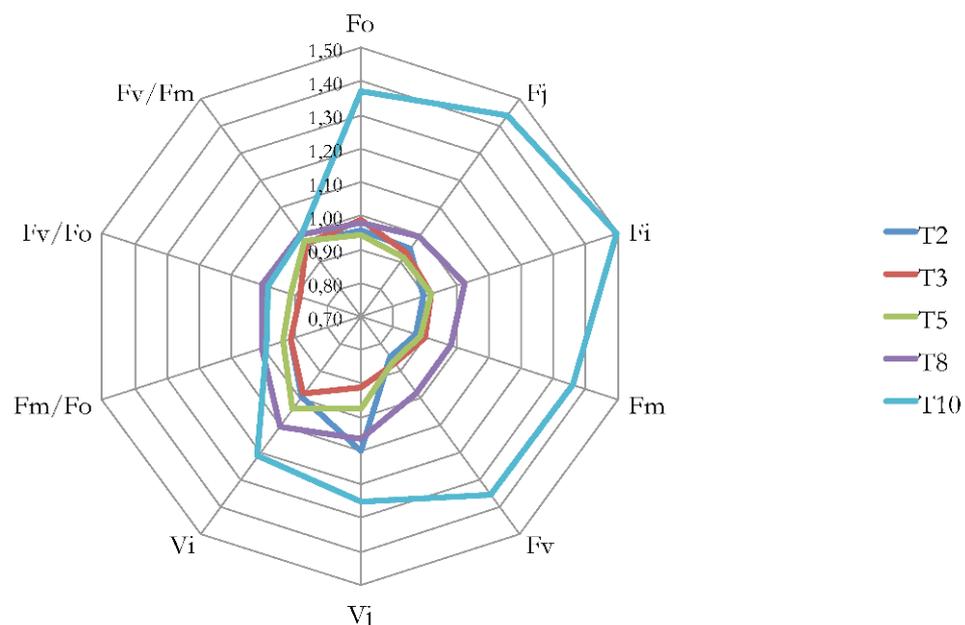


Figura 21 Indicazione dello stato fisiologico delle colture microalgali di *Scenedesmus obliquus* prima e dopo la stimolazione acustica nel corso dell'avanzamento del secondo esperimento del Doc, ottenuto dal rapporto tra i valori di fluorescenza iniziale (F_0) e massima (F_m). Tale valore può essere compreso solo tra 0 e 1.

Nel grafico di Figura 49, si osserva come in tutti i momenti di avanzamento dell'esperimento a partire dal secondo giorno fino al decimo giorno, i valori del rapporto tra F_0 su F_m è risultato sempre superiore nella misura post stimolazione acustica con un divario maggiore in favore del fbr 5 osservata dopo 10 giorni dall'inizio dell'esperimento. Anche il fbr 2, ad eccezione che per l'ottavo giorno ha mostrato un divario maggiore nel rapporto F_0/F_m .

OJIP test - Parametri della fluorescenza indotta e resa quantica dopo stimolazione acustica normalizzati al valore iniziale nel **fbr 2** durante l'avanzamento dell'esperimento



OJIP test - Parametri fotosintetici PSII dopo stimolazione acustica normalizzati al valore iniziale nel **fbr 2** durante l'avanzamento dell'esperimento

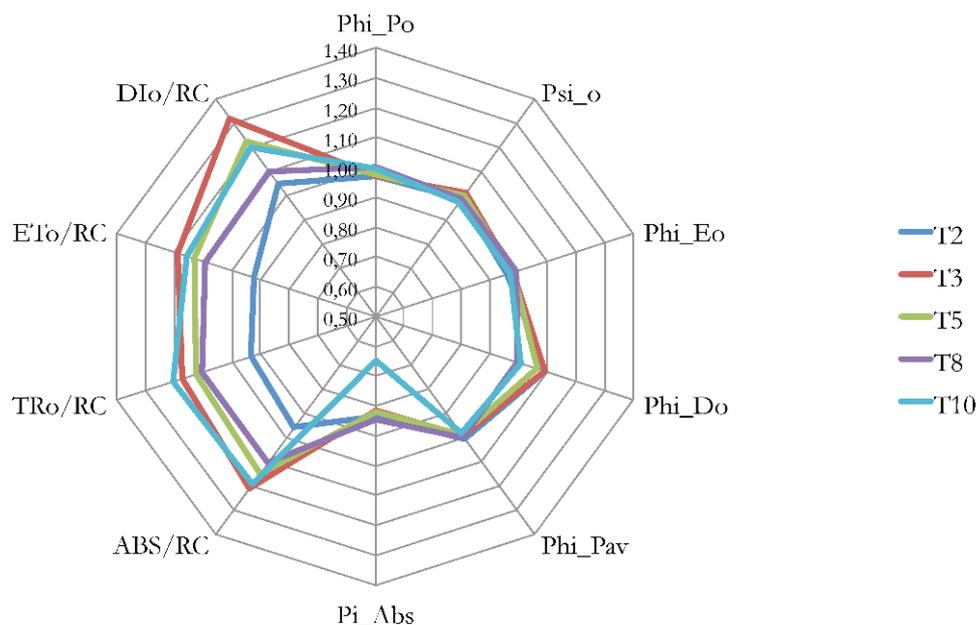
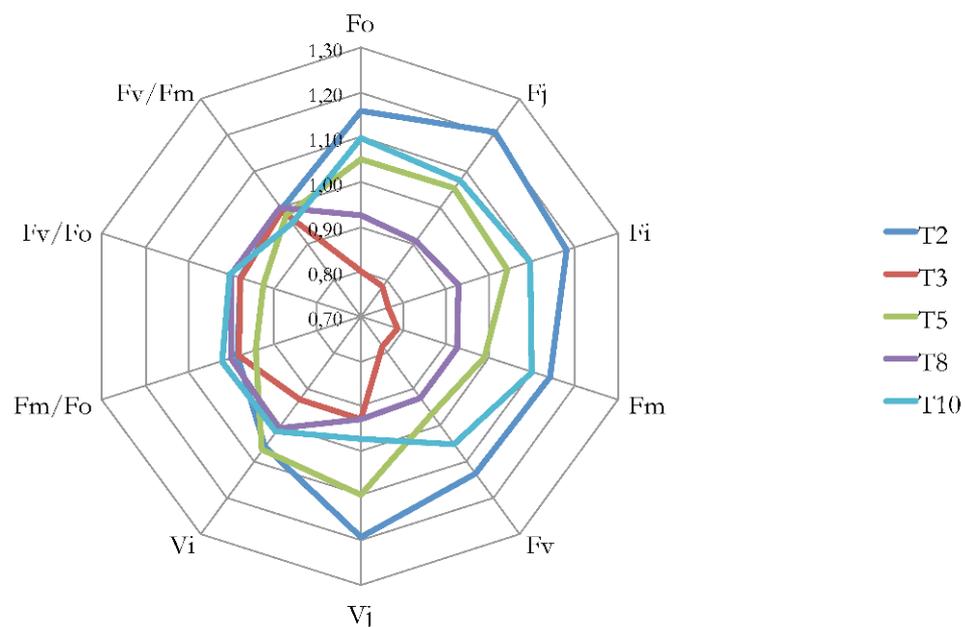


Figura 22: Spider-plot relativi ai parametri di fluorescenza indotta e resa quantica, e parametri fotosintetici del PSII, osservati dalle analisi AquaPen con il protocollo OJIP relativamente al **fbr 2** durante l'avanzamento dell'esperimento dal T₂ al T₁₀. I valori indicati sono stati normalizzati al valore iniziale (pre) stimolazione.

OJIP test - Parametri della fluorescenza indotta e resa quantica dopo stimolazione acustica normalizzati al valore iniziale nel **fbr 5** durante l'avanzamento dell'esperimento



OJIP test - Parametri fotosintetici PSII dopo stimolazione acustica normalizzati al valore iniziale nel **fbr 5** durante l'avanzamento dell'esperimento

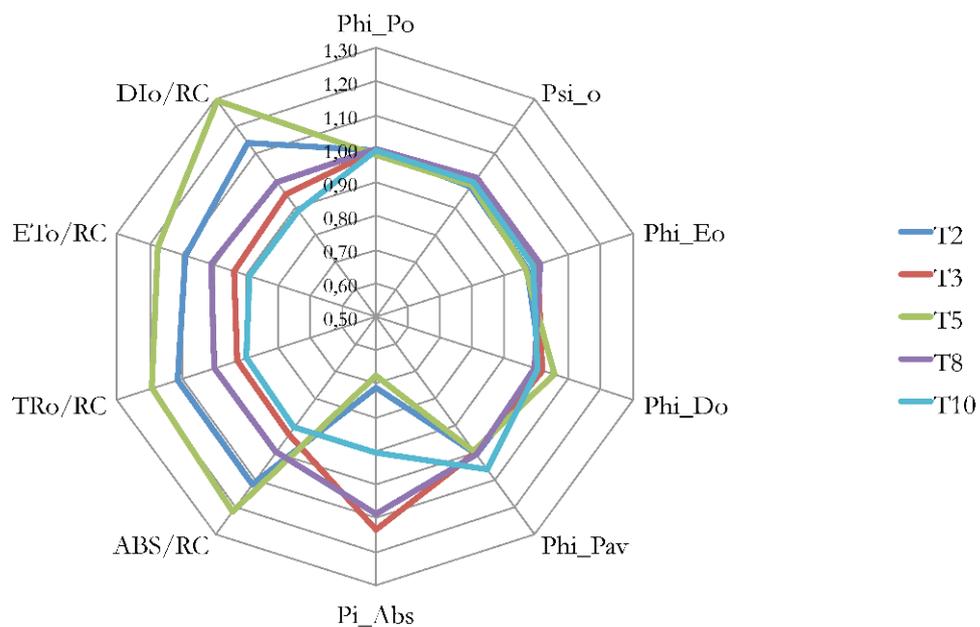
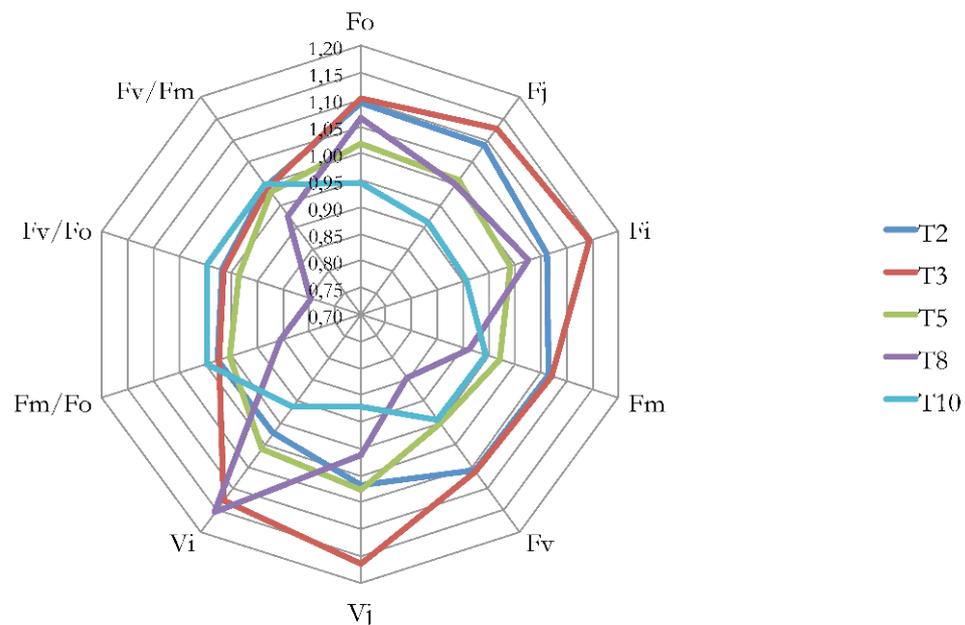


Figura 23: Spider-plot relativi ai parametri di fluorescenza indotta e resa quantica, e parametri fotosintetici del PSII, osservati dalle analisi AquaPen con il protocollo OJIP relativamente al **fbr 5** durante l'avanzamento dell'esperimento dal T₂ al T₁₀. I valori indicati sono stati normalizzati al valore iniziale (pre) stimolazione.

OJIP test - Parametri della fluorescenza indotta e resa quantica dopo stimolazione acustica normalizzati al valore iniziale nel **fbr 7** durante l'avanzamento dell'esperimento



OJIP test - Parametri fotosintetici PSII dopo stimolazione acustica normalizzati al valore iniziale nel **fbr 7** durante l'avanzamento dell'esperimento

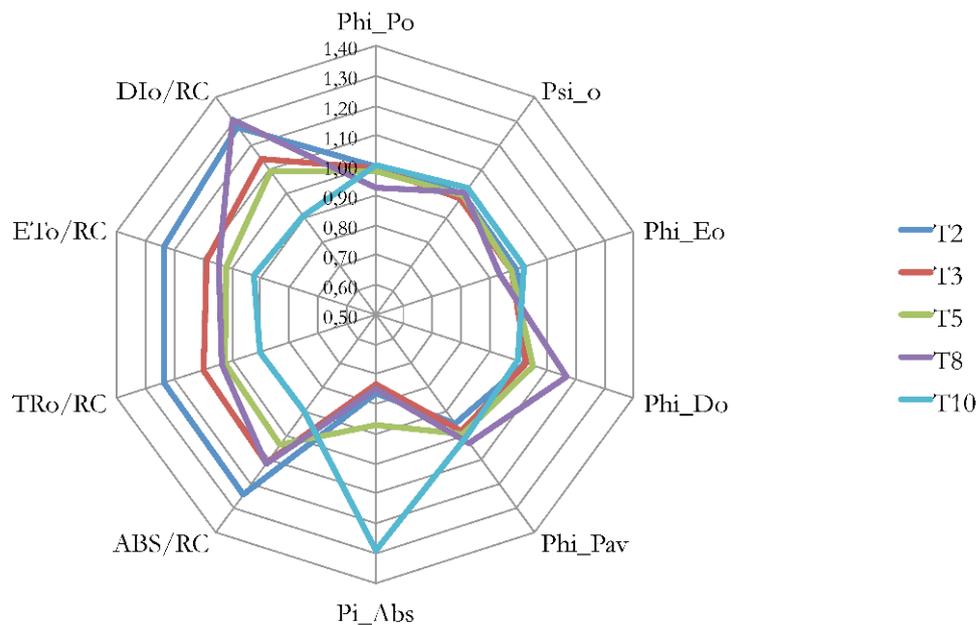


Figura 24: Spider-plot relativi ai parametri di fluorescenza indotta e resa quantica, e parametri fotosintetici del PSII, osservati dalle analisi AquaPen con il protocollo OJIP relativamente al **fbr 7** durante l'avanzamento dell'esperimento dal T₂ al T₁₀. I valori indicati sono stati normalizzati al valore iniziale (pre) stimolazione.

5.4.4 Misure di NPQ - Non-Photochemical Quenching

Il protocollo NPQ inizia la misura illuminando inizialmente il campione per ottenere il livello minimo di fluorescenza F_0 . Poi con un breve impulso di luce saturante riduce il plastochinone ottenendo così la misura di F_m : la fluorescenza dopo l'adattamento al buio.

Dopo un breve periodo di relax al buio, il campione è esposto a flash di luce attinica per indurre l'effetto transitorio di Kautsky. Inoltre, una sequenza di luce pulsata viene utilizzata per sondare il quenching fotochimico e non fotochimico per misurare la resa quantica della fotosintesi Q_y .

Dopo l'esposizione a luce saturante continua seguono fasi di rilassamento al buio.

I protocolli differiscono nella durata della luce esposizione e la fase di recupero al buio, il numero e l'intervallo tra gli impulsi.

I campioni vengono preliminarmente adattati al buio per consentire la chiusura dei centri di reazione del PSII. Ciò causa l'aumento della fluorescenza della clorofilla. Successivamente il livello di fluorescenza comincia nuovamente a diminuire. Questo fenomeno denominato estinzione fotochimica photochemical quenching, qP , si verifica a causa dell'incremento con cui gli elettroni sono trasportati fuori dal PSII.

Contemporaneamente, alla riduzione dei fenomeni emissivi in fluorescenza, si osserva un incremento di efficienza nei processi di conversione dell'energia in calore. Questo fenomeno viene definito estinzione non – fotochimica (NPQ).

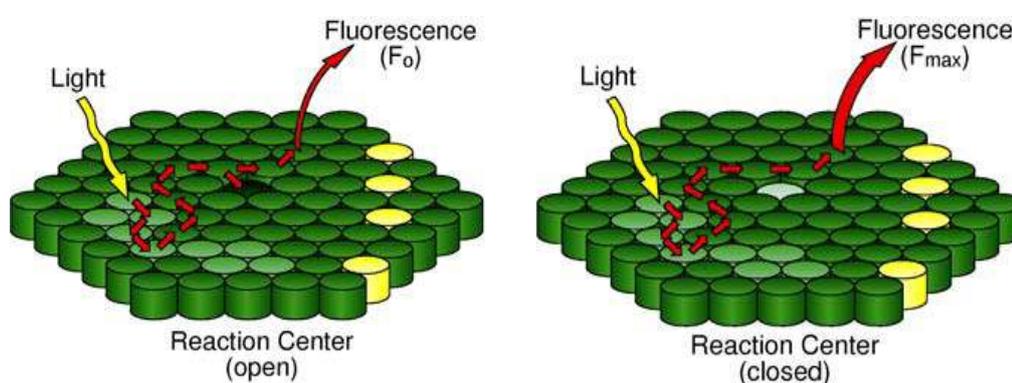


Figura 25: Una rappresentazione dei due diversi stadi in cui si hanno centri di reazione aperti e chiusi con i relativi fenomeni di emissione in fluorescenza.

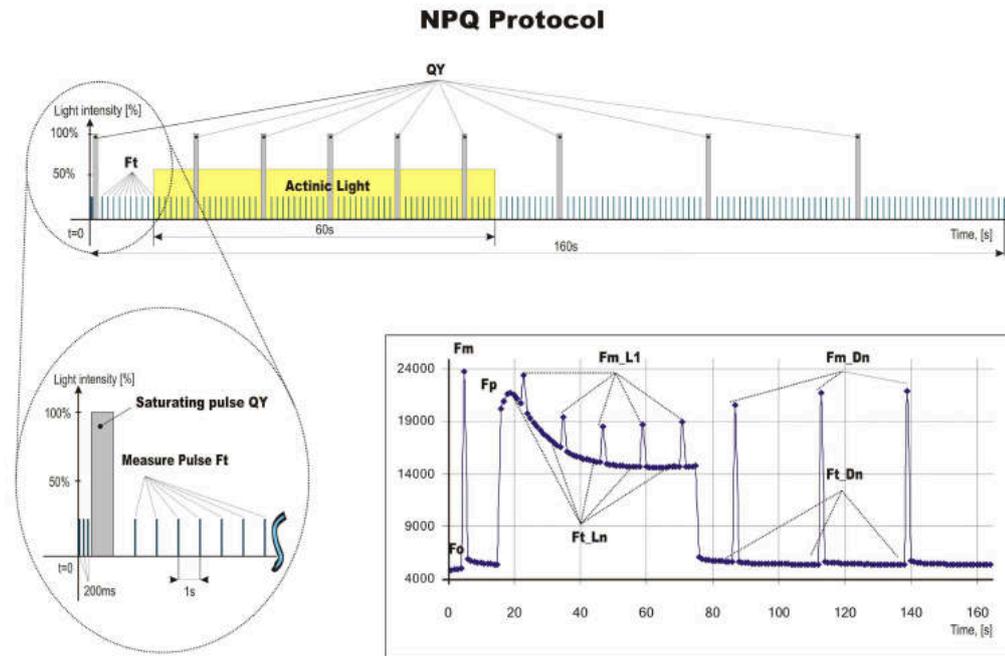
Per descrivere correttamente i parametri di efficienza fotosintetica di una coltura microalgale, è necessario distinguere i contributi relativi ai due distinti fenomeni di estinzione fotochimica e non fotochimica.

La tecnica utilizzata dal protocollo NPQ è quella del raddoppiamento della luce, che consente di annullare l'estinzione fotochimica causando quindi l'improvvisa e istantanea chiusura di tutti i centri di reazione del PSII con un flash di luce saturante di breve durata e di alta intensità.

Questo brevissimo lampo di luce replica le medesime condizioni che si verificano in assenza di estinzione fotochimica consentendo ai fotosistemi di esprimere il valore di massima fluorescenza F_m . Dal confronto tra questo valore massimo di fluorescenza, del valore di F_t e di F_o , si riescono ad ottenere informazioni accurate sul processo di estinzione fotochimica e sull'efficienza del fotosistema II.

Partendo quindi dal momento di accensione della luce per le misure, si otterrà il primo valore, relativo al livello minimo di fluorescenza F_o . Il successivo flash di luce saturante determinerà il valore di massima fluorescenza F_m per il campione adattato al buio. Ad intervalli prestabiliti dal protocollo impiegato, vengono poi emessi in successione una serie di flash di luce attinica saturante e per ciascuno di essi viene rilevato il valore di F_m . Il valore di fluorescenza che precede F_m viene indicato con F_t .

Nella Figura 26 è riportato il protocollo di misura impiegato NPQ2 in cui la durata del periodo di illuminazione è di 200 secondi contro 390 secondi di recupero al buio.



	Phase	Duration	# of pulses	1st pulse	Pulse interval
NPQ1	Light	60s	5	7s	12s
	Dark recovery	88s	3	11s	26s
NPQ2	Light	200s	10	10s	20s
	Dark recovery	390s	7	20s	60s

Figura 26: Il particolare del protocollo NPQ2 utilizzato per le misure del quenching non fotochimico.

Fo = Fluorescenza minima dopo adattamento al buio

Fm = massima fluorescenza ottenuta dopo lo stato adattato al buio, misurata durante il primo flash saturazione

Fp = fluorescenza nel picco di induzione veloce Kautsky

Fm_L, Lss, D, Dss¹² = fluorescenza massima

QYmax¹³ = rendimento massimo quantum di PSII in stato adattato al buio - F_v / F_m

QY_L, Lss, D, Dss¹⁴ = resa quantica effettiva del PSII

NPQ_L, Lss, D, Dss¹⁵ = quenching non fotochimico fluorescenza della clorofilla

Qp_L, Lss, D, Dss¹⁶ = coefficiente di quenching fotochimico, una stima dei centri di reazione aperti PSII

¹² L - indica chiari parametri adeguati; D - si riferisce alla fase di recupero buio dopo il passaggio del attinica illuminazione; n - rappresenta un numero sequenziale di fase luce, ss - stato stazionario

¹³ Calcolato con la formula $(F_m - F_o) / F_m$

¹⁴ Calcolato con la formula $(F_m_{Ln} - F_t_{Ln}) / F_m_{Ln}$

¹⁵ Calcolato con la formula $(F_m - F_m_{Ln}) / F_m_{Ln}$ o i parametri corrispondenti ss, Dn or Dss

Tempo T_0 dopo il primo ciclo di stimolazioni acustiche

Le misure qui di seguito riportate sono state fatte unicamente al tempo zero, dopo i primi 30 minuti di stimolazione acustica sui fbr 2, 5 e 7 del secondo esperimento del Doe. Le differenze maggiori sono state osservate sui campioni del fbr 5 stimolato acusticamente con la frequenza di 4.950 Hz. Successivamente, nonostante l'importanza strategica nel collezionare queste preziose informazioni, si è ritenuto di non continuare con le misure a causa della troppa distanza temporale tra il momento di cessazione della stimolazione acustica nel fbr e del relativo prelievo della biomassa da esaminare e il momento delle analisi, considerando che per ogni misura, il fluorimetro AquaPen rimaneva impegnato per oltre 20 minuti e quindi i risultati a quel punto non potevano essere più confrontabili.

Sono emerse comunque informazioni interessanti che confermerebbero già dopo solo la prima stimolazione acustica non solo gli effetti ma soprattutto il diverso comportamento a seconda della fonte sonora impiegata nelle stimolazioni acustiche.

Estinzione non fotochimica rilevata nel fbr 2 al tempo zero prima e subito dopo la prima stimolazione acustica

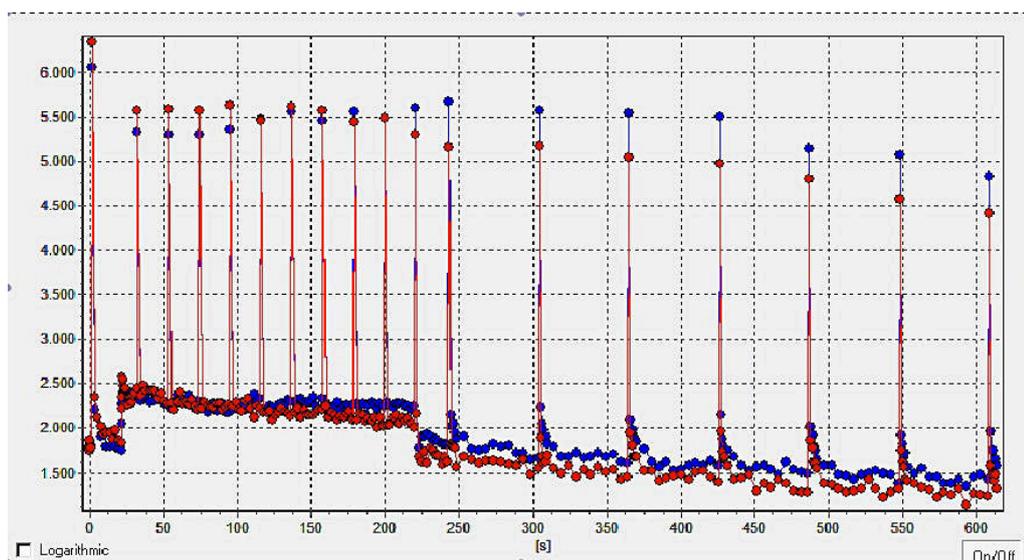


Figura 27: Esito delle analisi con il fluorimetro AquaPen **protocollo NPQ2** di campioni microalgali prelevati **nel fbr 2** prima (curva di colore blu) e subito dopo la stimolazione acustica (curva di colore rosso) **della durata di 30 minuti**, alla frequenza di **10.050 Hz** a intensità relativa massima **+6**. Le misure sono state eseguite dopo aver adattato al buio per 10 minuti la cuvette da analizzare.

¹⁶ Calcolato con la formula $(Fm_Ln - Ft_Ln) / (Fm_Ln - Fo_Ln)$ o con i parametri corrispondenti ss, Dn or Dss parameters.

Estinzione non fotochimica rilevata nel fbr 5 al tempo zero prima e subito dopo la prima stimolazione acustica

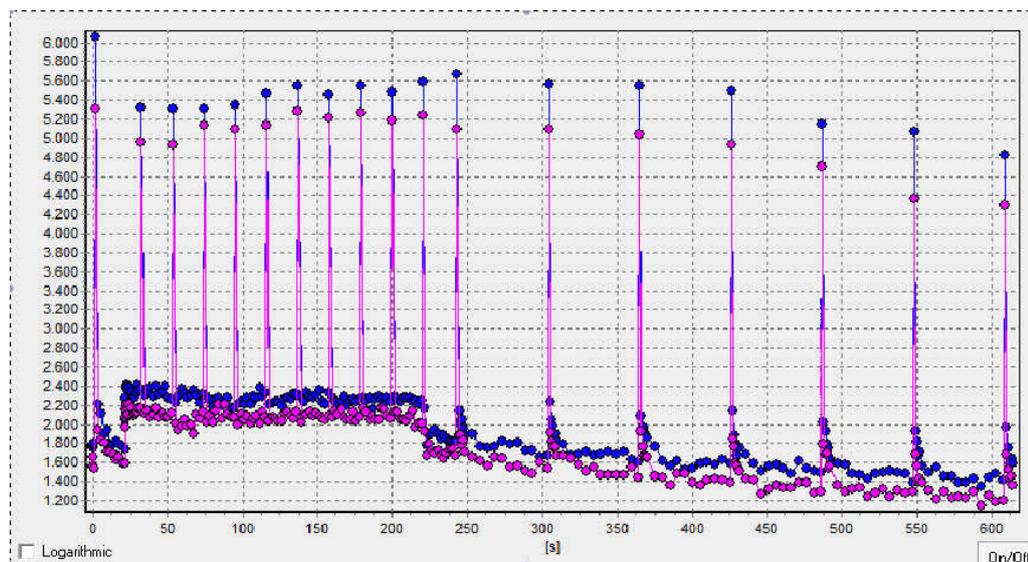


Figura 28: Esito delle analisi con il fluorimetro AquaPen **protocollo NPQ2** di campioni microalgali prelevati **nel fbr 5** prima (curva di colore blu) e subito dopo la stimolazione acustica (curva di colore rosa) **della durata di 30 minuti**, alla frequenza **Sweep lineare** (da 100 Hz a 6 kHz a intensità relativa - 25). Le misure sono state eseguite dopo aver adattato al buio per 10 minuti la cuvette da analizzare.

Estinzione non fotochimica rilevata nel fbr 7 al tempo zero prima e subito dopo la prima stimolazione acustica

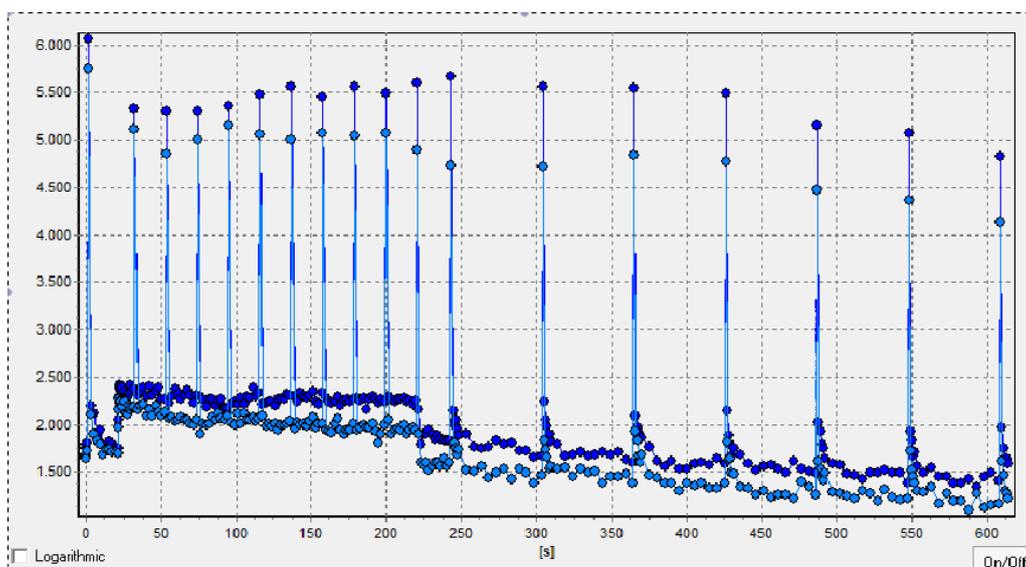


Figura 29: Esito delle analisi con il fluorimetro AquaPen **protocollo NPQ2** di campioni microalgali prelevati **nel fbr 7** prima (curva di colore blu) e subito dopo la stimolazione acustica (curva di colore azzurro) **della durata di 30 minuti**, alla frequenza **Sweep lineare** di 4.950 Hz a intensità relativa +1,5. Le misure sono state eseguite dopo aver adattato al buio per 10 minuti la cuvette da analizzare.

Estinzione non fotochimica osservata nei fbr 2, 5 e 7 al tempo zero subito dopo la prima stimolazione acustica

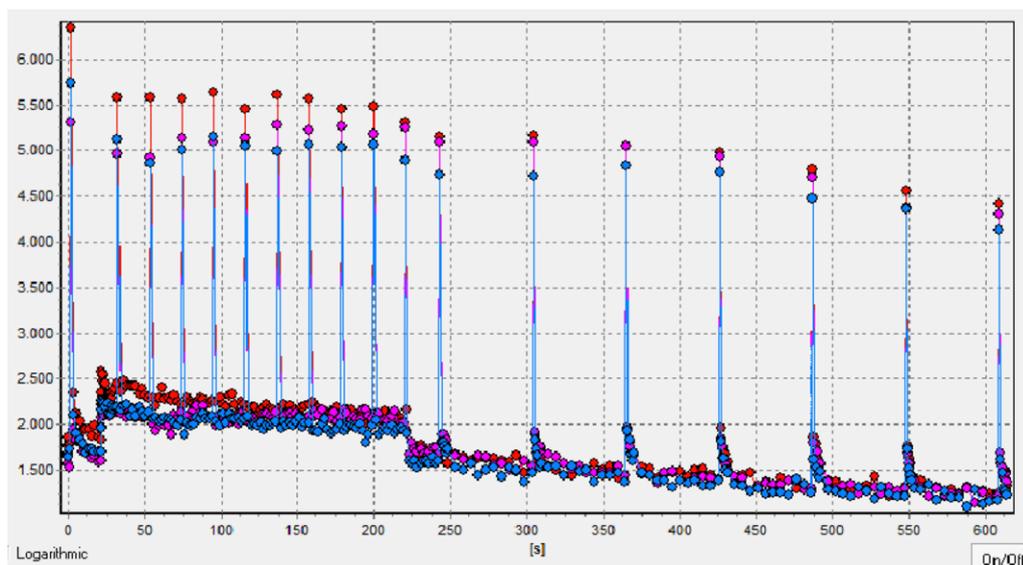


Figura 30: Esito delle analisi con il fluorimetro AquaPen **protocollo NPQ2** di campioni microalgali prelevati **nel fbr 2** (curva di colore rosso), **fbr 5** (curva di colore rosa) e **fbr 7** (curva di colore azzurro) subito dopo la prima stimolazione acustica e su campioni adattati al buio per 10 minuti.

Si osserva come per valori di frequenze maggiori (10 kHz), anche i valori di estinzione non fotochimica esproimono una maggiore intensità sia nel valore massimo che nella fase buio di estinzione appunto che vengono mantenute durante tutta la durata del protocollo di misura (600 secondi).

Così come osservato nei singoli grafici sembrerebbe che il campione microalgale stimolato acusticamente con lo sweep di frequenza compresa tra 0,1 e 6 kHz, si sia posizionato in mezzo ai due valori osservati di minimo (fbr 7) e Massimo (fbr 2).

5.5 Le tecniche di analisi all'Infrarosso FTIR

Le tecniche di analisi all'infrarosso, consentono di ottenere informazioni sulla composizione cellulare e in particolare sugli aspetti vibrazionali di alcune molecole caratteristiche: lipidi, carboidrati e proteine i cui rapporti sono l'espressione proprio di una possibile risposta biochimica della cellula alle sollecitazioni meccaniche riprodotte nel terreno di coltura dalle onde acustiche.

Tutti gli spettri FTIR ottenuti hanno mostrato un buon rapporto segnale-rumore e come si vedrà più avanti, si è cercato di ottenere una serie di informazioni preliminari necessarie alla messa a punto di un protocollo sperimentale con cui poter approfondire e migliorare nel prossimo futuro quanto è stato osservato e descritto.

Nella Tabella 4 del 3 capitolo materiali e metodi, sono riportati i protocolli sperimentali utilizzati per la preparazione dei campioni e l'assegnazione delle bande di assorbimento negli spettri IR delle cellule di *S. obliquus* osservate, che è stata effettuata in base a dati precedentemente pubblicati da (Giordano et al., 2001; Duygu et al., 2012; Kim et al., 2009).

5.5.1 Analisi dei campioni con la Spettroscopia FTIR. Spettri più rappresentativi relativi alle stimolazioni acustiche nei due esperimenti del Doe

Per una migliore comprensione delle più importanti variazioni osservate sui profili delle colture cellulari di *S. obliquus* trattati nei diversi programmi di stimolazione acustica, vengono qui di seguito riportati nelle Figure 31 e 32 gli spettri più rappresentativi¹⁷, relativi alle differenti bande di assorbimento, dovute all'elevato numero di moti vibrazionali generati dal contributo delle principali macromolecole tipo proteine, lipidi, carboidrati e polinucleotidi.

Tra i programmi di stimolazione acustica (vedi Figura 1), sono state quindi selezionate due diverse condizioni operative di crescita distanti tra loro per numero di cicli di stimolazioni

¹⁷ Nei grafici riportati nelle Figure 31 e 32, gli spettri sono stati normalizzati con le concentrazioni cellulari di *S. obliquus* durante l'avanzamento dell'esperimento da T₀ a T₆.

acustiche, per frequenza e intensità delle onde acustiche, al fine di evidenziare le più importanti modificazioni del profilo biochimico cellulare:

- il **fbr 3** (del primo esperimento del Doe) è stato stimolato acusticamente alla **frequenza di 100 Hz per 1 solo ciclo** giornaliero della durata di **30 minuti** ad una intensità relativa pari a **+6**;
- il **fbr 7** (del secondo esperimento del Doe) è stato stimolato acusticamente alla **frequenza di 4.950 Hz per 3 cicli** della **durata di 30 minuti** ciascuno intervallati da pause di 1,30 ore nel periodo di 6,30 ore al giorno, ad una intensità relativa pari a **+1,5**.

Spettri di colture cellulari di *Scenedesmus obliquus* cresciute nel **fbr 3 -100 Hz per 30 minuti al giorno** nel primo esperimento del Doe con le bande di assorbimento caratteristiche.

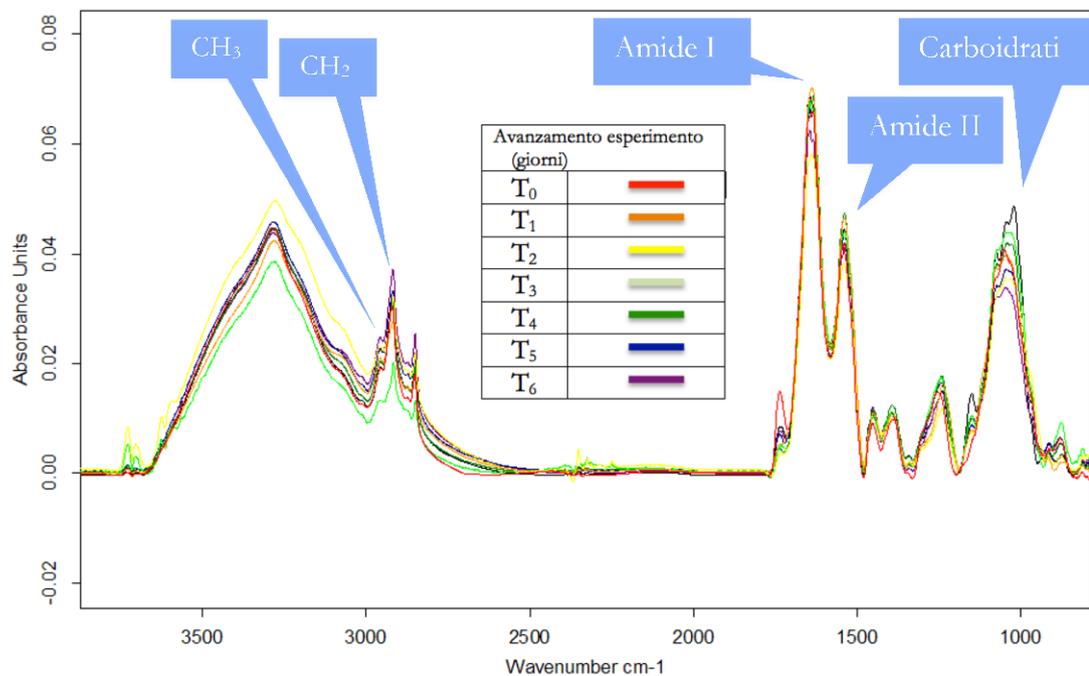


Figura 31: Spettri Primo esperimento fbr 3 stimolato alla frequenza di **100 Hz per 30 minuti al giorno** a intensità relativa massima **+6**.

Relativamente alle bande assegnate su campioni freschi di *S. obliquus* non trattati, in questo spettro di assorbimento, la stimolazione acustica alla frequenza di 100 Hz di intensità pari a circa 65 ± 2 dB re mPa, della durata di 30 minuti al giorno, in corrispondenza dei giorni di avanzamento T₁, T₄ e T₆, nella regione dei carboidrati mostra generalmente una progressiva riduzione nell'intensità di assorbanza, in accordo con gli incrementi di crescita ottenuti nelle rispettive concentrazioni.

Tale rapporto sembrerebbe invertito nelle rispettive regioni delle proteine e ciò sarebbe proprio in accordo con le funzioni vitali della cellula che, influenzata dalle condizioni di stress prodotto dalle onde acustiche, ha senza dubbio incrementato le cinetiche riproduttive utilizzando in alcuni momenti anche le riserve energetiche accumulate nel suo interno. Situazione opposta, e altalenante si osserva per i gruppi metilici che dopo una riduzione iniziale nell'intensità, proprio in funzione delle più elevate concentrazioni cellulari rispondono con un considerevole incremento in special modo con i picchi mostrati nella progressione tra T₅ e T₆.

Spettri di colture cellulari di *Scenedesmus obliquus* cresciute nel fbr 7 - **4.950 Hz**, per **3 cicli** della **durata di 30 minuti** ciascuno intervallati da pause di 1,30 ore nel periodo di 6,30 ore al giorno, ad una intensità relativa pari a **+1,5**, nel secondo esperimento del Doe con le bande di assorbimento caratteristiche.

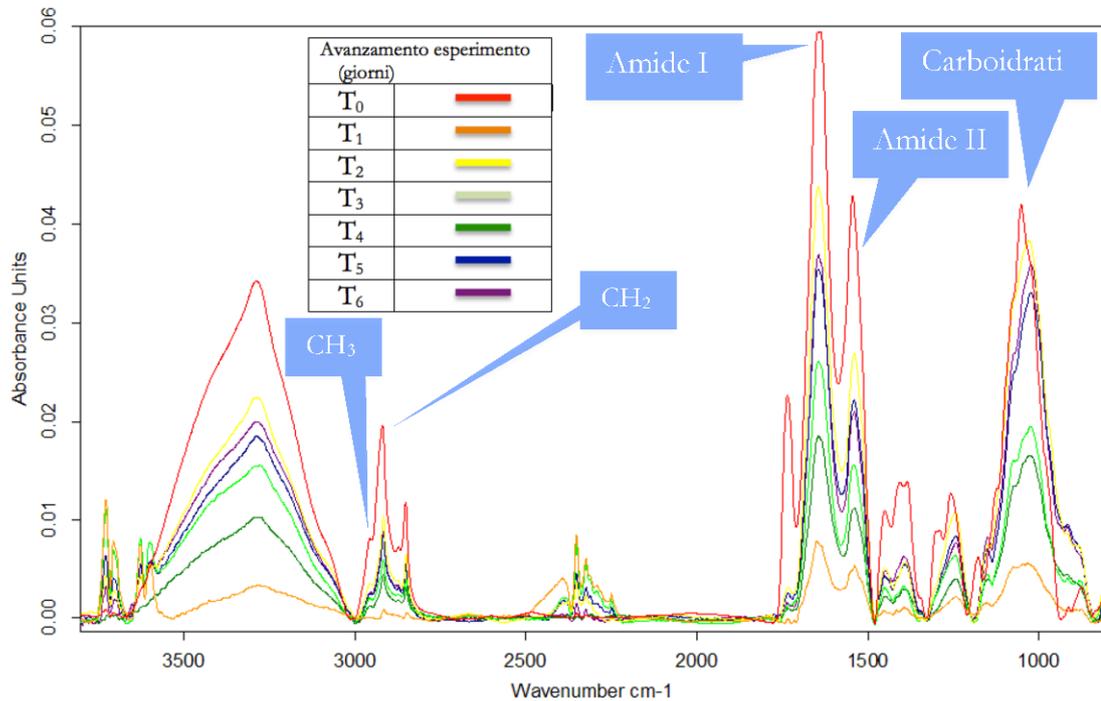


Figura 32: Spettri secondo esperimento fbr 7 stimolato alla frequenza di **4.950 Hz** per 3 cicli della durata di **30 minuti al giorno** intervallati da 1,30 ore di pausa, all' intensità relativa **+1,5**.

Lo spettro di assorbimento, per le stimolazioni acustiche alla frequenza di 4.950 Hz all'intensità di circa 48 ± 2 dB re mPa, della durata di 3 cicli giornalieri da 30 minuti, in corrispondenza dei giorni di avanzamento T₁, T₄ e T₆, nella regione dei carboidrati mostra generalmente una progressiva riduzione nell'intensità di assorbanza, in accordo con la velocità nel rate di crescita ottenuti nelle rispettive concentrazioni.

Il valore di intensità massima alla partenza (T₀), in tutte le regioni degli assorbimenti osservati non è stato raggiunto, ma a differenza della c stimolazione acustica a 100 Hz, la redistribuzione energetica cellulare mostra livelli di assorbimento più marcati come ad esempio la rapida diminuzione di carboidrati e proteine già dopo le prime 48 ore dall'avvio delle stimolazioni acustiche e un progressivo incremento dovuto anche alla maggiore presenza di cellule che hanno contribuito ai processi di conversione fotochimica accumulando riserve energetiche.

Dalle preliminari informazioni ottenute, si è visto come i due rispettivi programmi di stimolazione acustica, diversi tra loro per numero di cicli, intensità e frequenza delle stimolazioni acustiche hanno prodotto nelle cellule di *S. obliquus* profonde differenze sulla composizione delle riserve energetiche che sono risultate in accordo con gli incrementi seppure diversi nei rispettivi rate di crescita.

Gli stessi esami sono stati ripetuti anche per tutti gli altri fbr, e con la stessa procedura impiegata, sono stati analizzati in dettaglio gli spettri nella regione in cui sono state osservate le modificazioni più importanti: il rapporto carboidrati/proteine.

Alla luce delle precedenti osservazioni, nel successivo paragrafo si è cercato di circoscrivere l'intervallo della banda di assorbimento alle rispettive regioni dei carboidrati e proteine in modo da rendere agevole il confronto sulle variazioni più importanti che hanno interessato il profilo biochimico cellulare a causa dei diversi programmi di stimolazione acustica impiegati.

5.5.2 In dettaglio la regione dello spettro: carboidrati e proteine nei fbr del primo esperimento del Doe

Spettri dei campioni di microalghe prelevate dal fbr 3

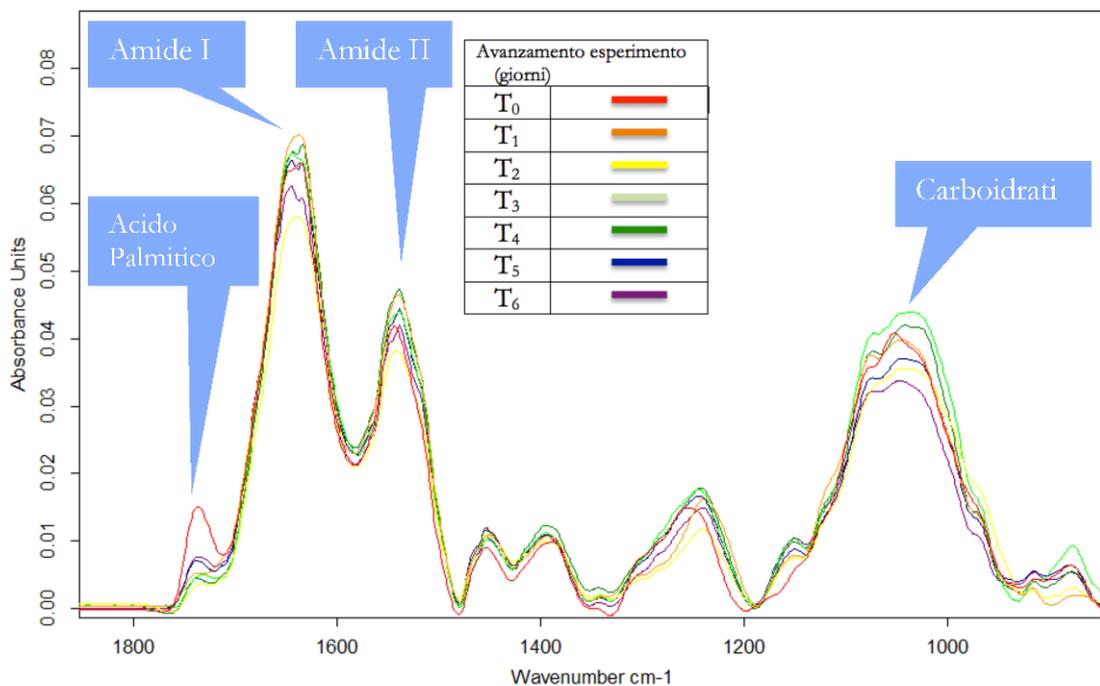


Figura 33: Analisi di Spettroscopia FTIR del campione di microalghe **Fbr 3** stimolato alla frequenza di **100 Hz per 30 minuti al giorno** a intensità relativa massima **+6**. Nel grafico gli spettri sono stati normalizzati alle concentrazioni di cellule per millilitro. È stata dettagliata in questo grafico solo la regione degli spettri in cui sono visibili le bande dei segnali dei carboidrati e delle proteine.

Lo spettro di assorbimento, per le stimolazioni acustiche alla frequenza di 100 Hz all'intensità di circa 65 ± 2 dB re mPa, della durata di 30 minuti, in corrispondenza della regione dei carboidrati, nei giorni di avanzamento T_0 , T_2 , ha assunto valori decrescenti di intensità di assorbanza, proprio in corrispondenza della prima importante crescita delle cellule per mL che da circa $8,0 \times 10^5$ hanno raggiunto una concentrazione pari a circa 3×10^6 . Poi, è seguita una rapida impennata nell'intensità di segnale sempre nella regione dei carboidrati tra il secondo e il terzo giorno di avanzamento delle colture e, da lì in poi fino al sesto giorno si è osservata una progressiva e costante riduzione dell'intensità dei segnali fino a raggiungere il livello minimo al sesto giorno T_6 . Il consumo dei carboidrati potrebbe essere attribuito al rapido incremento nella cinetica di crescita della coltura stimolata che partendo al T_3 con un valore pari a $2,2 \times 10^6$ cell/mL ha più che raddoppiato la sua concentrazione raggiungendo il valore di $5,3 \times 10^6$ cell/mL.

Nelle regioni dell'Amide II e Amide I si osserva invece un incremento tra il T_0 e il T_1 e tra il T_2 e T_4 esattamente contrario alla riduzione dei carboidrati, probabilmente da attribuire ad una maggiore attività di costruzione proteica distribuita su un numero maggiore di cellule per mL. Relativamente all'acido palmitico, a partire dall'intensità massima di segnale al T_0 , questo valore nel corso dell'avanzamento, al T_2 ha raggiunto il valore minimo e poi gradualmente ha incrementato il valore di intensità fino al sesto ed ultimo giorno delle osservazioni sperimentali T_6 .

Generalmente si è osservata una proporzionalità diretta nella gestione delle riserve energetiche cellulari che però, come si vedrà negli altri programmi di stimolazione acustica, ha prodotto risultati diversi a causa delle diverse cinetiche di crescita che si sono ottenute e che certamente ha influito sul bilancio energetico complessivo di ciascuna cellula sottoposta ad un diverso e modulato grado di stress attribuibile alle stimolazioni acustiche e alle consequenziali modificazioni dell'ambiente (brodo di coltura, relativamente ai metaboliti presenti, e alla qualità e quantità di radiazione luminosa disponibile per la fotosintesi).

Spettri dei campioni di microalghe prelevate dal fbr 7

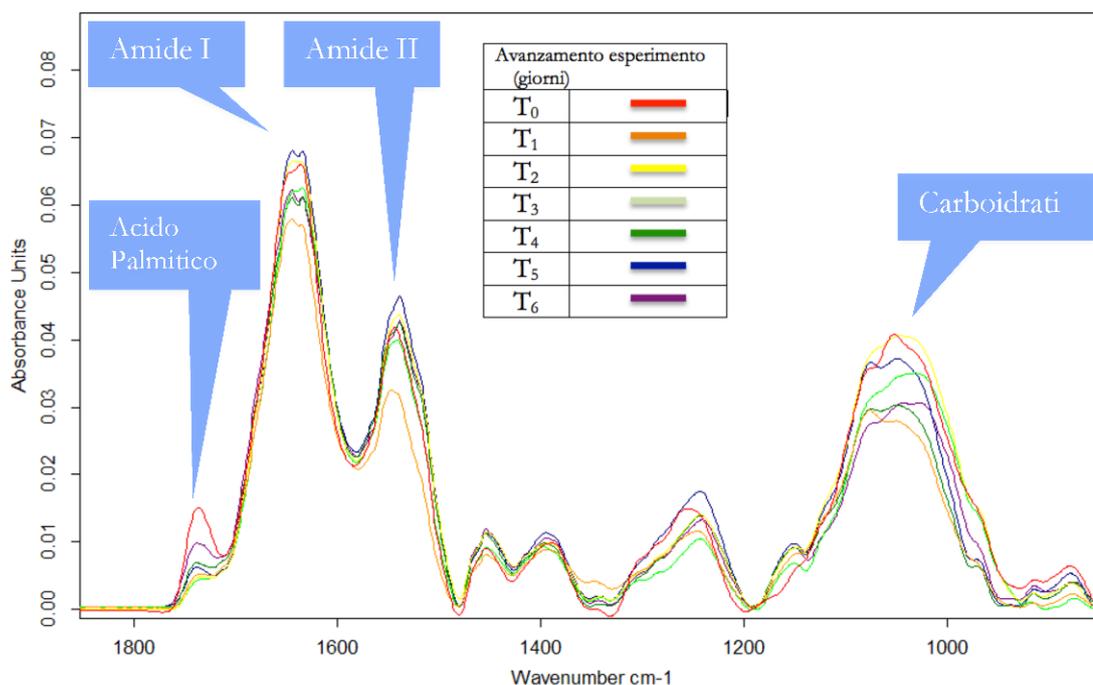


Figura 34: Analisi di Spettroscopia FTIR del campione di microalghe stimolato alla frequenza di **100 Hz** per **12,30 ore al giorno** a intensità relativa massima **+6**. Nel grafico gli spettri sono stati normalizzati alle concentrazioni di cellule per giorno di avanzamento dell'esperimento. E' stata dettagliata in questo grafico solo la regione degli spettri in cui sono visibili le bande dei segnali dei carboidrati e delle proteine.

Lo spettro di assorbimento, per le stimolazioni acustiche alla frequenza di 100 Hz all'intensità di circa 65 ± 2 dB re mPa, della durata di 12,30 ore¹⁸, in corrispondenza della regione dei carboidrati, nei giorni di avanzamento T₀, T₂, ha assunto valori abbastanza altalenanti di intensità di assorbanza, con lo stesso trend in cui la concentrazione microalgale si è triplicata. Lo stesso trend di riduzione dei carboidrati è stato osservato nei giorni di avanzamento dal T₃ al T₄ in cui si è avuto un ulteriore aumento repentino delle cell/mL.

Nelle regioni dell'Amide II e Amide I si osserva invece un incremento tra il T₁ e il T₂ e tra il T₃ e T₅ che è opposto alla riduzione dei carboidrati. Relativamente all'acido palmitico, a partire dall'intensità massima di segnale al T₀, questo valore nel corso dell'avanzamento, al T₃ ha raggiunto il valore minimo e poi risultato altalenante dal T₄ al T₆.

¹⁸ Il periodo di durata complessiva delle stimolazioni acustiche è da intendersi organizzato sulla base di 7 cicli giornalieri ciascuno della durata 30 minuti, intervallato da pause di 1,30 ore solo nella fase luce del fotoperiodo dopo 1,30 ore dall'accensione delle lampade.

Spettri dei campioni di microalghe prelevate dal fbr 9

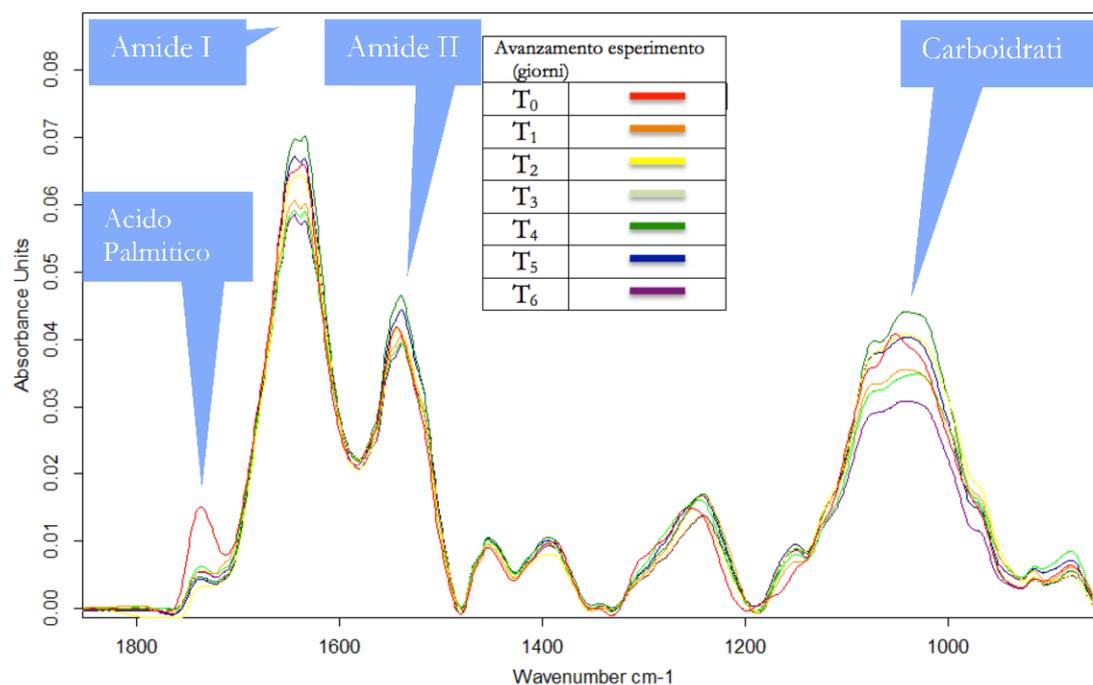


Figura 35: Analisi di Spettroscopia FTIR del campione di microalghe stimolato alla frequenza di 10.050 Hz (**10 kHz circa**) per **6,30 ore** al giorno a intensità relativa massima **+1,5**. Nel grafico gli spettri sono stati normalizzati alle concentrazioni di cellule per giorno di avanzamento dell'esperimento. E' stata dettagliata in questo grafico solo la regione degli spettri in cui sono visibili le bande dei segnali dei carboidrati e delle proteine.

Lo spettro di assorbimento, per le stimolazioni acustiche alla frequenza di 10 kHz circa all'intensità di circa 48 ± 2 dB re mPa, della durata di 6,30 ore¹⁹, in corrispondenza della regione dei carboidrati, nei giorni di avanzamento T₀, T₂, ha assunto valori abbastanza altalenanti di intensità di assorbanza, con lo stesso trend in cui la concentrazione microalgale si quasi triplicata. Lo stesso trend di riduzione dei carboidrati è stato osservato nei giorni di avanzamento dal T₃ al T₄ in cui si è avuto un ulteriore aumento delle cell/mL.

Nelle regioni dell'Amide II e Amide I si osserva invece un incremento tra il T₃ e il T₄ e subito dopo un forte decremento tra il T₅ e T₆ anche se per valori inferiori nell'intensità dei segnali rispetto al fbr 7 (sempre del primo esperimento del Doe). Relativamente all'acido

¹⁹ Il periodo di durata complessiva delle stimolazioni acustiche è da intendersi organizzato sulla base di 4 cicli giornalieri ciascuno della durata 30 minuti, intervallato da pause di 1,30 ore solo nella fase luce del fotoperiodo dopo 1,30 ore dall'accensione delle lampade.

palmitico, a partire dall'intensità massima di segnale al T_0 , questo valore nel corso dell'avanzamento, al T_2 ha avuto un incremento poi fino al T_3 per poi risultare di nuovo altalenante fino al T_6 .

5.5.3 In dettaglio la regione dello spettro: carboidrati e proteine nei fbr del secondo esperimento del Doe

Spettri dei campioni di microalghe prelevate dal fbr 2

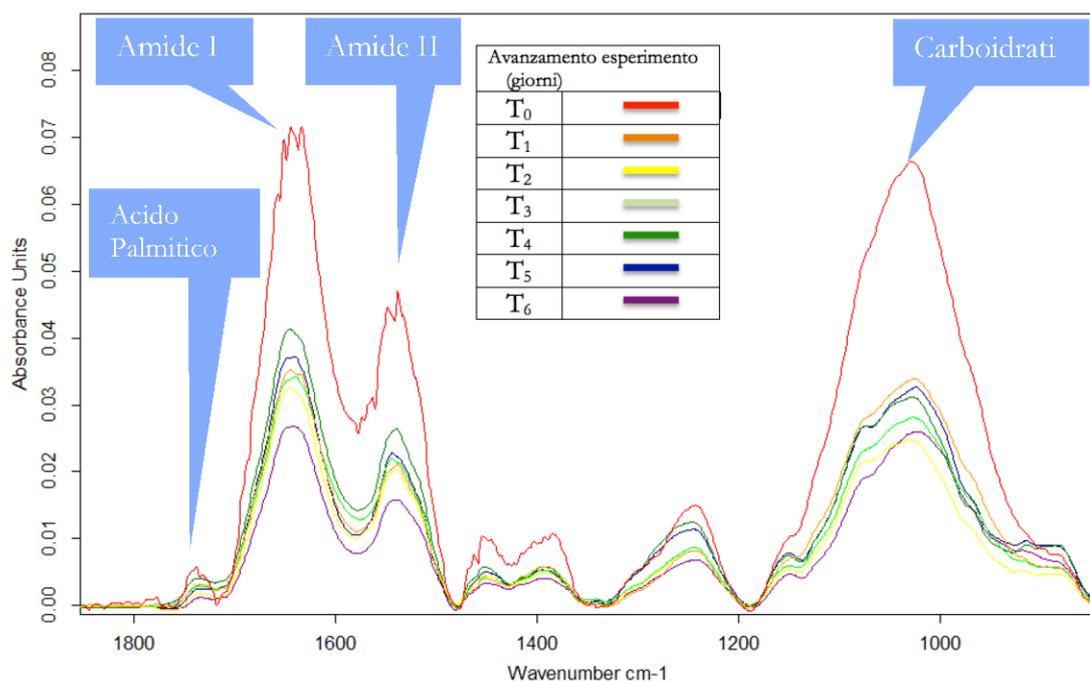


Figura 36: Analisi di Spettroscopia FTIR del campione di microalghe stimolato alla frequenza di 10.050 Hz (**10 kHz circa**) per **30 minuti al giorno** a intensità relativa massima **+6**. Nel grafico gli spettri sono stati normalizzati alle concentrazioni di cellule per giorno di avanzamento dell'esperimento. E' stata dettagliata in questo grafico solo la regione degli spettri in cui sono visibili le bande dei segnali dei carboidrati e delle proteine.

Lo spettro di assorbimento, per le stimolazioni acustiche alla frequenza di 10 kHz all'intensità di circa 65 ± 2 dB re mPa, della durata di 30 minuti al giorno²⁰, in corrispondenza della regione dei carboidrati, nei giorni di avanzamento T_0 , T_2 , ha mostrato un rapido declino fino a raggiungere il minimo valore di intensità di assorbanza, poi da T_2 a

²⁰ Solo nella fase luce del fotoperiodo dopo 1,30 ore dall'accensione delle lampade.

T_5 ha avuto un graduale incremento sempre in accordo alla fase di crescita della concentrazione microalgale osservata, con una inversione di tendenza nel punto T_6 .

Nelle regioni dell'Amide II e Amide I si osserva per entrambi lo stesso decremento fino a raggiungere un valore basso di intensità di assorbanza, con una leggera ripresa tra il T_2 e il T_4 e una successiva inversione di tendenza fino al T_6 .

Relativamente all'acido palmitico, a partire dall'intensità massima di segnale al T_0 , questo valore nel corso dell'avanzamento ha mostrato un decremento fino al T_2 poi una leggera ripresa fino al T_4 per poi diminuire nuovamente fino al T_6 .

Spettri dei campioni di microalghe prelevate dal fbr 5

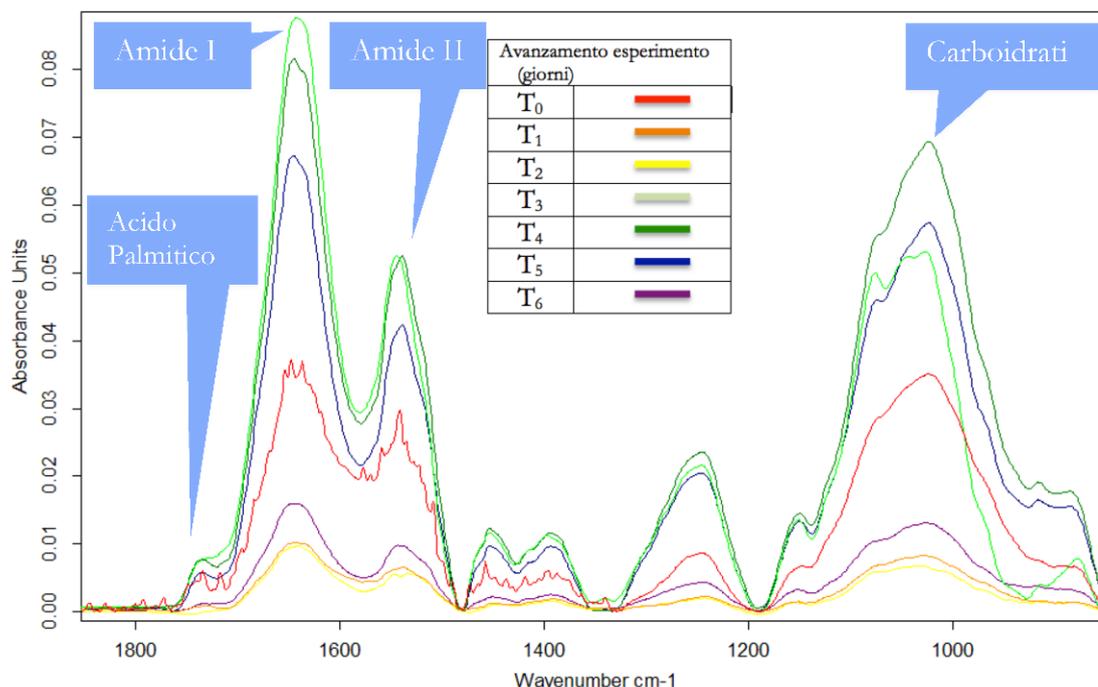


Figura 37: Analisi di Spettroscopia FTIR del campione di microalghe stimolato alla frequenza **Sweep lineare** da 100 Hz a 6 kHz per **12,30 ore al giorno** a intensità relativa **-25**. Nel grafico gli spettri sono stati normalizzati alle concentrazioni di cellule per giorno di avanzamento dell'esperimento. E' stata dettagliata in questo grafico solo la regione degli spettri in cui sono visibili le bande dei segnali dei carboidrati e delle proteine.

Lo spettro di assorbimento, per le stimolazioni acustiche alla frequenza Sweep lineare (0,1 – 6 kHz) all'intensità di circa 32 ± 2 dB re mPa, della durata di 12,30 ore al giorno²¹, in corrispondenza della regione dei carboidrati, nei giorni di avanzamento T₀, T₂, ha mostrato un rapido declino fino a raggiungere il minimo valore di intensità di assorbanza, poi da T₂ a T₄ ha avuto un graduale incremento sempre in accordo alla fase di crescita della concentrazione microalgale osservata, con una inversione di tendenza nei giorni dal T₄ al T₆.

Nelle regioni dell'Amide II e Amide I si osserva per entrambi lo stesso decremento fino a raggiungere un valore basso di intensità di assorbanza con una leggera ripresa tra il T₂ e il T₃ e una successiva inversione di tendenza fino al T₆.

²¹ Il periodo di durata complessiva delle stimolazioni acustiche è da intendersi organizzato sulla base di 7 cicli giornalieri ciascuno della durata 30 minuti, intervallato da pause di 1,30 ore solo nella fase luce del fotoperiodo dopo 1,30 ore dall'accensione delle lampade.

Relativamente all'acido palmitico il valore di intensità di assorbanza è diminuito dal T_0 al T_1 poi ha subito un incremento fino a raggiungere la massima intensità e mantenerla nei giorni T_3 e T_4 , e un successivo graduale declino fino al tempo T_6 .

Spettri dei campioni di microalghe prelevate dal fbr 7

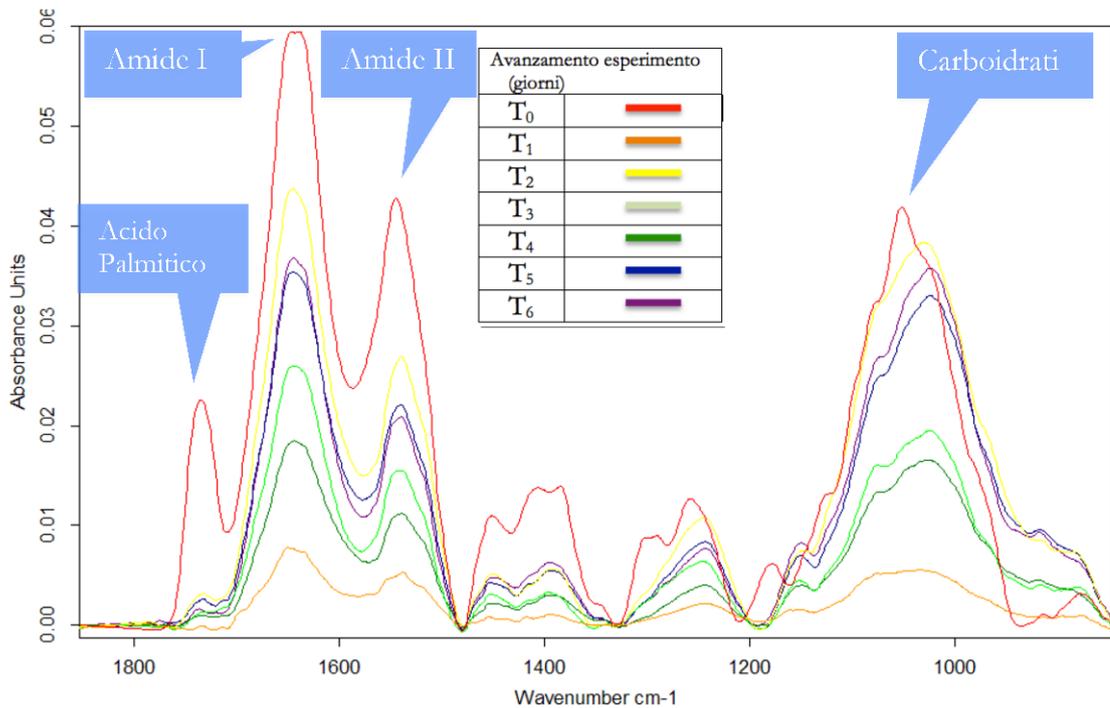


Figura 38: Analisi di Spettroscopia FTIR del campione di microalghe stimolato alla frequenza di **4.950 Hz** per **6,30 ore al giorno** a intensità relativa **+1,5**. Nel grafico gli spettri sono stati normalizzati alle concentrazioni di cellule per giorno di avanzamento dell'esperimento. E' stata dettagliata in questo grafico solo la regione degli spettri in cui sono visibili le bande dei segnali dei carboidrati e delle proteine.

Lo spettro di assorbimento, per le stimolazioni acustiche alla frequenza di 4.950 Hz e di intensità di circa 48 ± 2 dB re mPa, della durata di 6,30 ore al giorno²², in corrispondenza della regione dei carboidrati, nei giorni di avanzamento T_0 , T_1 , ha mostrato un rapido declino fino a raggiungere il minimo valore di intensità di assorbanza, poi un rapido incremento fino

²² Il periodo di durata complessiva delle stimolazioni acustiche è da intendersi organizzato sulla base di 4 cicli giornalieri ciascuno della durata 30 minuti, intervallato da pause di 1,30 ore solo nella fase luce del fotoperiodo dopo 1,30 ore dall'accensione delle lampade.

al tempo T_2 . L'andamento altalenante si è poi ripetuto con un rapido decremento tra T_2 e T_4 e infine un incremento nel valore di intensità di assorbanza fino al tempo T_6 .

Nelle regioni dell'Amide II e Amide I si osserva per entrambi lo stesso identico andamento osservato nella regione dei carboidrati, ma non in valore assoluto di intensità dei segnali misurati. Unica differenza al punto T_5 dove sia i carboidrati che l'Amide I hanno subito un incremento fino a T_6 . L'Amide II e l'Acido palmitico hanno mostrato invece un decremento nel valore di intensità di assorbanza tra T_5 e T_6 .

Anche per l'acido palmitico il valore di intensità di assorbanza ha avuto lo stesso trend dell'Amide II, ma con un diverso valore di intensità dei segnali misurati.

5.5.4 Discussione conclusiva sugli esiti delle misure FTIR nei diversi programmi di stimolazione acustica impiegati.

Dagli approfondimenti sulle singole regioni spettrali delle riserve energetiche delle cellule di *S. obliquus* sono state acquisite importanti informazioni. In particolare il rapporto tra carboidrati e proteine può essere considerato un buon marker della crescita e con buona affidabilità ha ridisegnato le cinetiche di crescita che sono state rilevate nel corso delle attività sperimentali del disegno fattoriale Doe.

In taluni casi i meccanismi di difesa messi in campo dalle colture cellulari per bilanciare le maggiori condizioni di stress ambientale imposto con le stimolazioni a frequenze e intensità superiori (10 kHz), ha messo in evidenza un rallentamento delle funzioni vitali con un lieve incremento energetico complessivo (carboidrati e proteine).

Il rapporto correlato al numero delle cellule non descrive una crescita lineare ma comunque disegna un andamento progressivo che termina con un plateau. Questo dato sta a significare che il rapporto va a saturazione prima dell'ultimo tempo di avanzamento: anche se il numero di cellule continuasse ad aumentare, il rapporto rimarrebbe costante (vedi Figura 17).

5.5.4.1 Rapporto carboidrati/proteine osservato nel secondo esperimento del Doe

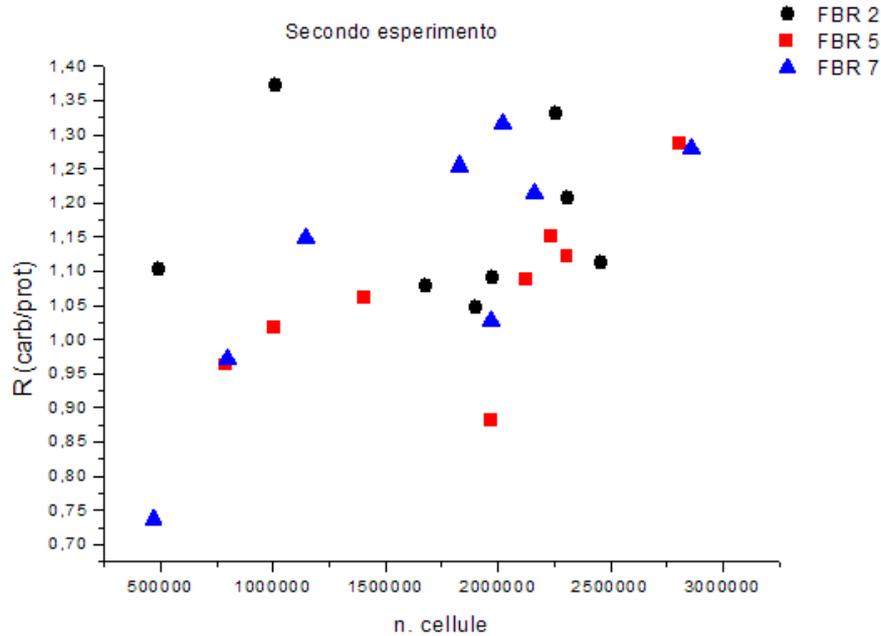


Figura 39: Rapporto carboidrati/proteine sui campioni microalgali del 2 esperimento del Doe. I dati sono stati ottenuti dagli stessi dataset utilizzati per la discussione sul comportamento delle colture microalgali nei diversi programmi di stimolazione acustica.

I dati che sono stati ottenuti con questa visualizzazione grafica di Figura 39, a prima vista risultano di difficile interpretazione, ma relativamente ai fbr 5 e 7 si riesce ad individuare un certo andamento, un trend che in qualche modo segue le cinetiche di crescita cellulari in cui il rapporto carboidrati/proteine aumenta all'aumentare delle particelle x mL e nel fbr 7 il rapporto è ancora maggiore (di circa 1 milione cell/mL) probabilmente a causa di maggiori differenze nella composizione biochimica delle cellule microalgali che si è ottenuta sottoponendo le due colture a diversi programmi di stimolazione acustica.

Ad esempio, il suono riprodotto nel fbr 7 era di intensità superiore del 50% rispetto all'intensità di riproduzione del segnale acustico sweep riprodotto nel fbr 5, con un valore di frequenze più vicine a quelle in cui si è ottenuta la massima efficienza nei rate di crescita. Infatti, lo sweep acustico che si ripete ciclicamente, riproduce per alcune frazioni di secondo le stesse frequenze impiegate nelle stimolazioni del fbr 5 (4.950 Hz).

La durata delle stimolazioni acustiche nel fbr 5 pari a 7 cicli giornalieri anziché 3, sia nel rate di crescita che nei profili di composizione non ha prodotto alcun incremento.

I valori del rapporto carboidrati/proteine relativamente al fbr 2, sono concordi a quanto già osservato nelle cinetiche di crescita dove, le frequenze maggiori (10 kHz), a valore massimo

di intensità relativa dei segnali non hanno incrementato i rate di crescita delle colture microalgali come invece osservato con le stimolazioni di bassa frequenza (0,1 – 2 kHz).

Con molta probabilità i segnali acustici di frequenza e intensità superiori ai 5 kHz, provocano un leggero effetto inibitorio provocando sulle cellule un livello di stress maggiore. Tra i meccanismi cellulari di difesa alle perturbazioni esterne di vario genere, le cellule rispondono, infatti, con un rallentamento dei cicli riproduttivi nel tentativo di preservare i propri contenuti energetici che le possano garantire ancora una buona vitalità.

Queste considerazioni scaturiscono proprio dalle osservazioni di spettroscopia FTIR dove i trend relativi ai singoli spettri del fbr 2 hanno evidenziato, dopo una crescita iniziale fino al secondo giorno di avanzamento delle colture microalgali una graduale riduzione della mitosi forse proprio a causa dello stress delle “alte” frequenze e intensità, accumulando riserve energetiche (carboidrati e proteine) e sintetizzando anche Acido Palmitico, Acido Oleico impiegati nella formazione di fosfolipidi per la crescita delle membrane cellulari (Thompson,1989).

5.5.4.2 Rapporto carboidrati/proteine osservato nel primo esperimento del Doe

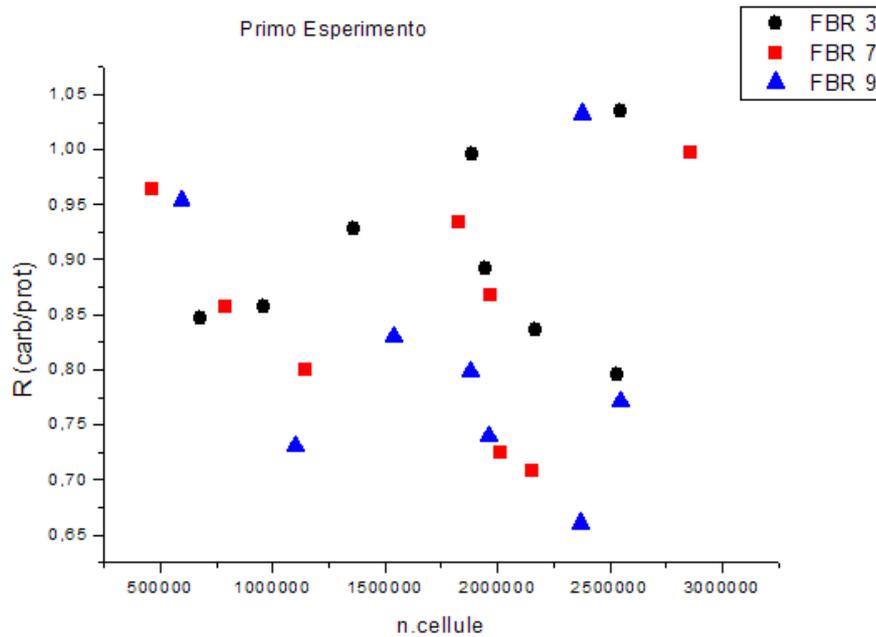


Figura 40: Rapporto carboidrati/proteine sui campioni microalgali del 1 esperimento del Doe. I dati sono stati ottenuti dagli stessi dataset utilizzati per la discussione sul comportamento delle colture microalgali nei diversi programmi di stimolazione acustica.

Anche nel primo esperimento del Doe, i dati ottenuti in questa visualizzazione grafica (Figura 40), a prima vista risultano di difficile interpretazione. Ovviamente devono essere reinterpretati nella logica dei rispettivi programmi di stimolazione acustica impiegati dove a partire dai 30 minuti di stimolazioni giornaliere con la frequenza di 100 Hz e una intensità del segnale pari a (+6), è stato testato nel fbr 7 lo stesso programma, ma per un periodo superiore (da 1 solo ciclo di stimolazione acustica nel fbr 2, si è passati a 7 cicli giornalieri pari a 12,30 ore complessive), osservando una risposta nei termini di incremento di concentrazione di cellule microalgali rispettivamente pari a $5,3$ e $6,1 \times 10^6$ cell/mL rispetto al fbr 9 (stimolato acusticamente per 4 cicli di 30 minuti, con un suono alla frequenza 10 kHz circa e intensità pari a + 1,5) che ha mostrato al termine del sesto giorno un valore intermedio di cell/mL pari a $5,5 \times 10^6$ ma con una diversa pendenza nella retta di regressione rispetto ai fbr 2 e 7, dimostrando quindi una cinetica di crescita più lenta soprattutto nei primi giorni dell'esperimento.

Ora, alla luce delle osservazioni fatte, e dopo aver chiarito che i migliori effetti di crescita sono stati riscontrati nei range delle basse frequenze (0,1 – 2 kHz), se si osserva il grafico di

figura 18 relativamente al valore dei rapporti carboidrati/proteine, se si considera outlier il valore in ordinata superiore ad 1 per il fbr 9 (triangolo blu), visto che non è stato replicato nel suo intorno da nessun altro valore, si possono invece osservare e argomentare due trend rispettivamente riferibili al fbr 3 (pallini di colore nero) e fbr 7 (quadratini rossi), se rapportati verosimilmente alle concentrazioni microalgali in crescita, senza inversione di tendenza (nel numero di cell/mL). Il trend per il fbr 3 sarebbe supportato da 5 distinti valori del rapporto carboidrati/proteine, a partire dal valore in ordinata pari a 0,85 e a seguire 0,86 – 0,93 – 1,00 e 1,025 circa (pallino nero accanto al triangolo blu). Riguardo il fbr 7, i punti risultano maggiormente scatterati e gli unici tre che sembrano seguire un trend in relazione all'incremento della concentrazione delle particelle per mL partirebbero dal quadratino rosso con valore in ordinata di 0,86 e a seguire i valori di 0,925 e circa 1,00.

Nonostante questa difficile ricostruzione, i valori del rapporto inferiori a 0,70 non sembrano mostrare alcuna correlazione con le cinetiche di crescita ottenute e sono state quindi formulate alcune ipotesi. La più accreditata e supportata da fenomenologia ricorrente in altri lavori scientifici, sarebbe da attribuire alle modalità di conservazione e al tempo di invecchiamento dei campioni prima delle analisi FTIR, di cui si è parlato nel paragrafo 5.3.2 a proposito dei lavori riferiti a Thompson,1989; Anderson et al., 1995; Benergama et Goto, 2010. In effetti, le analisi mostrate in precedenza e relative ai campioni microalgali del secondo esperimento del Doe, sono state effettuate dopo pochi giorni dal termine dell'esperimento rispetto ai due mesi circa di conservazione dei campioni del primo esperimento del Doe.

Nonostante ciò, si è ritenuto di voler mostrare comunque il campo di variabilità entro cui si è osservata una variazione nel rapporto carboidrati/proteine poiché esprime in ogni caso informazioni relative all'ipotesi formulata e quindi ad un diverso comportamento delle cellule microalgali che, dovendosi adattare a situazioni ostili (al buio e alla temperatura di + 4 °C), hanno ridotto al minimo le proprie funzioni vitali consumando e/o trasformando le riserve energetiche biodisponibili fino al loro sesto ed ultimo giorno di attività fotosintetica.

Di tutte quante queste osservazioni e relativamente alle ipotesi formulate, se ne terrà conto per la formulazione del successivo setup sperimentale in modo che questi esami all'infrarosso e quelli fluorimetrici vengano effettuati entro poche ore dal prelievo dei campioni microalgali dai fbr stimolati acusticamente.

5.6 La tecnica di analisi Particle Image Velocimetry (mPIV) per visualizzare gli effetti delle stimolazioni acustiche sulla microalga *Scenedesmus obliquus*

La possibilità di poter analizzare il movimento di un fluido sulla micro scala (Wereley and Meinhart, 2010) richiede una serie scelte oculate per quanto riguarda l'illuminazione delle cellule nel micro canale, il sistema di acquisizione delle immagini e l'algoritmo e il software di elaborazione. In questa preliminare sperimentazione condotta da Massimiliano Rossi presso "Institut für Strömungsmechanik und Aerodynamik LRT-7 Universität der Bundeswehr München", è stata in parte utilizzata la tecnica Particle Image Velocimetry (mPIV), presentata da Rossi et al., 2006, in cui lo stesso autore in collaborando a questo lavoro di ricerca ha effettuato delle prove con un campione di *Scenedesmus obliquus* impiegata nelle prove di stimolazione con le onde acustiche, come aveva fatto in precedenza per le cellule endoteliali.

Il setup sperimentale ha previsto l'impiego di un microcanale montato tramite un supporto su un vetrino da microscopio. Al microcanale era collegato l'attuatore piezoelettrico con il quale sono stati riprodotti i segnali acustici prodotti dal generatore dei segnali.

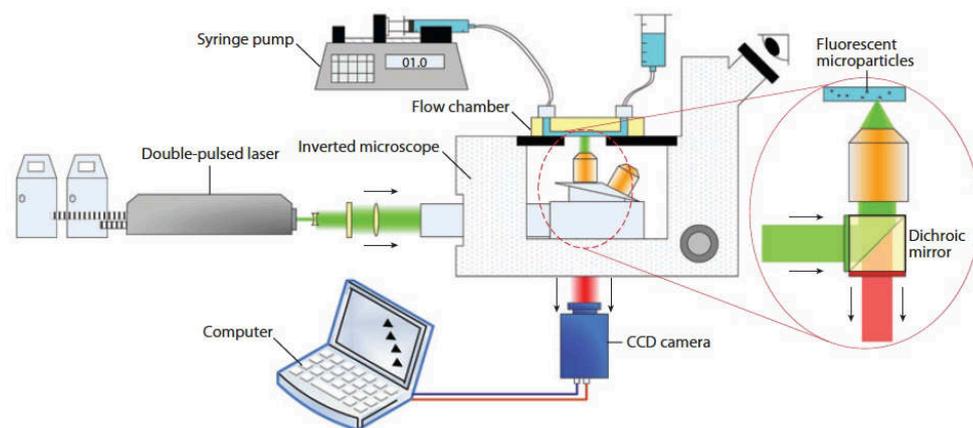


Figura41: Setup sperimentale della tecnica mPIV tratta da Wereley and Meinhart, 2010.



Figura 42: Sul banco per la sperimentazione mPIV, partendo da sinistra si osservano il generatore dei segnali acustici, il dispositivo piezoelettrico impiegato per la riproduzione dei segnali acustici, il micro canale posizionato sul vetrino copri oggetto del microscopio invertito Zeiss.

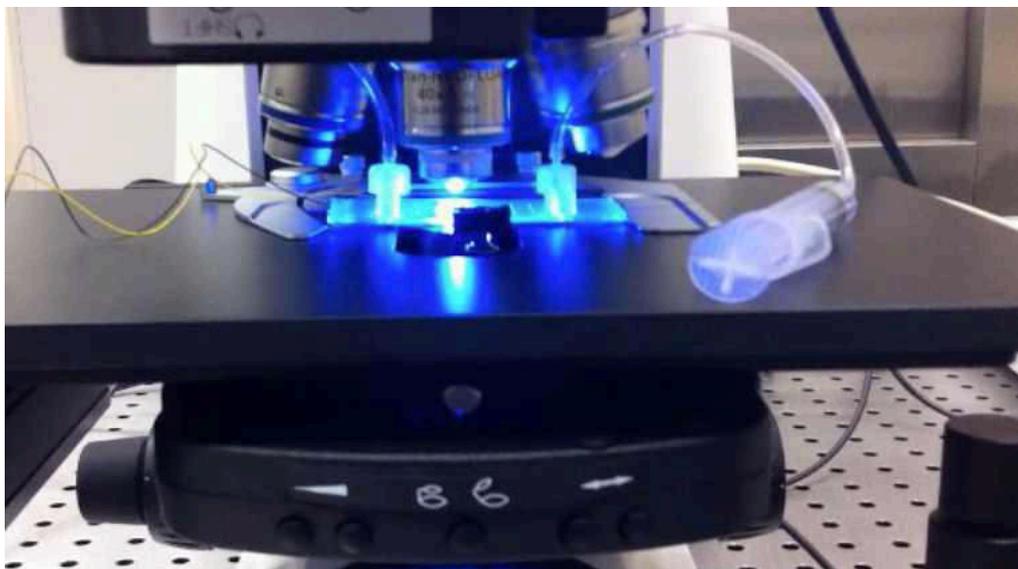


Figura 43: Nella fotografia sul vetrino copri oggetti del microscopio, illuminato dalla luce blu, è posizionato il micro canale all'interno del quale sono state introdotte le microalghe *Scenedesmus obliquus* per le prove a diverse frequenze di segnale acustico riprodotto dal trasduttore piezoelettrico pilotato da un generatore di segnali.



Figura 44: Il particolare del microcanale e del dispositivo piezoelettrico impiegato per la riproduzione dei segnali acustici dalle dimensioni davvero ridotte come si osserva in raffronto alla punta della matitanella foto a sinistra.

Con l'impiego di una fonte luminosa sono stati riprodotti nel microcanale impulsi di luce alla lunghezza d'onda di 532nm lungo lo stesso percorso ottico sono stati acquisiti i filmati sul movimento delle cellule microalgali con le diverse frequenze acustiche. Dal video registrato è stata tratta l'immagine in Figura 17. I fotogrammi digitali sono stati rielaborati con un software di imaging con il quale tramite la presenza di microsferi di polimero PEG rivestite con un diametro 560 nm, utilizzate come particelle traccianti, è stato ricostruito il movimento delle cellule microalgali sospinte dalle azioni di compressione e rarefazione delle diverse forme d'onda generate nel microcanale.

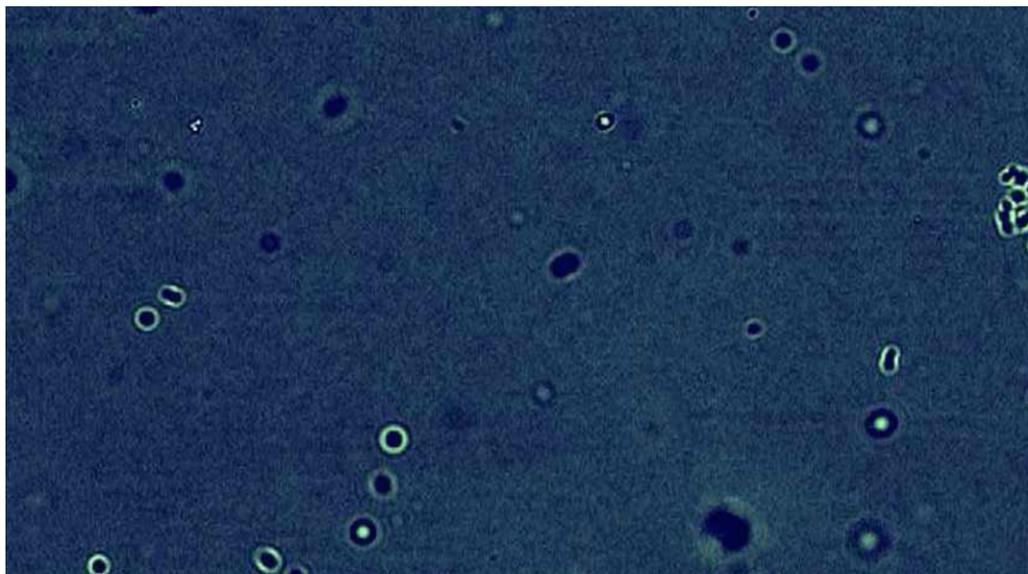


Figura 45: L'immagine ottenuta al microscopio delle microalghe di *Scenedesmus obliquus* presenti nel micro canale e studiate con la tecnica mPIV.

Sono state quindi effettuate acquisizioni di filmati e immagini della *Scenedesmus obliquus* iniettata nel micro canale durante la riproduzione di suoni a partire dai 100, 500, 1000 e 5000 Hz.

La successiva elaborazione software ha permesso di ricostruire con l'ausilio delle particelle traccianti, il moto delle cellule di *Scenedesmus obliquus* nel campo acustico generato nel micro canale dal trasduttore piezoelettrico durante le diverse riproduzioni sonore ottenendo filmati e immagini come quella di Figura 46.

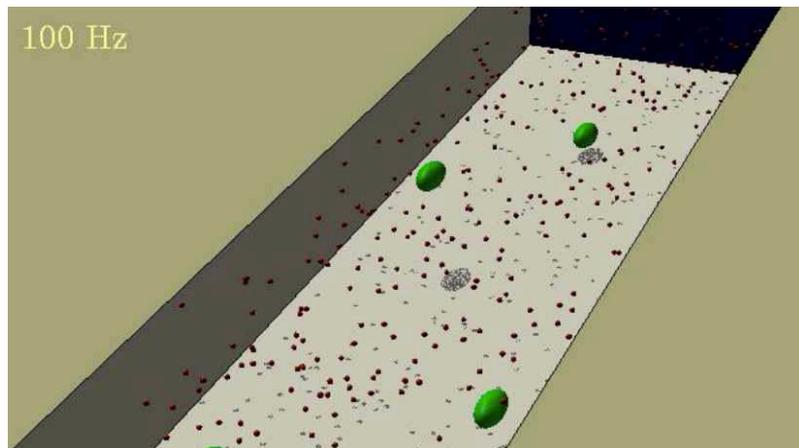


Figura 46: dal movimento delle sfere traccianti, è stato possibile ricostruire anche il movimento degli sferoidi prolato di colore verde (cellule di *Scenedesmus obliquus*).

Nel prossimo futuro l'idea è quella di approfondire e studiare le deformazioni sulla parete cellulare sempre con questa tecnica al fine di acquisire maggiori informazioni su cosa accade realmente alle cellule di *Scenedesmus obliquus* nelle diverse condizioni di stimolazioni acustiche.

5.6.1 Contenuti multimediali della tecnica mPIV

Delle attività sperimentali è stato preparato un video di presentazione ed illustrazione delle varie fasi sperimentali e dei preliminari effetti di oscillazione delle cellule microalgali che si sono osservate, che viene allegato al supporto informatico cd di questa tesi di dottorato.

Conclusioni

Alla luce delle attività di ricerca svolte è possibile affermare che l'obiettivo principale del lavoro è stato raggiunto. L'idea e lo scopo della ricerca erano di valutare se l'impiego della tecnologia acustica potesse ritenersi valida nell'incrementare positivamente le cinetiche di crescita delle microalghe e, in particolar modo della *Scenedesmus obliquus*, ritenuta dalla comunità scientifica uno tra gli organismi più efficienti e resistenti nell'assimilazione di flussi di CO₂ da combustione.

Le attività sperimentali in merito alle stimolazioni con le onde acustiche di bassa frequenza e intensità hanno evidenziato incrementi del rate di crescita della *Scenedesmus obliquus* del 320% rispetto alle colture di controllo, cresciute in completa assenza di perturbazioni e interazioni ambientali.

Con l'ausilio del disegno fattoriale Doe, si è cercato di individuare l'intervallo delle frequenze acustiche (0,1 – 2 kHz), dell'intensità dei segnali (65 dB re mPa)²³ e dei tempi di stimolazione ottimali (cicli di stimolazione della durata di 30 minuti intervallati da pause di 1,30 ore per una durata complessiva di 12,30 ore) arrivando alla costruzione di una superficie di risposta tridimensionale che ha chiaramente individuato l'area di maggiore incremento del rate di crescita.

Dai differenti programmi di stimolazione acustica sono state ottenute risposte diverse per quanto riguarda il rate di crescita, il numero e le dimensioni delle singole cellule, la distribuzione dimensionale degli aggregati, che hanno influito determinando variazioni sul profilo biochimico delle cellule che sono state approfondite attraverso le analisi fluorimetriche e FTIR che saranno oggetto di ulteriori verifiche nell'immediato futuro.

Lo studio ha richiesto un lungo e complesso lavoro di messa a punto di dispositivi e metodi innovativi per favorire la crescita, il controllo e il monitoraggio continuo delle colture microalgali in fotobioreattori seriali. In particolare tale attività ha portato:

1. alla realizzazione di un sistema di *agitazione sincrono, seriale e automatizzato delle colture a basso impatto acustico*, per non interferire con le onde sonore oggetto di studio;

²³ Le misure di intensità acustica sono state rilevate nel corso della elaborazione FFT delle tracce audio registrate con il sistema di acquisizione scheda audio Presonus Fire Studio e idrofono preamplificato impiegando per tutte le misure parametri fissi: filtro Hi Pass pari a -1 e Gain 26.

2. alla costruzione di fotobioreattori di specifica geometria e materiale particolarmente efficienti nella trasmissione delle onde acustiche e della radiazione elettromagnetica;
3. alla messa a punto di metodi e protocolli di analisi semplici rapidi ed originali per la misura in tempo reale della crescita microalgale
4. all'impiego di tecniche di analisi sofisticate per lo studio degli effetti della meccanotrasduzione sulla morfologia e sul metabolismo microalgale indotti da stress acustici.

Il lavoro di ricerca svolto ha portato alla realizzazione di un banco sperimentale con 12 fotobioreattori e alla messa a punto di un protocollo operativo specifico che si sono rivelati indispensabili per il raggiungimento degli obiettivi prefissati. Il sistema sperimentale è estremamente promettente presentando caratteristiche uniche per il controllo e monitoraggio continuo della crescita microalgale anche in fotobioreattori di grossi impianti industriali, finalizzati all'abbattimento della CO₂ o alla produzione di biomassa microalgale a scopo energetico (biodiesel) o alimentare (per prodotti ittici). Esso, infatti, necessita di strumentazione di basso costo, facilmente reperibile ed è caratterizzato da:

- estrema semplicità e rapidità di risposta;
- compatibilmente con la complessità del sistema realizzato e in condizioni sperimentali controllate e ottimizzate, il protocollo ha dimostrato buona riproducibilità.;
- mediante opportuno software e retta di calibrazione del campo acustico fornisce direttamente e continuamente nel tempo misure di concentrazione microalgale;
- può essere dotato di opportuno banco di comando per l'automatizzazione delle misure;
- è attivabile a distanza mediante sistema elettronico;
- può essere facilmente utilizzato per la gestione di un numero elevato di fotobioreattori.

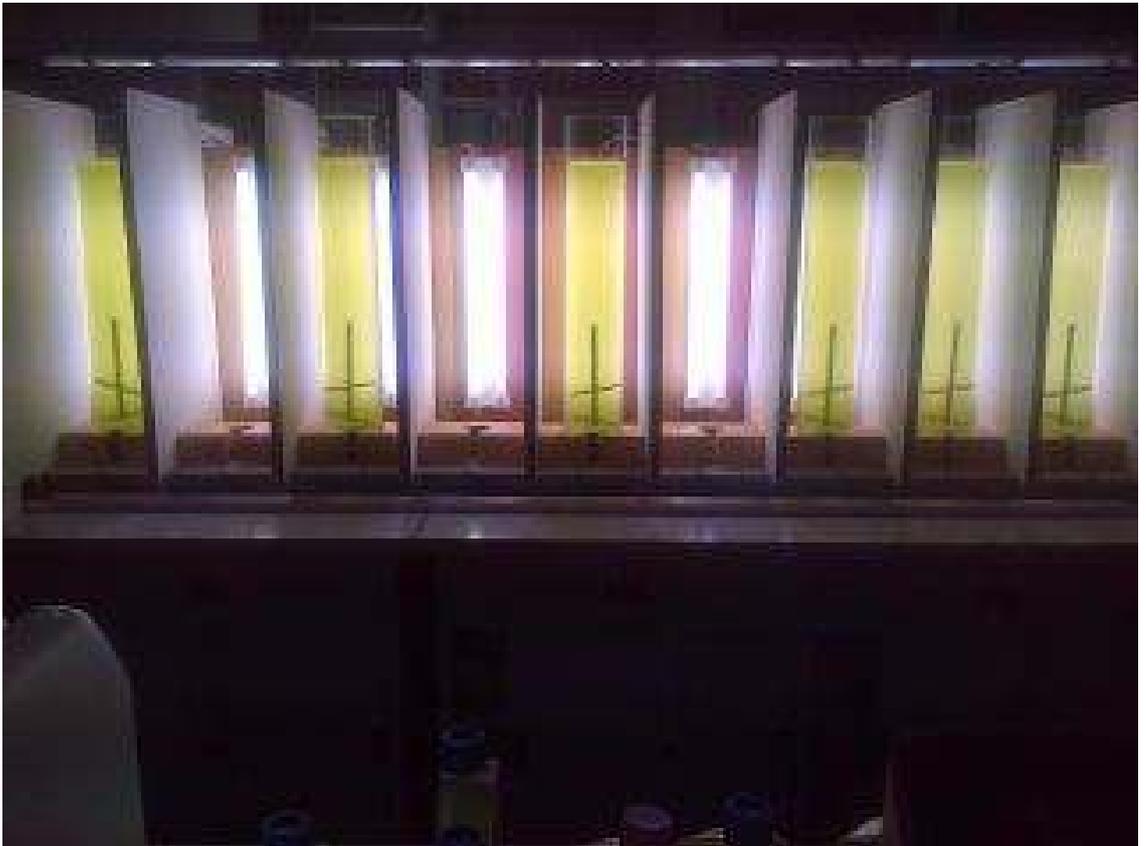
In conclusione il banco sperimentale associato alle microalghe *Scenedesmus obliquus* e ai fbr, facilmente scalabile a livello industriale, potrebbe rappresentare un efficiente e innovativo modulo per l'abbattimento della CO₂ e per la conversione e il recupero di energia alternativa.

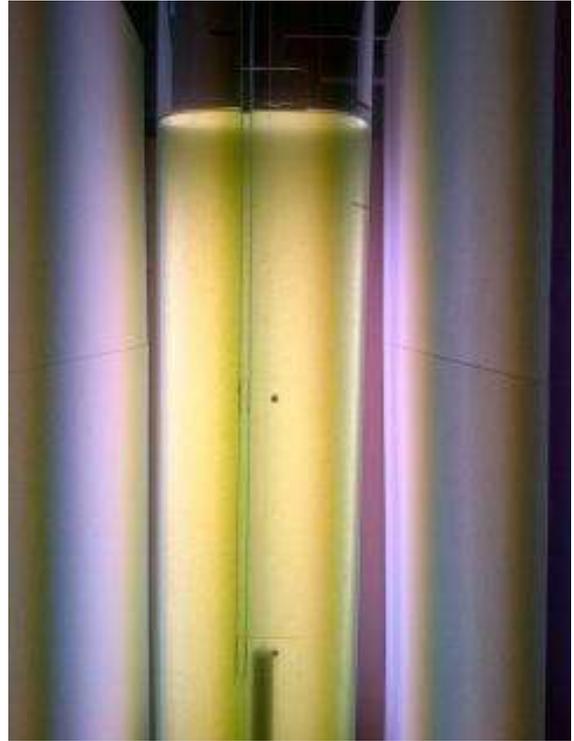
Galleria Fotografica



Documentazione fotografica del progetto di ricerca “Progetto Alghe” a cura dello studio Rocco d’Ambrosi di Bastia Umbra (PG).







Bibliografia

- Acien Fernandez, F.G., Garcia Camacho, F., Sanchez Perez, J.A., Fernandez Sevilla, J.M., Molina Grima, E.. A model for light distribution and average solar irradiance inside outdoor tubular photobioreactors for the microalgal mass culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 1997.
- Aggio, R.B.M, Obolonkin V., and Villas-Boas S. G.. Sonic vibration affects the metabolism of yeast cells growing in liquid culture: a metabolomic study. *Metabolomics*, 2011.
- Apodaca Gerard. Modulation of membrane traffic by mechanical stimuli. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002.
- Argese E., Bettiol C., Bordignon G., Minello F. “Pianificazione di strategie colturali e tecnologiche per la produzione da biomasse vegetali di biocarburanti di seconda e terza generazione ad elevata compatibilità ambientale e sostenibilità economica Relazione Conclusiva “ Università Cà Foscari – Facoltà di Scienze Ambientali, 2006.
- Azencott Harold R., Gary F. P., Prausnitz M.R. “Influence of the cell wall on intracellular delivery to algal cells by Electroporation and Sonication“ *Ultrasound in Med. & Biol.*, 2007.
- Barber and Kühlbrandt, Photosystem II. *Current Opinion in Structural Biology* Elsevier Science Ltd ISSN 0959-440X, 1999.
- Barker D.J., Turner S.A., Napier-Moore P.A., Clark M. and Davison J.E.. CO₂ Capture in the Cement Industry. *Energy Procedia*, 2009.
- Becker E.W., “Microalgae: biotechnology and microbiology” Cambridge University Press, 1994
- Beizhen Xie B., Wang L., Liu H., “Using low intensity ultrasound to improve the efficiency of biological phosphorus removal” *Ultrasonics Sonochemistry*, 2008
- Biggs, W.W., A.R. Edison, J.D. Easton, K.W. Brown, J.W. Maranville and M.D. Clegg. Photosynthesis light sensor and meter. *Ecology*, 1971.
- Bozhkova M., Dencheva A.” Ultrasound influence on *Scenedesmus acutus* Productivity and protein content” *Acad. M. Popov Institute of Plant Physiology*, 1993
- Burlew J.S. “Algal culture from laboratory to pilot plant” *Carneige*, 1953
- Cai Weiming, Wang Ning, Dunford Nurhan Targut, Zhu Songming, He Huinong. Study of audible sound effect on algae growth. *Asabe Meeting Presentation*, 2013
- Cara A. C., Leckey C.A., Hinders M.K. “Viscous effects in the acoustic manipulation of algae for biofuel production” *Journal Of Applied Phycology*, 2011
- Carvalho Ana P., Silva Susana O., Baptista José M., Xavier Malcata F.. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Appl Microbiol*

- Biotechnol, 2011.
- Çelekli Abuzer, Balcı Muharrem, Bozkurt Hüseyin. Modelling of *Scenedesmus obliquus*; function of nutrients with modified Gompertz model. *Bioresource Technology*, 2008.
- Cervantes Alma Toledo, Morales Marcia, Novelo Eberto, Revah Sergio. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. *Bioresource Technology*, 2013.
- Clark, A.J., W. Landolt, J.B. Bucher and Strasser R.J.. Beech (*Fagus sylvatica*) response to ozone exposure assessed with a chlorophyll a fluorescence performance index. *Environmental Pollution*, 2000.
- De Morais M. G., Costa J. A.V. “Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide” *Energy Conversion and Management*, 2007
- DemmigAdams, B. and W.W. Adams 1996. Xanthophyll cycle and light stress in nature: Uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta*. 198:460-470
- Derringer G. and Suich R.. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Tecnology*, 1980
- Duygu Dilek Yalcin, Udoh Abel U., Ozer Tulay Baykal Akbulut, Ilkay Aydin Erkaya, Acikgoz, Yildiz Kazim and Guler Deniz. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833. *African Journal of Biotechnology*, 2012
- Eltayeb A.E., Khalil O., Al-Hallaj S., Teymour F. “Design and Modeling of Optical Modules for use in the Emerald Forest Algae Photobioreactors “Computers and Chemical Engineering, 2010
- Fang Li Fang, Hua Yang Zhong, Zeng Rong, Yang Gai, Chang Xu, Bao Yan Jia, and Li Hou Ya. Microalgae Capture of CO₂ from Actual Flue Gas Discharged from a Combustion Chamber. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2011.
- García-Camacho F., Sa´nchez-Miro´n A., Molina-Grima E., Camacho-Rubio F., Merchuck J.C.. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae including photoacclimation dynamics. *Journal of Theoretical Biology*, 2012.
- Genty, B., Briantais J.M. and Baker N.R.. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1989.
- Giordano Mario, Kansiz Mustafa, Heraud Philip, Beardall John, Wood Bayden, McNaughton Don. Fourier Transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii*(bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 2001.
- Greenwell H.C., Laurens L.M.L., Shields R.J., Lovitt, R.W., Flynn, K.J., “Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges” *Journal of the Royal*

- Society, Interface / the Royal Society, 2010
- Guzzon, A., Congestri, R., Albertano, P..Light-induced changes in photosynthesis and structure of cyanobacterial cultured biofilms from an Italian wastewater treatment plant. Arch Hydrobiol. Algol. Studies, 2005.
- Hillebrand H., Dürselen C.D., Kirschtel D., Pollingher U., Zohary T. “Biovolume calculation for Pelagic And Benthic Microalgae” J. Phycol. 35, 1999
- Hodaifa Gassan, Ma Eugenia Martínez, and Sebastián Sánchez. Influence of pH on the Culture of *Scenedesmus obliquus* in Olive-mill Wastewater. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2009.
- Hoki M., Sato K., Noro A., Nakatani M. “Effects of Sonic Wave Upon Growth of Algae” ISHS Acta Horticulturae 440: International Symposium on Plant Production in Closed Ecosystems, 1996
- Hsin Ho S., Yen Chen C., Ling Yeh K., Ming Chen W., Yue Lin C., Shu Chang. J. “Characterization of photosynthetic carbon dioxide fixation ability of indigenous *Scenedesmus obliquus* isolates” Biochemical Engineering Journal, 2010
- Hsin Ho Shih, Chen Wen Ming, Chang Jo Shu. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. Bioresource Technology, 2010.
- Hunt R.W., Zavalin A., Bhatnagar A., Chinnasamy S., Das K.C., “Electromagnetic Biostimulation of Living Cultures for Biotechnology, Biofuel and Bioenergy Applications “ , International Journal of Molecular Sciences , 2009
- Ioannidis Nikolaos E., Liliana Sfichi-Duke, Kotzabasis Kiriakos. Polyamines stimulate non-photochemical quenching of chlorophyll a fluorescence in *Scenedesmus obliquus*. 2011 Springer Science+Business Media B.V. 2011
- Irving Tyler Edward. Factors Influencing the Formation and Development of Microalgal Biofilms . A thesis submitted Master of Applied Science Chemical Engineering and Applied Chemistry University of Toronto,2010.
- Jeong Mi-Jeong, Shim Chang-Ki, Lee Jin-Ohk, Kwon Hawk-Bin, Kim Yang-Han , Lee Seong-Kon, Byun Myeong-Ok, Park Soo-Chul. Plant gene responses to frequency-specific sound signals. Mol Breeding,2008.
- Jiang Shi Ren, Rao HuaJun, Chen ZeJie, Liang MengMeng, Li LingLing. Effects of Sonic Waves at different Frequencies on Propagation of *Chlorella pyrenoidosa*. Journal Agricultural Science & Technology, 2012.
- Jundt Gregor, Radu Adrian, Fort Emmanuel, Duda Jan, and Vach Holger. Vibrational modes of partly filled wine glasses. Acoustical Society of America, 2006

- Kaftan David, Meszaros Tibor, Whitmarsh John, and Nedbal Ladislav. Characterization of Photosystem II Activity and Heterogeneity during the Cell Cycle of the Green Alga *Scenedesmus quadricauda*. *Plant Physiology*, 1999.
- Kitajima, H. and Butler W.L.. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1975.
- Krasovitski Boris, Frenkelb Victor, Shohama Shy, and Kimmela Eitan. Intramembrane cavitation as a unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects. *PNAS Early Edition*, 2011.
- Lauga Eric and Powers Thomas R. The hydrodynamics of swimming microorganisms. *Reports on Progress in Physics*, 2009
- Le Evan , Sage Hiibel e Chanwoo Parco. Investigation of the Effect of Growth From Low to High Biomass Concentration Inside a Photobioreactor on Hydrodynamic Properties of *Scenedesmus obliquus*. *J. Energia risor. Technol.*, 2011.
- Lee C.G., Palsson B.O. “High-Density Algal Photobioreactors Using Light-Emitting Diodes” *Journal Of Fermentation And Bidengineering* , 1995
- Lee Ying J. C., Dayou C., Phin C.K. “Experimental Investigation on the Effects of Audible Sound to the Growth of *Escherichia coli*” *Modern Applied Science*, 2009
- Lehr F. and Posten C. “Closed photo-bioreactors as tools for biofuel Production “Current Opinion in Biotechnology, 2009
- Leonardi Patricia I., Popovich Cecilia A. and Damiani M. Cecilia. Feedstocks for Second-Generation Biodiesel: Microalgae’s Biology and Oil Composition, Economic Effects of Biofuel Production, Dr. Marco Aurelio Dos Santos Bernardes, 2011.
- Liu, Ying L., Wei W., Min Z., Peng X., Zhou Y. “PSII-efficiency, polysaccharide production, and phenotypic plasticity of *Scenedesmus obliquus* in response to changes in metabolic carbon flux” *Biochemical Systematics and Ecology*, 2010
- Mandal, Shovon M., Nirupama M. “Waste utilization and biodiesel production by the green microalga *Scenedesmus obliquus*” *Applied and environmental microbiology*, 2011
- Maraskolhe Vinod R., Warghat Ashish R., Charan Guru and Nandkar P. B.. Carbon sequestration potential of *Scenedesmus* species (Microalgae) under the fresh water ecosystem. *African Journal of Agricultural Research*, 2012.
- Matsubishi A., Pankrushina A. N., Takeuchi S., Ohshima H., Miyoi H., Endoh K., Murayama K., Watanabe H., Endo S., Tobi M. et al “Production of sound waves by bacterial cells and the response of bacterial cells to sound” *The Journal of general and applied microbiology*, 1998
- Merzlyak, M.N. and A. Gitelson. Why and What for the Leaves Are Yellow in Autumn - on the Interpretation of Optical-Spectra of Senescing Leaves (*Acer-Platanoides L.*). *Journal of Plant Physiolog*, 1995.

- Miller Douglas L.. Effects of a High-Amplitude 1-MHz Standing Ultrasonic Field on the Algae *Hydrodictyon*. Ultrasonic, Ferroelectrics and Frequency Control, 1986.
- Mitra M. and Melis A. "Optical properties of microalgae for enhanced biofuels production". Optics Express, 2008.
- Mitsunori Iehana. Kinetic analysis of the growth of *Spirulina* sp. in batch culture. Journal of Fermentation Technology, 1987.
- Molina Grima, E., Acien Fernandez, F.G., Garcia Camacho, F., Christi, Y., Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale-up. J. Biotechnol., 1999.
- Pedley T. J., Kessler J. O.. Hydrodynamic Phenomena in Suspensions of Swimming microorganisms. Annu. Rev. Fluid Mech., 1992.
- Pitt W.G. and Ross S.A. "Ultrasound Increases The Rate Of Bacterial Cell Growth" Biotechnol Prog., 2003.
- Rahman S.M., Dinar A., Larson D.F., "Diffusion of Kyoto's clean development mechanism " Technological Forecasting & Social Change, 2010
- Richardson K., Beardall J. and Raven A.. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies . New Phytol., 1983.
- Rokhina E.V., Piet Lens and Jurate Virkutyte "Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. "Review - Trends in Biotechnology, 2009
- Shaobin G., Ying W., Kewei L., Shichang L., Shengyun M., Qiannan W., Rong W. "A pilot study of the effect of audible sound on the growth of *Escherichia coli*" Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010.
- Sheehan J., Camobreco V., Duffield J., Graboski M., Shapouri H. "Life Cycle Inventory of Biodiesel and Petroleum Diesel for Use in an Urban Bus", National Renewable Energy Laboratory - Colorado, 1998.
- Sorokin, C.. Dry weight, packed cell volume and optical density. In: Stein J.R. (Ed), Culture methods and growths measurements, Cambridge University, 1973.
- Sparber Karin. Dinamica del fitoplancton del Lago di Candia a diverse scale spaziali e temporali. Università degli Studi di Parma. Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali, 2006.
- Stainer, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G.). Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). Bacteriol. Rev., 1971.
- Strasser, R.J., Srivastava A. and M. Tsimilli-Michael. Screening the vitality and photosynthetic activity of plants by fluorescence transient. In Crop Improvement for Food Security Eds, 1999.

- Strasser, R.J., Srivastava A. and M. Tsimilli-Michael 2000. The fluorescence transient as a tool to characterise and screen photosynthetic samples. In *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation* Eds. M. Yunus, U. Pathre and P. Mohanty. Taylor & Francis, London, 2000.
- Suo-Lian Guoa, Xin-Qing Zhaoa, Ying Tanga, Chun Wana, Md. Asraful Alama, Shih-Hsin Hob, Feng-Wu Baia, Jo-Shu Chang. Establishment of an efficient genetic transformation system in *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Biotechnology*, 2012.
- Thompson Guy A.. Membrane Acclimation by Unicellular Organisms in Response to Temperature Change. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1989.
- Weinberger P., Das G. “The effect of an audible and low ultrasound frequency on the growth of synchronized cultures of *Scenedesmus obtusiusculus* “ *Canadian Journal of Botany*, 1972.
- Wendler Joachim and Holzwarth Alfred R.. State transition in the green alga *Scenedesmus obliquus* probed by time-resolved Chlorophyll fluorescence spectroscopy and global data analysis. *Biophysical Journal*, 1987.
- Wereley Steven T. and. Meinhart Carl D.. Recent Advances in Micro-Particle Image Velocimetry. *The Annual Review of Fluid Mechanics*, 2010.
- Willem J., Zijffers F., Salim S., Janssen M., Tramper J., Wijffels R.H. “Capturing sunlight into a photobioreactor: Ray tracing simulations of the propagation of light from capture to distribution into the reactor “*Chemical Engineering Journal*, 2008.
- Williams Peter J. le B. and Laurens Lieve M. L.. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 2010.
- Xin L., Hong-Ying h. Yu-Ping Z. “Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature” *Bioresource technology*, 2011.
- Yin Jie, Cao Zexian, Li Chaorong, Sheinmana Izhak, and Chena Xi. Stress-driven buckling patterns in spheroidal core/shell structures, Communicated by John W. Hutchinson, Harvard University, Cambridge, MA, 2008.
- Zhao H.C., Wu J., Xi B.S., Wang B.C.. Effects of sound-wave stimulation on the secondary structure of plasma membrane protein of tobacco cells. *Colloids and Surfaces B*, 2002.
- Zinin P. V., Allen III J. S., and Levin V. M.. Mechanical resonances of bacteria cells. *Physical Review*, 2005.
- Zinin Pavel V. and Allen III John S.. Deformation of biological cells in the acoustic field of an oscillating bubble. *Physical Review*, 2005.

Ringraziamenti

Ringrazio la mia famiglia e miei figli che con la loro comprensione, le difficoltà patite e i sacrifici anche economici, mi hanno permesso di sostenere, supportare e anticipare l'esborso economico che ha permesso di realizzare e dare continuità a queste complesse e articolate attività di ricerca per cui si sono resi necessari oltre 60 voli e circa 40 missioni e viggi tra Mazara del Vallo, Perugia, Venezia, Ancona, Alessandria, Torino e Milano.

*Poi, ringrazio me stesso per la tenacia e perseveranza nel voler raggiungere a tutti i costi questo grande obiettivo, per me una vera e propria sfida in un settore dove quattro anni fa, nel momento in cui l'ho proposto non esistevano ancora riferimenti bibliografici che sostenevano che la microalga *Scenedesmus obliquus* poteva incrementare le sue cinetiche di crescita con l'impiego delle onde acustiche.*

Ringrazio però anche chi ha creduto in me: i Dott. Franco e Giuseppe Colaiacovo, che consentendomi di partecipare le mie idee al progetto di Ricerca "Progetto Alge" cofinanziato dal Ministero dell'Ambiente hanno permesso con il supporto delle loro aziende di realizzare i prototipi dell'innovativo sbr per il quale sono in corso le procedure di registrazione dei brevetti in condivisione, di cui io ne sono l'autore.

Ringrazio poi chi per primo mi ha sostenuto, consigliato e soprattutto aiutato a valorizzare le attività di ricerca:

il caro ed insostituibile Prof. Emanuele Argese,

e il mio co-tutor e amico PhD Dott. Paolo Blasi che mi ha accolto nel suo laboratorio e ha coadiuvato le attività scientifiche istruendomi sull'uso delle sofisticate strumentazioni di laboratorio, ma soprattutto mi ha permesso di realizzare il banco sperimentale con 12 fotobioreattori con il consenso e la piena approvazione dei responsabili del Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco dell'Università di Perugia Prof. Carlo Rossi direttore pro-tempore, del Prof. Maurizio Ricci e del Prof. Natalini oltre che della preziosa collaborazione della PhD Dott.ssa Aurelie Scoubben e il caro PhD Dott. Stefano Giovagnoli.

+ Con la collaborazione di:



Dott. Paolo Blasi Ph.D. – cotutor
Dott. Stefano Giovagnoli Ph.D.
Dott.ssa Aurélie Scoubben Ph.D.

Dott. Paola Sassi Ph.D. e Sara Mattana
Dott. Loredana Latterini Ph.D.
Prof. Aldo Romani e Ph.D st. Chiara Grazia

Prof. Ing. Francesco Asdrubali Ph.D.
Ing. Francesco D'alessandro Ph.D.
Ing. Samuele Schiavoni Ph.D.

Prof. Ing. Enrico Primo Tomasini
Ing. Paolo Castellini, Ph.D.
Ing. Milena Martarelli, Ph.D.
Ing. Claudio Santolini

Prof. Fabio Polonara
Ing. Matteo Moglie, Ph.D.
Prof. Mario Giordano, Ph.D.
Dott.ssa Alessandra Norici, Ph.D.



MINISTERO DELL'AMBIENTE
E DELLA TUTELA DEL TERRITORIO E DEL MARE

Con il cofinanziamento del Progetto Alghe.

“Utilizzo di cluster di FotoBioReattori a illuminazione interna per lo sviluppo della produzione, su larga scala, di energia rinnovabile dalla coltivazione diffusa di microalghe” ammesso a finanziamento con decreto direttoriale SEC-2011-0007111 del 16/05/2011.

I contenuti delle attività di ricerca emersi nell'ambito degli studi di dottorato di ricerca sono stati quindi concessi per la realizzazione del Progetto ministeriale con un accordo a finalità non commerciali, con licenza Creative Commons 3.0, in corso di deposito con atto notarile, allo scopo di sviluppare le potenzialità di applicazione industriale, incorporandone al termine i diritti di proprietà industriale di ogni singolo elemento, nel prototipo di fbr dimostratore che sarà allestito al termine della sperimentazione e che sarà equipaggiato con questi esclusivi e innovativi sistemi più efficienti per la crescita delle colture microalgali.



Except where otherwise noted, this work is licensed under <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Hanno parlato di noi:

1. <http://rugiadapoint.it/articoli/0305123255/energia-sostenibile-e-fonti-rinnovabili-i-progetti-del-ministero-dell%E2%80%99ambiente-a>

“Energia sostenibile e fonti rinnovabili. I progetti del ministero dell’Ambiente al Politecnico di Milano.

Efficienza energetica e utilizzo di fonti rinnovabili, in particolare nelle aree urbane, sono due dei temi-chiave dello sviluppo sostenibile e sono l’oggetto dell’incontro che si tiene lunedì 7 maggio nell’Aula Magna del Politecnico di Milano, Piazza Leonardo da Vinci 32.



Titolo dell’incontro, organizzato dal ministero dell’Ambiente, della tutela del territorio e del mare e dall’ateneo milanese, è “**I 100 progetti. Ricerca e innovazione per lo sviluppo dell’energia rinnovabile e dell’efficienza energetica**”.

All’evento prenderà parte anche il Ministro Corrado Clini.

Nel 2008 il Ministero emanò un bando per il finanziamento di progetti di ricerca per interventi di efficienza energetica e l’utilizzo di fonti di energia rinnovabile: arrivarono 284 domande, di cui ammesse al finanziamento 52. Al Politecnico di Milano saranno presentati i progetti più interessanti, selezionati in base a replicabilità, grado d’innovazione e maggiore collaborazione tra industria e ricerca scientifica.

Aprirà la sessione di presentazione dei progetti il Politecnico di Milano con Relab – Renewable heating and cooling Labs, un laboratorio di ricerca pubblico, cofinanziato dal ministero e promosso da Regione Lombardia in accordo con il Dipartimento di Energia del Politecnico di Milano. Relab, per cui è previsto un investimento di oltre 5 milioni di euro, oltre alle attività di ricerca, svolgerà prove per la certificazione e valutazione delle prestazioni energetiche dei vari tipi di pompe di calore secondo le più recenti norme europee.

Questo il programma: Ore 10 - Introduce: Giovanni Azzone – Rettore del Politecnico di Milano Interviene: Corrado Clini – Ministro dell’Ambiente, della Tutela del Territorio e del Mare”.

2. Video di presentazione del progetto sul portale del Ministero dell’Ambiente: http://www.minambiente.it/home_it/showitem.html?lang=&item=/documenti/comunicati/comunicato_0381.html
3. <http://www.trgmedia.it/news.aspx?id=48344>
4. Il TRG Umbria edizione del 7 maggio 2012 (file digitale allegato nel cd)
5. L’intervista al Convegno del Politecnico di Milano il 7 maggio 2012 di Maurizio Melis – giornalista scientifico de Il Sole 24 Ore (file digitale allegato nel cd).
6. <http://www.ekotem.it/Index.aspx?idnews=730&idsottosito=54>
7. <http://www.wavemax.it/Index.aspx?idnews=730&idsottosito=86>
8. <http://www.rigelpianti.it/Index.aspx?idnews=730&idsottosito=42>
9. <http://www.italiainnova.it/Index.aspx?idnews=730&idsottosito=48>
10. <http://www.fcgold.it/Index.aspx?idnews=730&idsottosito=36>
11. <http://www.goldlake.it/Index.aspx?idnews=730&idsottosito=30>
12. http://rassegna.crumbria.it/FastPressMobile/testoarticolo.php?idarticolo=440453&idtiporass=1&idrassegna=4162&Sel_Argomento=0000000000000000&ricerca=no
13. <http://www.trgmedia.it/n.aspx?id=48344>

14. <http://www.colaiacovo.it/Index.aspx?idnews=730&idsottosito=51>
15. <http://www.gubbiooggi.it/Index.aspx?idnews=1773&idsottosito=58>
16. <http://247.libero.it/lfocus/14905690/1/tre-aziende-umbre-promuovono-il-progetto-alghe/>
17. http://www.adnkronos.com/IGN/Sostenibilita/World_in_Progress/Rinnovabili-presentati-a-Milano-i-progetti-finanziati-da-Ministero-e-Politecnico_313278919884.html
18. https://www.google.it/search?q=progetto+alghe+italia+innova+ministero+ambiente+100+progetti&oq=progetto+alghe+italia+innova&aqs=chrome.69i59l2j69i57j69i61.8544j0j8&sourceid=chrome&espv=210&cs_sm=91&ic=UTF-8#q=italia+innova&tbm=vid
19. Il Giornale dell'Umbria edizione del sabato 5 maggio 2012 pagina 42 sezione Economia Umbria:

Sabato 5 maggio 2012 il Giornale dell'Umbria

42 economia UMBRIA

Alghe per abbattere l'anidride carbonica



Italia Innova, Sirci e Rigel: aziende umbre insieme per un progetto scelto dal ministero dell'Ambiente

PERUGIA - La ricerca e l'innovazione, in Umbria, passano attraverso un progetto che punta sulle alghe per abbattere l'anidride carbonica. E molto altro ancora. Un laboratorio di ricerca riconosciuto dal Miur, Italia Innova, la società leader nella produzione di sistemi di tubazioni in plastica, Sirci, e un general contractor nell'impiantistica, Rigel: queste le tre aziende umbre che, insieme al Cnr, hanno promosso il progetto "Alghè" selezionato dal ministero dell'Ambiente come uno dei 13 progetti più innovativi d'Italia.

Lunedì al Politecnico di Milano le tre imprese umbre presenteranno l'iniziativa, insieme alle altre eccellenze selezionate (tra cui un'altra realtà umbra, ovvero Angelantoni e ancora Fiat, Enel ed Erg), alla presenza del ministro dell'Ambiente Corrado Clini e al rettore Giovanni Azzone.

L'evento, denominato "Ricerca ed innovazione per lo sviluppo dell'energia rinnovabile e dell'efficienza energetica" costituisce una vera e propria passerella per i progetti su cui l'Italia punta per lo sviluppo di un settore fondamentale in questa fase di crisi economica.

Ma in cosa consiste il progetto "Alghè"? Prima di tutto è bene ricordare che la base di partenza è la sostenibilità ambientale e l'efficienza energetica, ovvero la chiave

far confluire un modesto flusso di gas da combustione esausto. È l'applicazione sperimentale di un fotobioreattore innovativo per il sequestro della CO₂ e la produzione di biocombustibili da impiegare in una logica integrata di filiera corta.

Si tratta della riduzione degli impatti energetici di processo ottenuti con l'impiego del tubo Pvc autopulente di Sirci per il trasporto e il movimento della biomassa da alghe in assenza di energia. Le microalghe sono organismi unicellulari fotosintetici, che insieme al fitoplancton, sono naturalmente responsabili di poco meno del 50% della fotosintesi sulla terra.

Non sono in competizione con le colture agrarie e consumano grandi quantità di CO₂. Trasformano le sostanze inorganiche (CO₂), si alimentano di nitrati e fosfati, e composti chimici di scarto reperibili nelle acque reflue, svolgendo così anche azioni di fito-bio-risanamento.

Le maggiori quantità di biomassa e di ossigeno prodotte, confermerebbero una più efficiente attività fotosintetica incrementando l'efficienza complessiva di processo.

I tubi e raccordi autopulenti di Sirci sono costruiti con speciali mescole che conferiscono alle superfici interne di contatto minore attrito allo scorrimento, a tutto vantaggio del minore apporto energetico richiesto per il trasferimento di grandi masse di acqua. I test sperimentali, hanno evidenziato nel tubo Autopulente, minori fenomeni di adesione e di attrito allo scorrimento delle microalghe alla superficie inclinata del tubo. Dalla successiva raffinazione della biomassa microalgale, saranno estratti: biodiesel, fine chemicals e fertilizzanti impiegabili in agricoltura. Il valore aggiunto, che si ottiene dalla vendita di queste sostanze pregiate, oltre alla contabilizzazione del valore dei certificati verdi.

Il progetto di ricerca si concluderà con la realizzazione di prototipo dimostratore di Fotobioreattore, in scala installato all'interno di una cementeria. Dalla sintesi dei composti inorganici le microalghe rilasciano ossigeno molecolare.

Dalla combustione del biodiesel ottenuto dalle colture microalgali, è scientificamente provata una riduzione pari ad oltre il 75% delle emissioni di CO₂.

RE. PE.

Estratto per riassunto della tesi di dottorato

Studente: Pietro Labruzzo matricola: 955757
Dottorato: Scienze Ambientali
Ciclo: XXV

Titolo della tesi²⁴:

Influenza delle Onde Acustiche sulla crescita delle *microalghe* (sp. *Scenedesmus obliquus*)

Abstract: L'obiettivo della tesi di dottorato è stato quello di studiare gli effetti della stimolazione acustica sulla velocità di crescita della microalga *Scenedesmus obliquus*. Tale studio ha richiesto la messa a punto di metodi innovativi per favorire la crescita, il controllo e il monitoraggio continuo delle colture microalgali in fotobioreattori seriali (*sistema di agitazione sincrono, seriale e automatizzato delle colture a basso impatto acustico; la costruzione di fbr di specifica geometria e materiale particolarmente efficiente nella trasmissione delle onde acustiche e della radiazione elettromagnetica; rapide tecniche di misura, continue e automatizzabili della crescita microalgale*). In conclusione il banco sperimentale potrebbe rappresentare un ideale modulo di conversione energetica e rimozione della CO₂ altamente efficiente (si sono avuti con le stimolazioni acustiche incrementi della velocità di crescita microalgale anche del 320%) di conversione energetica per una cementeria.

The aim of the PhD thesis was to study the effects of acoustic stimulation on the rate of growth of the microalgae *Scenedesmus obliquus*. This study required a long and complex work aimed to develop innovative means to detect and record algal growth, control and continuous monitoring of microalgal cultures in a serial photobioreactors (synchronous stirring system, automated serial and crops in the twelve fbr low acoustic impact) not to interfere with the delivered sound waves. The construction of photobioreactors of specific geometry and a material particularly efficient in the transmission of acoustic waves and electromagnetic radiation, together with innovative and quick measurement techniques to follow the time course of microalgae growth, has been a large part of the thesis work. In conclusion, the experimental setup and easily scalable fbr, could be an ideal form innovative, highly efficient (with the acoustic stimulation they increased the rate of growth of microalgae even of 320 %) and innovative system for *Scenedesmus obliquus* cultivation and energy conversion, for instance, in a cement plant.

Firma dello studente

²⁴ Il titolo deve essere quello definitivo, uguale a quello che risulta stampato sulla copertina dell'elaborato consegnato.



Università
Ca' Foscari
Venezia

DEPOSITO ELETTRONICO DELLA TESI DI DOTTORATO

DICHIARAZIONE SOSTITUTIVA DELL'ATTO DI NOTORIETA'

(Art. 47 D.P.R. 445 del 28/12/2000 e relative modifiche)

Io sottoscritto LABRUZZO PIETRO
nato a CASERTA (prov. CE) il 15/07/1968
residente a BASTIA UMBRA in VIA S. COSTANZO n. 8
Matricola (se posseduta) 955757 Autore della tesi di dottorato dal titolo:
INFLUENZA DELLE ONDE ACUSTICHE SULLA
CRESCITA DELLE MICROALGHE (SP. SCENEDESTRUS
OBLIQUUS)
Dottorato di ricerca in SCIENZE AMBIENTALI
(in cotutela con)
Ciclo XXV
Anno di conseguimento del titolo 2014

DICHIARO

di essere a conoscenza:

- 1) del fatto che in caso di dichiarazioni mendaci, oltre alle sanzioni previste dal codice penale e dalle Leggi speciali per l'ipotesi di falsità in atti ed uso di atti falsi, decado fin dall'inizio e senza necessità di nessuna formalità dai benefici conseguenti al provvedimento emanato sulla base di tali dichiarazioni;
- 2) dell'obbligo per l'Università di provvedere, per via telematica, al deposito di legge delle tesi di dottorato presso le Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e di Firenze al fine di assicurarne la conservazione e la consultabilità da parte di terzi;
- 3) che l'Università si riserva i diritti di riproduzione per scopi didattici, con citazione della fonte;
- 4) del fatto che il testo integrale della tesi di dottorato di cui alla presente dichiarazione viene archiviato e reso consultabile via Internet attraverso l'Archivio Istituzionale ad Accesso Aperto dell'Università Ca' Foscari, oltre che attraverso i cataloghi delle Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze;
- 5) del fatto che, ai sensi e per gli effetti di cui al D.Lgs. n. 196/2003, i dati personali raccolti saranno trattati, anche con strumenti informatici, esclusivamente nell'ambito del procedimento per il quale la presentazione viene resa;
- 6) del fatto che la copia della tesi in formato elettronico depositato nell'Archivio Istituzionale ad Accesso Aperto è del tutto corrispondente alla tesi in formato cartaceo, controfirmata dal tutor, consegnata presso la segreteria didattica del dipartimento di riferimento del corso di dottorato ai fini del deposito presso l'Archivio di Ateneo, e che di conseguenza va esclusa qualsiasi responsabilità dell'Ateneo stesso per quanto riguarda eventuali errori, imprecisioni o omissioni nei contenuti della tesi;
- 7) del fatto che la copia consegnata in formato cartaceo, controfirmata dal tutor, depositata nell'Archivio di Ateneo, è l'unica alla quale farà riferimento l'Università per rilasciare, a richiesta, la dichiarazione di conformità di eventuali copie;

Data 29/1/2014

Firma

NON AUTORIZZO

l'Università a riprodurre ai fini dell'immissione in rete e a comunicare al pubblico tramite servizio on line entro l'Archivio Istituzionale ad Accesso Aperto la tesi depositata per un periodo di 12 (dodici) mesi a partire dalla data di conseguimento del titolo di dottore di ricerca.

DICHIARO

- 1) che la tesi, in quanto caratterizzata da vincoli di segretezza, non dovrà essere consultabile on line da terzi per un periodo di 12 (dodici) mesi a partire dalla data di conseguimento del titolo di dottore di ricerca;
- 2) di essere a conoscenza del fatto che la versione elettronica della tesi dovrà altresì essere depositata a cura dell'Ateneo presso le Biblioteche Nazionali Centrali di Roma e Firenze dove sarà comunque consultabile su PC privi di periferiche; la tesi sarà inoltre consultabile in formato cartaceo presso l'Archivio Tesi di Ateneo;
- 3) di essere a conoscenza che allo scadere del dodicesimo mese a partire dalla data di conseguimento del titolo di dottore di ricerca la tesi sarà immessa in rete e comunicata al pubblico tramite servizio on line entro l'Archivio Istituzionale ad Accesso Aperto.

Specificare la motivazione:

motivi di segretezza e/o di proprietà dei risultati e/o informazioni sensibili dell'Università Ca' Foscari di Venezia.

motivi di segretezza e/o di proprietà dei risultati e informazioni di enti esterni o aziende private che hanno partecipato alla realizzazione del lavoro di ricerca relativo alla tesi di dottorato.

dichiaro che la tesi di dottorato presenta elementi di innovazione per i quali ~~è già stata attivata~~ / si intende attivare la seguente procedura di tutela:

- DEPOSITO BREVETTI.....;

Altro (specificare):

- DEPOSITO O EVENTUALE REGISTRAZIONE SIAE R2. OLAF.....

- ALLO SCADERE DEL PERIODO DI EMBARGO -.....

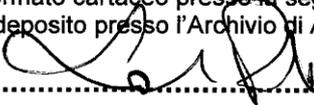
- LICENZA CREATIVE COMMONS 3.0 (CC) BY-NC-ND.....

A tal fine:

- consegno la copia integrale della tesi in formato elettronico su supporto digitale presso la segreteria didattica del dipartimento di riferimento del corso di dottorato in due copie di cui una da trasmettere alle Biblioteche Nazionali di Roma e Firenze e l'altra da versare all'Archivio di Ateneo che si impegna al rispetto del periodo di embargo prima della sua pubblicazione on line nell'Archivio Istituzionale ad Accesso Aperto dell'Università Ca' Foscari;

- consegno la copia integrale della tesi in formato cartaceo presso la segreteria didattica del dipartimento di riferimento del corso di dottorato ai fini del deposito presso l'Archivio di Ateneo.

Data 29/1/2014.....

Firma .....

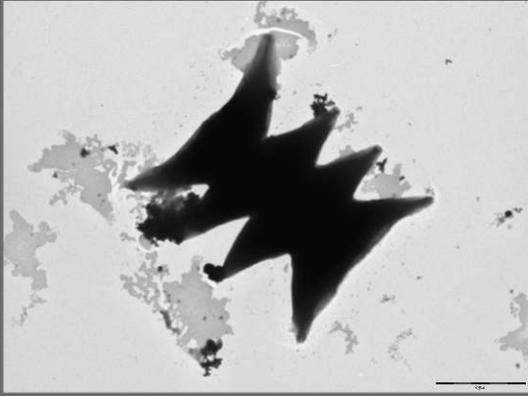
La presente dichiarazione è sottoscritta dall'interessato in presenza del dipendente addetto, ovvero sottoscritta e inviata, unitamente a copia fotostatica non autenticata di un documento di identità del dichiarante, all'ufficio competente via fax, ovvero tramite un incaricato, oppure a mezzo posta.

Firma del dipendente addetto

Ai sensi dell'art. 13 del D.Lgs. n. 196/03 si informa che il titolare del trattamento dei dati forniti è l'Università Ca' Foscari - Venezia.

I dati sono acquisiti e trattati esclusivamente per l'espletamento delle finalità istituzionali d'Ateneo; l'eventuale rifiuto di fornire i propri dati personali potrebbe comportare il mancato espletamento degli adempimenti necessari e delle procedure amministrative di gestione delle carriere studenti. Sono comunque riconosciuti i diritti di cui all'art. 7 D. Lgs. n. 196/03.

La *Scenedesmus obliquus*



I fotobioreattori, le Onde Acustiche e le microalghe

Abstract: L'obiettivo della tesi di dottorato è stato quello di studiare gli effetti della stimolazione acustica sulla velocità di crescita della microalga *Scenedesmus obliquus*. Tale studio ha richiesto la messa a punto di metodi innovativi per favorire la crescita, il controllo e il monitoraggio continuo delle colture microalgali in fotobioreattori seriali (sistema di agitazione sincrono, seriale e automatizzato delle colture a basso impatto acustico; la costruzione di fbr di specifica geometria e materiale particolarmente efficiente nella trasmissione delle onde acustiche e della radiazione elettromagnetica; rapide tecniche di misura, continue e automatizzabili della crescita microalgale). In conclusione il banco sperimentale potrebbe rappresentare un ideale modulo di conversione energetica e rimozione della CO₂ altamente efficiente (si sono avuti con le stimolazioni acustiche incrementi della velocità di crescita microalgale anche del 320%) di conversione energetica per una cementeria.

The aim of the PhD thesis was to study the effects of acoustic stimulation on the rate of growth of the microalgae *Scenedesmus obliquus*. This study required a long and complex work aimed to develop innovative means to detect and record algal growth, control and continuous monitoring of microalgal cultures in a serial photobioreactors (synchronous stirring system, automated serial and crops in the twelve fbr low acoustic impact) not to interfere with the delivered sound waves. The construction of photobioreactors of specific geometry and a material particularly efficient in the transmission of acoustic waves and electromagnetic radiation, together with innovative and quick measurement techniques to follow the time course of microalgae growth, has been a large part of the thesis work. In conclusion, the experimental setup and easily scalable fbr, could be an ideal form innovative, highly efficient (with the acoustic stimulation they increased the rate of growth of microalgae even of 320 %) and innovative system for *Scenedesmus obliquus* cultivation and energy conversion, for instance, in a cement plant.



Progetto Alghe by Dott. Pietro Labruzzo PhD Student is licensed under a Creative Commons Attribution - Non commerciale - Non opere derivate 3.0 Unported License. Based on a work at pietrolabruzzo@gmail.com. Permissions beyond the scope of this license may be available at pietrolabruzzo@gmail.com.