



Università degli Studi di Firenze

**DOTTORATO DI RICERCA IN
" Produzione di Animali Acquatici e Terrestri e Qualità dei Prodotti "**

CICLO XXV°

COORDINATORE Prof.ssa Poli Bianca Maria

**“Produzione di biomasse di microalghe marine e loro uso
nell’integrazione e parziale sostituzione di mangimi per la spigola
ed altre specie ittiche di pregio.”**

Settore Scientifico Disciplinare AGR/20

Tutore

Prof. Tredici Mario R.

Dottorando

Dott.ssa Venturini Silvia

Co-Tutore

Dott.ssa Chini Zittelli Graziella

Anni 2010/2012

A me stessa

INDICE

INTRODUZIONE	1
SCOPO DELLA TESI	4
Capitolo 1 – Microalghe in Acquacoltura	8
1.1 Importanza delle microalghe	10
1.2 Composizione biochimica	10
1.3 Le applicazioni commerciali e l'utilizzo in acquacoltura	14
Capitolo 2 – Biotecnologie delle colture algali: i sistemi di coltura	18
2.1 Sistemi di coltura aperti	18
2.2 Sistemi di coltura chiusi	20
2.3 Applicazioni industriali a sistemi aperti e a sistemi chiusi	26
Capitolo 3 - La Nutrizione dei pesci e la qualità del prodotto ittico	31
3.1 Nutrizione dei pesci in acquacoltura	33
3.1.1 Ingestione dell'alimento	33
3.1.2 Le proteine e gli aminoacidi nella dieta	34
3.1.3 I lipidi ed acidi grassi nella dieta	36
3.1.4 le vitamine e minerali essenziali nella dieta	38
3.2 Le diete in acquacoltura	39
3.3 I prodotti ittici	41
3.4 Il benessere del pesce e qualità del prodotto ittico	44
Capitolo 4 - Materiali e metodi	49
4.1 Produzione degli inoculi e condizioni di coltura	49
4.2 Gestione delle colture	51
4.3 Misure e procedure analitiche sulla coltura e biomassa microalgale	53
4.4 Misure lineari, ponderali e analitiche sui pesci	59
4.5 Statistica	67

Capitolo 5 – Il Green Wall Panel utilizzato nella sperimentazione	69
5.1 Descrizione del fotobioreattore GWP	69
5.2 Impianti accessori	69
5.2.1 Sistema di alimentazione del mezzo di coltura	69
5.2.2 Sistema di scarico della sospensione algale	70
5.2.3 Sistema di agitazione della coltura	70
5.2.4 Sistema della regolazione della CO ₂	71
5.2.5 Sistema della termoregolazione della coltura	72
Capitolo 6 – <i>Tetraselmis</i>	73
6.1 Introduzione generale sulla microalga <i>Tetraselmis</i>	73
6.2 Screening di ceppi di <i>Tetraselmis</i> in funzione della capacità mixotrofica	76
6.2.1 Introduzione	76
6.2.2 Materiali e Metodi	78
6.2.3 Risultati	80
6.2.4 Conclusioni	84
6.3 Selezione all'aperto di ceppi di <i>Tetraselmis</i> in funzione della crescita e resistenza alla temperatura	85
6.3.1 Introduzione	85
6.3.2 Materiali e Metodi	86
6.3.3 Risultati	87
6.3.4 Conclusioni	92
6.4 Formulazione di un'acqua di mare artificiale a basso costo e suo utilizzo per coltivare <i>T. suecica</i> F&M – M33	93
6.4.1 Introduzione	93
6.4.2 Materiali e Metodi	95
6.4.3 Risultati	97
6.4.4 Conclusioni	101
6.5 Coltura all'aperto <i>T. suecica</i> F&M – M33 su refluo avicolo (pollina)	104
6.5.1 Introduzione	104
6.5.2 Materiali e Metodi	107
6.5.3 Risultati	111
6.5.4 Conclusioni	115

6.6 Coltura massiva all'aperto della microalga marina <i>T. suecica</i> F&M – M33 in fotobioreattori a basso costo	119
6.6.1 Introduzione	119
6.6.2 Materiali e Metodi	120
6.6.3 Risultati	121
6.6.4 Conclusioni	131
6.7 Considerazioni sul bilancio energetico e costo della biomassa	133

**Capitolo 7- *Isochrysis*: coltura massiva in un impianto pilota a GWP
e messa a punto della procedura di gestione** 136

7.1 Introduzione	136
7.2 Descrizione dell'impianto a "Green Wall Panel"	140
7.3 Procedura di scaling-up e gestione delle colture	143
7.4 Materiale e metodi	148
7.5 Risultati	149
7.5.1 Andamento della crescita durante il processo di scaling-up	149
7.5.2 Andamento dei parametri colturali durante la produzione della biomassa di <i>Isochrysis</i> sp. (T-ISO) F&M – M36	156
7.5.3 Raccolta ed essiccamento della biomassa di <i>Isochrysis</i> sp. (T-ISO) F&M – M36	155
7.5.4 Composizione biochimica della biomassa di <i>Isochrysis</i> sp. (T-ISO) F&M – M36	157
7.5.5 Capacità produttiva nel lungo periodo dell'impianto pilota a GWP di Archimede Ricerche S.r.l	161
7.6 Conclusioni	163

**Capitolo 8 - *Dicentrarchus labrax*: prove di alimentazione
con mangimi a base di microalghe** 166

8.1 Introduzione	166
8.2 Materiale e metodi	168
8.3 Risultati: prove di alimentazione della spigola (<i>Dicentrarchus labrax</i>) utilizzando la microalga <i>Tetraselmis suecica</i> F&M – M33 come ingrediente della dieta	173

8.4 Risultati prove di alimentazione della spigola (<i>Dicentrarchus labrax</i>) utilizzando la microalga <i>Ischrysis aff. galbana</i> (T-ISO) F&M-M36 come ingrediente della dieta	177
8.5 Conclusioni	179
Capitolo 9 – Discussione	181
9.1 Valutazione del GWP: vantaggi e svantaggi	181
9.2 Coltura massiva di <i>T. suecica</i> e <i>Isochrysis</i> (T-ISO) in GWP-I	184
9.3 Valutazione dei costi di produzione della biomassa	185
9.4 La qualità del prodotto ittico alimentato con le microalghe	187
9.5 Microalghe per l’acquacoltura: pro e contro attuali e prospettive future	189
BIBLIOGRAFIA	191
RINGRAZIAMENTI	204

INTRODUZIONE

L'acquacoltura è definita come l'allevamento di animali acquatici in condizioni controllate. Nella produzione mondiale di pesce, crostacei e molluschi il contributo dell'acquacoltura, che mostra un tasso di crescita medio annuo del 9%, è in continuo aumento. Negli ultimi 50 anni l'acquacoltura mondiale è infatti notevolmente incrementata, passando da una produzione inferiore a 1 milione di tonnellate nel 1950 a circa 67 milioni di tonnellate nel 2006 (FAO, 2012). Sulla base delle attuali proiezioni di crescita della popolazione, la FAO stima che saranno richiesti ogni anno almeno 40 milioni di tonnellate aggiuntive di prodotti ittici per mantenere l'attuale consumo pro capite fino al 2030. A causa del graduale depauperamento degli stock ittici e del loro sovra-sfruttamento, già oggi oltre il 50% del prodotto ittico proviene dall'acquacoltura. Bisogna considerare che è poco probabile che l'acquacoltura un domani riesca a sostituire totalmente la pesca, ma essa può comunque soddisfare le richieste che non sono adempite dagli stock ittici naturali (Bosworth, 2012).

L'acquacoltura tradizionalmente utilizza come mangimi alcuni sottoprodotti della pesca quali farina di pesce e olio di pesce. La farina di pesce, oltre ad essere facilmente digeribile, possiede un alto valore nutrizionale, in quanto ha un elevato contenuto proteico (fino al 70%), un bilanciato contenuto in aminoacidi essenziali (in particolare lisina ed aminoacidi solforati) e un buon contenuto lipidico con ottime percentuali di acidi grassi polinsaturi a lunga catena (LC-PUFA) della serie ω -3 (EPA, DHA) (Schipp, 2008; Bimbo, 2012).

Il pesante sfruttamento delle risorse ittiche del pianeta ha portato ad un lento ma inesorabile impoverimento delle acque e la costante richiesta di farina di pesce ha determinato un rapido aumento dei costi legati all'acquacoltura e quindi un incremento del prezzo di mercato del pesce. La dipendenza del settore ittico dalle farine e dagli oli di pesce come ingredienti principali dei mangimi può quindi far sorgere dubbi circa la loro sostenibilità economica e ambientale. Nasce da qui la necessità di reperire risorse alimentari alternative alla farina ed all'olio di pesce che siano di pari qualità nutrizionale, e in grado di ridurre i costi dell'acquacoltura. Recenti studi hanno dimostrato la possibilità di sostituire una cospicua porzione di farina e olio di pesce con proteine ed oli di origine vegetale (soia, arachidi, girasole etc..) negli alimenti di

numerose specie ittiche carnivore. Tuttavia, essendo le farine vegetali carenti di alcuni aminoacidi essenziali (principalmente lisina e metionina) e di acidi grassi polinsaturi (PUFA) a lunga catena e avendo limitata digeribilità, non determinano lo stesso effetto delle diete contenenti esclusivamente farina di pesce (Corraze e Kaushik, 2009).

L'introduzione in queste diete delle farine vegetali, che possono presentare proteine carenti di alcuni aminoacidi che sono essenziali per le specie ittiche, non determinano lo stesso effetto delle diete contenenti esclusivamente farina di pesce, in quanto si ha una minor efficienza di utilizzo della proteina

Nella necessità di reperire fonti alimentari alternative, l'interesse verso le microalghe trova ampia giustificazione in quanto esse hanno un contenuto proteico pari al 30-52% della sostanza secca, sintetizzano proteine di elevato valore biologico, sono i produttori primari di PUFA a lunga catena della serie ω -3 e ω -6 (ARA, EPA, DHA) e contengono quantità elevate di tutte le principali vitamine e micronutrienti importanti per la crescita e la salute dei pesci (Brown et al., 1997; Brown, 2002; Gouveia et al., 2008). Essendo organismi fototrofi, le microalghe hanno sviluppato sistemi efficienti contro gli stress ossidativi (Pulz e Gross, 2004) e la combinazione fra l'elevata attività antiossidante e l'alto contenuto nutrizionale ne aumenta il loro valore (Natrah et al., 2007). Ad oggi, la produzione di microalghe a livello mondiale (ca 10.000 tonnellate per anno) è attualmente limitata a poche specie e destinata a prodotti ad alto valore aggiunto assorbiti da mercati di nicchia (acquacoltura, cosmesi e industria farmaceutica).

La produzione della biomassa microalgale avviene secondo un processo di scaling-up, passando da un sistema di coltura ad un altro, incrementando di volta in volta i volumi di coltura.

I sistemi per la coltura massiva delle microalghe sono essenzialmente riconducibili a due tipologie: sistemi di coltura aperti (vasche) e sistemi di coltura chiusi (fotobioreattori). I sistemi di coltura aperti, benché presentino bassi costi di investimento e di gestione, hanno numerosi inconvenienti rispetto ai fotobioreattori, tra i quali: difficile controllo dei contaminanti, elevata evaporazione, basso rapporto superficie/volume e conseguente ridotta produttività volumetrica (Tredici, 2004). I fotobioreattori ottengono produttività più alte e stabili nel tempo e presentano un elevato grado di controllo delle condizioni colturali, permettendo, così di ridurre i fenomeni di contaminazione della coltura e poter coltivare più specie microalgali.

Uno dei problemi principali in coltura massiva a luce naturale è il controllo della temperatura delle colture, in quanto temperature di circa 40 °C possono essere

facilmente raggiunte all'aperto sia nelle vasche che in particolar modo nei fotobioreattori chiusi se quest'ultimi non sono termostatati (Pushparaj et al., 1997; Tredici et al., 2010). Riuscire a trovare ceppi capaci non solo di tollerare, ma anche di crescere ad alte temperature risulta quindi fondamentale nella prospettiva di una produzione su vasta scala, che richiede l'utilizzo di tecnologie a basso costo e la termostatazione rappresenta uno dei costi che incidono maggiormente sul costo della biomassa.

Una risorsa potenzialmente inesauribile è il "mare", che però può essere sfruttabile solo se l'impianto si trova lungo la costa. In alternativa si può utilizzare acqua di mare artificiale preparata con sali sintetici a basso prezzo, riducendo di conseguenza i costi di produzione, obiettivo fondamentale quando si prospetta una produzione di biomassa su vasta scala.

Per la coltura delle microalghe sono necessari nutrienti, in particolare l'azoto ed il fosforo, che tradizionalmente vengono ricavati da fertilizzanti chimici, ma possono essere ottenuti anche dai reflui.

In acquacoltura le microalghe costituiscono l'alimento direttamente utilizzato da larve e post-larve di molluschi bivalvi e crostacei, mentre nel caso dei pesci marini come l'orata e la spigola il fitoplancton viene impiegato come nutrimento dello zooplancton, a sua volta utilizzato nell'alimentazione degli stadi larvali. Le specie più utilizzate in acquacoltura sono *Tetraselmis suecica*, *Chlorella* sp., *Nannochloropsis* spp. ed *Isochrysis* sp. (T-ISO) e alcune diatomee centriche quali *Chaetoceros gracilis*, *Skeletonema costatum* e *Thalassiosira pseudonana* (Becker, 2004).

Microalghe selezionate e coltivate in condizioni controllate utilizzando fotobioreattori chiusi possono fornire un prodotto di qualità adeguata e costante per la formulazione di mangimi. Inoltre, il recente sviluppo delle biotecnologie per la coltura massiva delle microalghe ha portato alla realizzazione di sistemi di coltura chiusi potenzialmente capaci di produrre biomassa in quantità elevata e a costi relativamente contenuti in modo da soddisfare le necessità attuali e future di integrare la dieta dei pesci con sostanze nutrienti e a basso costo (Tredici et al., 2009; Tredici et al., 2010).

SCOPO DELLA TESI

L'impovertimento delle acque del pianeta, dovuto al pesante sfruttamento delle risorse ittiche e alla costante richiesta di farina di pesce, ha determinato un incremento dei costi legati all'acquacoltura che quindi si riflettono sul prezzo di mercato del pesce. La dipendenza del settore ittico dalle farine e dagli oli di pesce come ingredienti principali dei mangimi può quindi far sorgere dubbi circa la sostenibilità economica e ambientale di tali prodotti ittici. Da qui la necessità di reperire risorse alimentari alternative a questi ingredienti che siano di pari qualità nutrizionale e che riducano i costi dell'acquacoltura. Un'interessante fonte alternativa può essere rappresentata dalle microalghe, le quali hanno un alto contenuto in proteine di elevato valore biologico, un buon contenuto in vitamine e micronutrienti e sono i produttori primari di PUFAs a lunga catena della serie ω -3 e ω -6 (ARA, EPA, DHA), importanti per la crescita e la salute dei pesci. Perché la biomassa microalgale possa diventare un ingrediente alternativo nelle diete dei pesci è importante che venga prodotta ad un costo competitivo rispetto a quello della farina e dell'olio di pesce (1-1,5 € kg⁻¹). Per ottenere biomassa microalgale a basso costo devono essere messe a punto tecniche di coltivazione più efficienti e soprattutto più economiche di quelle attuali.

L'attività di ricerca svolta durante il dottorato ha avuto come obiettivo generale la coltura e la produzione di biomasse di microalghe marine selezionate e di buona qualità nutrizionale e il loro impiego come materia prima per la parziale sostituzione della farina e dell'olio di pesce nei mangimi per acquacoltura. Tutto questo al fine di creare un alimento innovativo perfettamente rispondente ai fabbisogni nutrizionali della spigola e di altre specie ittiche di pregio ed in linea con un modello di allevamento eco-sostenibile che privilegia l'impiego di sostanze e alimenti di origine naturale. Due microalghe marine (*Tetraselmis* ed *Isochrysis*) sono state coltivate in una nuova tipologia di fotobioreattore verticale mettendo a punto procedure idonee per la loro coltura massiva su scala pilota e per la produzione di biomassa da usare nelle prove in vivo con i pesci. Alcune strategie sono state studiate nel corso dell'attività di ricerca per ridurre i costi di produzione della biomassa algale. Tali studi sono stati condotti con la

microalga *T. suecica*, una specie particolarmente idonea per la coltura massiva in quanto molto produttiva e resistente agli stress ambientali. Entrambe le microalghe, *Tetraselmis* ed *Isochrysis*, sono state quindi testate come ingredienti del mangime per la spigola in parziale sostituzione della farina e olio di pesce.

In particolare gli argomenti affrontati durante il lavoro di questa tesi sono stati i seguenti:

- 1- selezione di ceppi di *Tetraselmis* con elevata capacità di crescita sia in condizioni autotrofiche che mixotrofiche. Tale screening è stato condotto in laboratorio ed ha permesso di individuare i ceppi capaci di ottenere rese più elevate e quindi più idonei per la coltura all'aperto;
- 2- screening di sei ceppi di *Tetraselmis* con lo scopo di valutare la loro capacità di crescere all'aperto e di resistere a temperature di 40 °C. Uno dei maggiori costi operativi nella produzione commerciale di biomassa algale in fotobioreattori chiusi è la termostatazione delle colture senza la quale esse possono facilmente raggiungere e superare 40 °C. Riuscire a trovare un ceppo capace non solo di tollerare ma anche di crescere ad alte temperature risulta fondamentale per realizzare impianti commerciali in zone arido-desertiche e per ridurre i costi di produzione;
- 3- formulazione di un'acqua di mare artificiale (AMA) a basso costo. Per la produzione di microalghe marine sarebbe economicamente vantaggioso effettuare la coltivazione in aree costiere dove è possibile utilizzare acqua di mare naturale (AMN). Quest'ultima ha come inconveniente una composizione soggetta a variazioni, ma è disponibile sempre e richiede esclusivamente costi per il pompaggio dal mare al sito di utilizzo. Se la produzione di microalghe marine avviene in regioni lontane dal mare, è necessario utilizzare AMA preparata con sali sintetici. Obiettivo prova della sperimentazione è stato valutare la crescita della microalga *T. suecica* in un mezzo di coltura a base di AMA preparata con sali sintetici a basso costo facilmente reperibili in commercio ed avente la composizione dell'acqua di mare naturale. Visto che la microalga *T. suecica* ha la capacità di tollerare ampi intervalli di salinità, il suddetto mezzo di coltura è stato testato anche ad una salinità pari al 50% di

quella tradizionale (30‰) con l'obiettivo di abbassare ulteriormente i costi di produzione;

- 4- impiego di fonti naturali di macronutrienti (azoto e fosforo) disponibili a costo zero. In una fase successiva l'attenzione si è rivolta verso i nutrienti che normalmente sono forniti utilizzando fertilizzanti sintetici. È stata condotta una sperimentazione all'aperto il cui fine è stato valutare la capacità di crescita di *T. suecica* su refluo avicolo (pollina) che contenendo molti dei nutrienti richiesti dalle microalghe, potrebbe rappresentare una valida alternativa ai fertilizzanti di sintesi per la loro coltivazione;
- 5- coltura massiva all'aperto di *T. suecica* e *Isochrysis* (T-ISO) in fotobioreattori "Green Wall Panel" di prima generazione (GWP-I). Si tratta di un fotobioreattore a basso costo (Tredici e Rodolfi, 2004 brevetto:WO2004/074423) ideato e messo a punto dal gruppo del Prof. Tredici del Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università di Firenze, attualmente commercializzato da Fotosintetica e Microbiologica Srl (spin-off dell'Università di Firenze) ed utilizzato presso alcuni impianti pilota in Italia e all'estero. In moduli da 5 e 10 metri è stata prodotta la biomassa delle due microalghe (1,3 kg di *Tetraselmis* e 20 kg di *Isochrysis*) per essere utilizzata come ingrediente alternativo nelle diete della spigola. Le prove di coltivazione sono state effettuate a Camporosso presso Archimede Ricerche Srl ed a Sesto Fiorentino (FI) presso l'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi del Consiglio Nazionale delle Ricerche. Ciò ha richiesto la messa a punto di una strategia di gestione completamente diversa da quella adottata negli esperimenti su piccola scala, che tenesse conto delle necessità ed esigenze operative di un impianto industriale e la verifica di tale strategia sia in termini produttivi che per affidabilità nel lungo periodo.
- 6- Stima dei costi di produzione della biomassa di *T. suecica* in un impianto a GWP da 1000 m² per verificare quanto ancora siamo lontani dall'obiettivo di 1-2 €/kg e soprattutto per valutare la significatività della riduzione apportata con le strategie adottate e studiate in questa tesi. Da notare che la stima è stata effettuata con alcune approssimazioni e che i costi potrebbero diminuire se

riferiti ad un impianto di almeno 1 ha operativo in condizioni climatiche favorevoli.

- 7- La biomassa di *T. suecica* ed *Isochrysis* (T-ISO) prodotta con la tecnologia GWP è stata utilizzata per le prove di alimentazione della spigola (*Dicentrarchus labrax*). La biomassa liofilizzata è stata integrata nelle diete in sostituzione di parte del contenuto proteico e lipidico fornito rispettivamente dalla farina e dall'olio di pesce. Sono state eseguite le analisi della composizione biochimica delle diverse tipologie di mangime (proteine, lipidi, fibra, acidi grassi, profilo aminoacidico). È stata inoltre studiata la crescita, la composizione nutrizionale del filetto delle spigole (acqua, proteine, lipidi, acidi grassi) e i differenti indici morfometrici (tasso di accrescimento specifico, tasso di conversione dell'alimento, resa in filetto e in carcassa, indice viscerosomatico e epatosomatico, durezza dorsale, durezza ventrale, grasso mesenterico). Lo scopo della sperimentazione è stato ridurre nella dieta della spigola l'utilizzo della farina e dell'olio di pesce integrandoli con la biomassa microalgale e verificare l'effetto di tali diete sulla crescita dei pesci e nella composizione biochimica del filetto.

CAPITOLO 1

Microalghe in Acquacoltura

Le microalghe sono un vasto ed ubiquitario gruppo di microrganismi fototrofi (usano come fonte di energia la luce), autotrofi (utilizzano la CO₂ come fonte di carbonio) e litotrofi (prendono il potere riducente da fonte inorganica, l'H₂O). Insieme ai cianobatteri sono la maggior componente del regno delle piante e giocano un ruolo importante nella formazione e mantenimento dell'atmosfera terrestre, producendo ossigeno e consumando anidride carbonica. Inoltre costituiscono il fitoplancton e parte del fitobentos e si trovano alla base della catena alimentare acquatica (Muller-Fuega, 2008).

Le microalghe hanno dimensioni variabili (1-50 µm) e da un punto di vista tassonomico sono un raggruppamento molto eterogeneo. In tabella 1.1 è riportata la classificazione recentemente proposta da Barsanti e Gualtieri (2005) con le principali caratteristiche che contraddistinguono le classi.

Le alghe (intendendo con questo termine macro, microalghe e cianobatteri) possono essere suddivise in base a differenze chimiche e morfologiche. Da un punto di vista morfologico si possono distinguere in forme unicellulari, coloniali o filamentose, forme mobili con diverso apparato di motilità e numero di flagelli. Tutte le classi contengono clorofilla a, alcune possono avere anche clorofilla b, c o d. Distinti pigmenti accessori come ficobiline e fucoxantina caratterizzano le diverse classi, così come la presenza di pareti cellulari e prodotti di riserva chimicamente differenti.

Le microalghe entrano in molte simbiosi ed hanno colonizzato una grande varietà di ambienti, dalle sorgenti d'acqua calda ai ghiacci polari, e molte specie mostrano resistenza ad alte salinità, basse intensità luminose, siccità (Muller-Fuega 2008).

Gli ambienti di elezione delle microalghe sono i corpi d'acqua, sia dolce che di mare, salmastra o ipersalina.

Tabella 1.1 - Schema di classificazione delle alghe.

Regno	Divisione	Classe	Clorofilla	Pigmenti	P. riserva	PUFA
Prokaryota	Cyanophyta	Cyanophyceae	Chl a	Ficobiline, β carotene e xantofille	Glicogeno, cianoficine	C16 - C18
	Prochlorophyta	Prochlorophyceae				
Eukaryota	Glaucophyta	Glaucophyceae				
	Rhodophyta	Bangiophyceae Florideophyceae	Chl a, d	Ficobiline, carotenoidi	Amido	C18:2, C20:4, C20:5
	Heterokontophyta	Chrysophyceae	Chl a, c	Fucoxantina	Lipidi, crisolaminarina	C16 - C22
		Xanthophyceae	Chl a, c	Caroteni, xantofille	Lipidi, crisolaminarina	C16:1, C20:5
		Eustigmatophyceae	Chl a	β - carotene, violaxantina, vaucherixantina	Lipidi	C16:1, C20:5
		Bacillariophyceae Raphidophyceae Dictyochophyceae	Chl a, c	Fucoxantina	Lipidi, crisolaminarina	C16:1, C20:5
	Haptophyta	Phaeophyceae	Chl a, c	Fucoxantina	Laminarina	
		Haptophyceae				
	Cryptophyta	Cryptophyceae	Chl a, c	Ficobiline, carotenoidi	Amido, lipidi	C16:1, C18:3, C14:4, C20:5
		Dinophyta	Dinophyceae	Chl a, c	Caroteni, xantofille	Amido, lipidi
	Euglenophyta	Euglenophyceae	Chl a, b	Caroteni, xantofille	Paramylon (β -glucano)	C16:1, C18:1
	Chlorarachnophyta	Clorarachnophyceae				
	Chlorophyta	Prasinophyceae	Chl a, b	β - carotene, xantofille	Amido nei cloroplasti	C16:4, C18:2, C18:3 α
		Chlorophyceae	Chl a, b	Caroteni, xantofille	Amido nei cloroplasti	16:1, 18:3, 18:4
		Ulvophyceae				
		Cladophorophyceae				
		Bryopsidophyceae				
		Zygnematophyceae				
		Trentepohliophyceae				
		Klebsormidiophyceae				
Charophyceae						
Dasycladophyceae						

1.1 Importanza delle microalghe

Le microalghe, compresi i cianobatteri che con le microalghe condividono il metabolismo bioenergetico (la fotosintesi ossigenica), ma ne differiscono per la struttura cellulare (eucariotica nelle prime, procariotica nei secondi), sono direttamente responsabili di poco meno del 50% della fotosintesi sulla terra. Tuttavia, se si considera che, secondo la teoria dell'endosimbiosi, i cianobatteri sotto forma di cloroplasti sono presenti nelle microalghe, così come nelle macroalghe e nei vegetali inferiori e superiori, in realtà tutta la fotosintesi ossigenica sulla terra è opera di questi antichi microrganismi procariotici.

Le microalghe, grazie alle loro semplicità strutturale, hanno un'efficienza fotosintetica che a seconda delle condizioni di crescita, può spingersi fino al 7-8% della radiazione visibile in condizioni di coltura massiva e salire ad un 20% in condizioni di laboratorio ed è nettamente maggiore a quella delle piante superiori (ca 2%).

Questi fototrofi sono caratterizzati da una grande diversità fisiologica e metabolica e sono in grado di sintetizzare numerose molecole organiche complesse ad alto valore biologico aventi una natura chimica spesso non riscontrabile in altri organismi, come acidi grassi poliinsaturi, sostanze antifungine, antibatteriche ed antivirali, agenti antineoplastici, vitamine, pigmenti, sfruttabili dall'industria alimentare, chimica e farmaceutica, in cosmesi e diagnostica. Le microalghe vengono utilizzate anche per la produzione di biomassa come fonte di proteine destinate all'alimentazione umana (health foods) ed animale, come biofertilizzanti e combustibili, come mangimi per l'acquacoltura e nella depurazione di acque di scarico (Pulz e Gross, 2004; Spolaore et al., 2006). In particolare le microalghe vengono utilizzate in acquacoltura, per creare la "green water" e la "pseudo green water", ma soprattutto perché sono un'importante fonte alimentare nell'allevamento commerciale di molti animali acquatici, nelle varie fasi di sviluppo di molluschi bivalvi, fase larvale di gamberi e in organismi come rotiferi, i quali vengono utilizzati per allevare le larve di pesci e crostacei marini (Borowitzka, 1997).

1.2 Composizione biochimica

Le microalghe sono costituite circa dal 50% di carbonio, dal 10% di azoto e dal 1% di fosforo e la composizione biochimica delle microalghe utilizzate in acquacoltura è

costituita mediamente dal 30-52% di proteine, dal 10-23% di lipidi e dal 5-23% dei carboidrati ed altri composti di minore importanza (Brown et al., 1997; Brown 2002; Muller-Fuega 2008). La composizione biochimica delle microalghe può variare da specie a specie, ciò dipende molto dalle condizioni colturali (temperatura, salinità, intensità luminosa, nutrienti etc) e dalla fase di crescita in cui si trova l'alga (Brown, 2002).

Variazioni della salinità associate a differenti concentrazioni dei nutrienti determinano cambiamenti nel contenuto dei principali costituenti della biomassa e della velocità di crescita. Ad esempio l'aumento della salinità associato a basse concentrazioni di azoto in *T. suecica* può indurre un incremento delle proteine (Fàbregas et al., 1984).

Anche la concentrazione dei nutrienti può influenzare significativamente le produttività di colture microalgali e la composizione biochimica della biomassa. E' noto che alcune microalghe, come ad esempio *Nannochloropsis* sp. aumentano il contenuto di lipidi totali dal 20-30% fino ad arrivare al 50-60% (Borowitzka, 1988; Rodolfi et al., 2009) in condizioni di azoto carenza. Inoltre sembra che l'aumento del contenuto di lipidi durante l'azoto starvazione, sia principalmente ottenuto a spese di altri componenti, come le proteine (Rodolfi et al., 2009). Anche alte irradianze e carenza di fosforo possono indurre un incremento del contenuto di acidi grassi saturi (Rodolfi et al., 2009). Altre specie microalgali (ad esempio *Chlorella* sp.), invece, se sottoposte a condizioni di stress, aumentano la sintesi di carboidrati fino al 55% della biomassa (Borowitzka, 1988). Nel caso di *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) in presenza di basse concentrazioni di azoto incrementa sia il contenuto in lipidi che quello carboidrati (Sukenin e Wahnnon, 1991). Mentre l'aumento dei carboidrati non è associato a una diminuzione di produttività, l'accumulo di lipidi di solito determina riduzione della crescita (Rodolfi et al., 2009).

Per l'elevato contenuto proteico e l'alto valore biologico delle proteine sintetizzate le microalghe trovano impiego come integratori alimentari sia per l'uomo che per gli animali (Becker, 2004).

I carboidrati nelle alghe si presentano sotto forma di amido, cellulosa ed altri polisaccaridi. L'elevato contenuto in carboidrati della biomassa algale, così come la capacità di accumulare tali metaboliti in condizioni di stress, ha fatto crescere l'attenzione nei confronti di questi microrganismi come fonte di zuccheri da destinare ai processi di fermentazione per ottenere bioetanolo (Chisti, 2007).

I lipidi sono un gruppo eterogeneo di composti chimici aventi funzioni biologiche e proprietà chimiche molto diversificate (Nelson e Cox, 2002). La maggior parte dei lipidi si trovano come costituenti della membrana cellulare e come composti di riserva, altri svolgono funzioni importanti come cofattori e pigmenti. I trigliceridi sono molecole non polari insolubili in acqua e costituiscono la maggior parte dei lipidi di riserva delle microalghe (fino all'80%, della frazione lipidica totale) (Becker, 2004) che accumulano sotto forma di goccioline di olio nel citoplasma. Sono tipicamente formati da tre acidi grassi uniti con legame estere a ciascun ossidrilico di una molecola di glicerolo.

Fosfolipidi e glicolipidi, invece, sono molecole polari e rappresentano i principali componenti della membrana citoplasmatica e della membrana tilacoidale dei cloroplasti. Gli acidi grassi sono caratterizzati dalla diversità di lunghezza della catena idrocarburica, che nelle microalghe può variare dai 12 ai 22 atomi di carbonio, e dal numero e posizione dei doppi legami tra gli atomi di carbonio delle catene. Gli acidi grassi possono essere suddivisi in saturi, se non presentano doppi legami, ed insaturi se hanno doppi legami; in genere gli acidi grassi poliinsaturi (con due o più doppi legami) sono associati ai galattolipidi delle membrane citoplasmatiche (Borowitzka, 1988, Guschina e Harwood., 2006). Gli acidi grassi poliinsaturi a lunga catena (PUFA) devono essere assunti con la dieta sia nel caso dell'uomo, che degli animali (pesci). Fra questi, un ruolo di particolare importanza nella alimentazione e salute umana ed animale è rivestito da quelli appartenenti alla famiglia degli ω 3 (ac. α -linolenico 18:3, ac. eicosapentaenoico 20:5, ac. docosaesaenoico 22:6) e ω 6 (ac. linoleico 18:2, ac. γ -linolenico 18:3, ac. diomo- γ -linolenico 20:3, ac. arachidonico 20:4)

Microalghe e cianobatteri sono i produttori primari di PUFA a lunga catena come ARA, GLA, EPA e DHA. Numerose microalghe appartenenti alle varie classi tassonomiche contengono nella frazione lipidica elevate quantità di EPA (3-4% ps) e DHA (1-2% ps) (Molina Grima et al., 1999; Chini Zittelli et al., 1999) necessari sia per contrastare alcune patologie umane e per lo sviluppo e l'accrescimento delle specie acquatiche. Nella maggior parte dei casi questi microrganismi sintetizzano prevalentemente uno di tali acidi grassi e ciò costituisce un indubbio vantaggio rispetto alle fonti tradizionali (ad esempio olio di pesce).

Le microalghe rappresentano una preziosa risorsa di vitamine essenziali (A, B1, B2, B6, B12, C, E, biotina ed acido folico) (Spolaore et al., 2006). Le vitamine migliorano il valore nutrizionale delle cellule algali, ma la loro quantità fluttua in presenza di determinati fattori ambientali, o a causa del trattamento di raccolta o del metodo di

essiccamento (Brown et al., 1997; Borowitzka, 1988). Una fra le microalghe più ricche in vitamina E è *Tetraselmis suecica* (Carballo- Càrdenas et al., 2003) .

La presenza dei pigmenti, necessari a catturare la radiazione solare fotosinteticamente attiva (PAR) compresa tra i 400 nm e i 750 nm è uno degli elementi impiegati per la classificazione tassonomica delle microalghe.

I principali pigmenti sono:

- Clorofille: tutte le clorofilla presentano un maggiore assorbimento tra 450-475 nm (blu-verde) e tra 630-675 nm (rosso). La clorofilla a è il pigmento fotosintetico primario che ritroviamo in tutte le microalghe. Come le piante superiori, Chlorophyta e Euglenophyta contengono oltre alla clorofilla a anche clorofilla b. Clorofilla c, d ed e sono presenti in alcune alghe marine e diatomee di acqua dolce (Becker, 2004). La percentuale di clorofilla totale in una microalga varia da 0.5-2% del peso secco e dipende molto dalla quantità di luce ricevuta.
- Carotenoidi: presentano un picco di assorbimento tra 400 nm e 550 nm e oltre ad essere pigmenti ausiliari nella fotosintesi, svolgono un ruolo essenziale di protezione dalla fotossidazione. I più comuni riscontrati nella maggior parte delle specie sono: β -carotene, luteina, astaxantina. La concentrazione media di carotenoidi nelle microalghe è circa 0.1-0.2% del peso secco, ma in condizioni di stress alcune specie possono incrementarne significativamente la concentrazione (ad es. *Dunaliella*, *Haematococcus*). Ad esempio *Dunaliella* in presenza di stress ambientali e nutrizionali accumula più del 14% del peso secco di β -carotene, ciò ha permesso di commercializzare questo carotenoide naturale, che fino al 1980 veniva prodotto esclusivamente in maniera sintetica.
- Ficobiliproteine: sono pigmenti accessori ad alta fluorescenza, tipici di cianobatteri ed alghe rosse. Tali pigmenti sono utilizzati commercialmente ad esempio come coloranti naturali nei cibi, come pigmenti in cosmesi, come reagenti fluorescenti nelle diagnosi mediche, oltre ad avere possibili impieghi farmaceutici legati alle loro capacità anti-ossidanti ed anti-infiammatorie (Becker, 2004).

1.3 Le applicazioni commerciali e l'utilizzo in acquacoltura

La produzione di biomassa algale è ristretta ad un commercio “di nicchia”. Il sistema più antico per coltivare le microalghe sono i laghi naturali. Quando una o poche specie algali crescono spontaneamente in corpi idrici naturali, in presenza di elevate concentrazioni di nutrienti (azoto e fosforo) e di elevati livelli di radiazione luminosa, si parla di *bloom* o fioriture. Questo fenomeno che provoca gravi alterazioni dei corpi idrici non sempre è indesiderato. Ci sono infatti zone dove il bloom è sfruttato dall'uomo. Ad esempio, i bloom di *Arthrospira platensis* (spirulina) sono frequenti nei laghi alcalini del Messico, Ciad e Asia dove spesso vengono utilizzati a scopo alimentare dalle popolazioni locali (Abdulqader et al., 2000). Lagune naturali vengono commercialmente usate per la produzione estensiva di *Dunaliella salina* come fonte di β -carotene in Australia (Western Biotechnology Ltd). Quindi con eccezione di poche specie coltivate in fermentatori, e poche microalghe, come *Chlorella* che crescono in fotobioreattori, la produzione commerciale delle microalghe è principalmente svolta in vasche o in lagune ed è limitata a specie appartenenti al genera *Arthrospira*, *Chlorella* e *Dunaliella* che hanno il vantaggio di possedere un alto tasso di crescita o di avere un mezzo di crescita selettivo che limita la contaminazione. Le ragioni per la quale si ha un grande utilizzo dei sistemi aperti, sono il basso costo e il facile utilizzo. Comunque la maggioranza delle microalghe non richiede un ambiente di crescita specifico o un mezzo selettivo, e non può essere coltivata per periodi prolungati all'aperto in sistemi aperti a causa della contaminazione.

I fotobioreattori forniscono un sistema chiuso che non permette l'invasione di specie sconosciute e un miglior controllo dei parametri colturali (pH, temperatura, pO_2 , etc..) assicurando la dominanza della specie desiderata (Tredici et al., 2009). Sebbene siano state sviluppate molte tipologie di fotobioreattori chiusi (FBR) per la coltivazione di microrganismi fotosintetici, pochissimi sono quelli impiegati per impianti commerciali. In tabella 1.2 sono riportati i vari impianti commerciali che producono microalghe nel settore dell'acquacoltura.

Le microalghe vengono utilizzate in acquacoltura, principalmente per fornire nutrimento a larve di molluschi, crostacei e pesci, creare la “green water” e la “pseudo-green water”. Molti studi indicano che alcune microalghe quando vengono introdotte nelle vasche di coltura con lo zooplankton danno effetti benefici agli organismi allevati (larve di pesci,

gamberi), determinando un miglior risultato in termini di sopravvivenza e crescita se comparato con quello ottenuto con la tradizionale tecnica (denominata “acqua chiara”). La tecnica “green water” consiste nell’ottenere fioriture naturali di fitoplancton mediante fertilizzazione dell’acqua di mare naturale ed utilizzare tale fioritura per l’allevamento delle larve insieme allo zooplancton. Invece la “pseudo-green water” consiste nell’integrazione giornaliera di opportune quantità di fitoplancton controllato, in modo da mantenere la concentrazione a valori costanti ed ottimali. Questa tecnica presenta dei vantaggi rispetto alla tecnica “green water”, ad esempio il fitoplancton introdotto è controllato, l’ombreggiatura è costante e non c’è una dipendenza dalla stagione (Tredici et al., 2009)

Tra le specie algali più utilizzate per la “pseudo-green water” si ha *Nannochloropsis* sp., *Isochrysis galbana* e *Chlorella* sp.

Gli effetti positivi della “pseudo-green water” sono molto probabilmente dovuti ad un’azione sinergica di differenti fattori:

- effetto di ombreggiamento della biomassa microalgale
- miglioramento della qualità delle acque dovuto alla produzione di ossigeno ed uptake nei nutrienti da parte delle microalghe determinando così una stabilizzazione del pH
- mantenimento di un’alta qualità nutrizionale dello zooplancton come fonte di nutrimento per le larve
- regolazione della popolazione batterica attraverso la produzione di sostanze antibatteriche (effetto probiotico) (ad esempio *T. suecica*) (Tredici et al., 2009)

Nell’allevamento larvale di pesci, molluschi e crostacei, le specie microalgali più utilizzate sono *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Chlorella*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* e *Thalassiosira*. In tabella 1.3 sono riportate tutte le microalghe utilizzate in acquacoltura e l’ambito di utilizzo. Combinazioni di diverse specie algali forniscono una nutrizione ben bilanciata e permettono di migliorare la crescita degli animali (Hemaiswarya et al., 2011; Spolaore et al. 2006). Per essere utilizzati in acquacoltura, i ceppi microalgali devono avere determinate caratteristiche: 1) essere facilmente coltivabili; 2) non tossici; 3) avere un alto valore nutrizionale; 4) avere idonee dimensioni cellulari; 5) avere una parete cellulare digeribile (Becker, 2004; Patil et al., 2007; Tredici et al., 2009).

Tabella 1.2 – Impianti commerciali di microalghe per acquacoltura (da Tredici et al., 2009)

Impianto commerciale	Specie microalgale utilizzata	Settore di utilizzo
Reed Mariculture In. (USA) (www.reed-mariculture.com)	<i>Nannochloropsis oculata</i>	Pseudo-green water, produzione e arricchimento rotiferi
	<i>Tetraselmis</i> sp.	Fase post-larvale di molluschi bivalvi, fase larvale di gamberi, produzione di rotiferi
	<i>Isochrysis</i> sp. CCMP1324	Fase larvale e post- larvale di molluschi bivalvi, fase larvale di gamberi, arricchimento rotiferi
	<i>Pavlova</i> sp. CCMP459	Fase larvale e post- larvale di molluschi bivalvi, arricchimento rotiferi e <i>Artemia</i>
	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1051	Fase larvale e post- larvale di molluschi bivalvi e gamberi, produzione <i>Artemia</i> e copepodi
	Mix: <i>Isochrysis</i> 25%, <i>Tetraselmis</i> 20%, <i>Pavlova</i> 20%, <i>Thalassiosira</i> 30%, <i>Nannochloropsis</i> 5%	Tutti gli stadi dei molluschi bivalvi
	Mix: <i>Tetraselmis</i> , <i>Nannochloropsis</i>	Produzione rotiferi
Innovative Aquaculture Products Ltd (Canada) (www.innovativeaqua.com)	<i>Nannochloropsis oculata</i>	Pseudo-green water
	<i>Nannochloropsis</i> , diatomee	Rotiferi, <i>Artemia</i> , arricchimento copepodi
	Mix: <i>Chaetoceros</i> sp., <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Fase post-larvale (>200µm)
BlueBioTech GmbH (Germania) (www.bluebiotech.de.com)	<i>Nannochloropsis</i> sp.	Pseudo-green water, starter colture, produzione e arricchimento rotiferi
	<i>Isochrysis</i> T-ISO	produzione e arricchimento rotiferi
Necton SA (Portogallo) (www.phytobloom.com)	<i>Nannochloropsis</i> sp.	Pseudo-green water, produzione e arricchimento rotiferi
Fitoplancton Marino SL (Spagna) (www.easyalgae.com/index_ingles.asp)	<i>Nannochloropsis gaditana</i> , <i>Tetraselmis chuii</i>	Pseudo-green water, produzione e arricchimento rotiferi
	<i>Nannochloropsis</i> , <i>Tetraselmi</i> , <i>Chaetoceros</i> , <i>Isochrysis</i> , <i>Skeletonema</i> , <i>Phaeodactylum</i> , <i>Rhodomonas</i>	Pseudo-green water, starter colture, produzione e arricchimento rotiferi, colture di bivalvi
Aquafauna Bio-Marine Inc. (USA) (www.aquafauna.com)	<i>Schizochytrium</i> sp.	Arricchimento <i>Artemia</i> e rotiferi,
	<i>Schizochytrium</i> sp., <i>Haematococcus</i>	Arricchimento <i>Artemia</i> e rotiferi
Pacific Trading Co Ltd (Giappone) (www.pacific-trading.co.jp)	<i>Chlorella</i> sp., cellule arricchite con vitamina B ₁₂	Produzione rotiferi
	<i>Chlorella</i> sp., cellule arricchite con vitamina B ₁₂ EPA e DHA	Arricchimento rotiferi

Tabella 1.3 - Le microalghe utilizzate in acquacoltura e l'ambito nel quale vengono utilizzate (da Becker, 2004; Muller-Fuega, 2008)

Microalghe	Stadio larvale di molluschi bivalvi	Stadio larvale di gamberi	Stadio larvale di gamberi di acqua dolce	Stadio post-larvale di molluschi bivalvi	Stadio larvale di Abalone	gamberetti di acqua salmastra	rotiferi marini	Prede vive per lo stadio larvale di pesci	zooplankton di acqua dolce
Bacillariophyceae									
<i>Skeletonema costatum</i>		x		x					
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	x	x		x					
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> , <i>C. muelleri</i>	x	x	x	x		x			
<i>Chaetoceros affinis</i> , <i>C. calcitrans</i>	x	x		x		x			
<i>Cylindrotheca closterium</i>		x							
<i>Bellerochea polymorpha</i>				x					
<i>Actinocyclus normanii</i>				x					
<i>Nitzschia closterium</i> , <i>N. paleacea</i>						x			
<i>Cyclotella nana</i>						x			
Haptophyceae									
<i>Isochrysis affinis galbana</i> , <i>I. tahiti</i>	x	x	x	x		x			
<i>Pseudoisochrysis paradoxa</i>	x		x	x					
<i>Dicrateria</i> sp.				x					
<i>Cricosphaera elongata</i>				x					
<i>Coccolithus huxleyi</i>				x					
<i>Pavlova lutheri</i> , <i>P. pinguis</i>	x			x		x	x		
Chrysophyceae									
<i>Pyramimonas virginica</i>	x			x					
<i>Micromonas pussila</i>				x					
Cryptophyceae									
<i>Cryptomonas</i>				x					
<i>Rhodomonas salina</i>	x			x					
<i>Chroomonas salina</i>				x					
Xanthophyceae									
<i>Olisthodiscus luteus</i>				x					
Cyanophyceae									
<i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i>		x		x		x	x	x	
Chlorophyceae									
<i>Tetraselmis suecica</i>	x	x		x	x	x	x	x	
<i>Chlorella</i> sp.	x		x			x	x	x	x
<i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>S. quadricauda</i>						x	x		x
<i>Dunaliella tertiolecta</i>				x		x	x	x	
<i>Chlamydomonas khaki</i>	x			x			x		x
<i>Chlorococcum</i> sp.				x					
<i>Brachiomonas submarina</i>				x					
<i>Spongiococcum excentricum</i>	x								
Eustigmatophyceae									
<i>Nannochloris oculata</i> , <i>N. gaditana</i>				x			x	x	

CAPITOLO 2

Biotecnologia delle colture algali: il sistema di coltura

Lo sfruttamento delle microalghe richiede l'impiego di biotecnologie affidabili in grado di assicurare produzioni su vasta scala del microrganismo di interesse e non può prescindere da un adeguato sistema di coltura. Con il termine reattore s'intende un generico sistema di coltura all'interno del quale gli organismi fototrofi svolgono le loro reazioni fotobiologiche (Tredici, 2004). Le tipologie di reattori che realmente hanno trovato un'applicazione commerciale su larga scala non sono tuttavia numerose (Lehr e Posten, 2009). I sistemi colturali sono essenzialmente riconducibili a due tipi: sistemi aperti e fotobioreattori chiusi (FBR).

2.1 Sistemi di coltura aperti

I sistemi di coltura aperti sono utilizzati in impianti commerciali per la produzione di biomassa algale. Si basano sull'impiego di grandi vasche generalmente di forma circolare od oblunga, profonde qualche decina di centimetri e nelle quali la coltura viene rimescolata grazie a sistemi di pompe o pale. Valori medi per un sistema aperto possono oscillare tra $5 \text{ g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$ e $25 \text{ g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$, con punte di $40\text{-}50 \text{ g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$ per brevi periodi (Tredici et al., 2009). Oltre che alle basse produttività areali i sistemi aperti sono anche caratterizzati da basse produttività volumetriche. Presentano bassi costi di investimento e di gestione, ma presentano seri limiti tra i quali emergono:

- difficile controllo dei contaminanti;
- perdita di ingenti quantitativi di acqua per evaporazione ($100\text{-}200 \text{ m}^3$ per ha al giorno);
- scarso controllo dei parametri colturali (temperatura, pH, luce);
- basso rapporto superficie/volume (S/V) e quindi bassa concentrazione cellulare e bassa produttività volumetrica con conseguente incremento dei costi per la raccolta.

A causa di queste limitazioni solo poche specie vengono coltivate a livello industriale in vasche aperte. Si tratta di specie, come ad esempio *Arthrospira* sp. e *Dunaliella salina* che richiedono condizioni di coltura altamente selettive (elevato pH o elevata salinità) o di specie molto resistenti e competitive come *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp.. Quasi la totalità, 90%, della produzione mondiale di biomassa algale viene realizzato avvalendosi di questa tipologia di sistemi colturali.

I sistemi aperti possono essere suddivisi in: laghi e depressioni naturali, vasche circolari, vasche inclinate, vasche di tipo “raceway”.

- Laghi e depressioni naturali: in determinate condizioni ambientali (elevati valori di nitrati e fosfati, pH e temperatura prossime all’optimum) si possono sviluppare delle fioriture (*bloom*) di microalghe o cianobatteri (ad es. nel lago di Ciad si hanno bloom di *Arthrospira* sp.).



- Vasche circolari: consistono in grandi vasche di forma circolare, nelle quali la coltura viene rimescolata grazie a sistemi di pale ruotanti. Non hanno trovato grande applicazione su scala commerciale a causa degli elevati costi di realizzazione; sono quasi realizzate in cemento. Usate principalmente in Asia per la coltura di *Chlorella* sp..



- Vasche inclinate: in esse il mixing della coltura è determinato per gravità, in quanto la coltura tende a depositarsi su un piano inclinato e successivamente viene pompata sul margine superiore. Questo tipo di sistema aperto ha dei limiti che consistono in elevati costi energetici per il pompaggio della coltura, una ridotta efficienza di utilizzo della CO₂ ed un’elevata evaporazione (Tredici, 2004).

- Vasche di tipo “raceway”: attualmente quasi tutta la produzione a livello mondiale di biomassa algale è ottenuta impiegando questa tipologia di sistemi colturali. Si tratta di bacini a corsie costruiti in cemento oppure scavati nel



terreno le cui pareti sono rivestite da teli di plastica. Le dimensioni di tali dispositivi impiegati nella produzione industriale vanno dai 1000 ai 5000 m². Il livello della coltura nella vasca è mantenuto ad un'altezza di 15-30 cm e mantenuto in agitazione mediante pale (paddle wheels). Un importante vantaggio delle vasche "raceway" è il basso consumo energetico richiesto per l'agitazione della coltura, ca 6,5 kWh ha⁻¹ giorno⁻¹ (Becker, 1994).

2.2 Sistemi di coltura chiusi

I fotobioreattori sono dei sistemi di coltura chiusi costruiti con materiale trasparente, nei quali la luce deve attraversare le pareti del reattore prima di raggiungere la superficie della coltura. In questi sistemi lo scambio di gas, liquidi e particelle (microrganismi, insetti, polvere) fra la coltura e l'atmosfera viene significativamente ridotto (Tredici, 2004).

I FBR presentano costi di investimento e di gestione maggiori rispetto ai sistemi aperti ma ottengono produttività volumetriche più elevate e stabili nel tempo. Tali sistemi permettono un elevato grado di controllo delle condizioni colturali consentendo così di ridurre i fenomeni di contaminazione delle colture e rendere possibile la coltivazione di un maggior numero di specie microalgali. Nei FBR è generalmente ottenibile una maggiore efficienza di conversione di CO₂ in biomassa rispetto ai sistemi aperti.

Nel corso degli ultimi 50 anni sono state sviluppate e brevettate numerose tipologie di fotobioreattori per la coltura di microrganismi fotosintetici, distinte per il design (piatti o tubolari; orizzontali, verticali, inclinati o a spirale; a manifold o a serpentina), sistema di agitazione (pompe, aria compressa), materiale costruttivo (vetro, lastre di plastica rigida, film plastici flessibili), orientamento ed inclinazione (Tredici, 2004). Sebbene non esista un singolo tipo di FBR adatto alla coltura di tutti i microrganismi fotosintetici (diversi per morfologia, fisiologia, richieste nutrizionali e di luce, resistenza agli stress) si possono, tuttavia, individuare alcuni parametri fondamentali per la loro progettazione (Tredici, 2004) e cioè:

- Il rapporto superficie/volume (S/V) che determina la quantità di luce che entra nel sistema per unità di volume ed il regime luminoso al quale le cellule sono sottoposte. Più elevato è questo rapporto, più elevate sono la concentrazione cellulare della coltura e la produttività volumetrica ottenute. Questo rappresenta, da un punto di vista operativo, un importante vantaggio economico perché permette di ridurre i volumi del mezzo di coltura e abbreviare i tempi per la

raccolta della biomassa. Tuttavia, va tenuto in considerazione che elevati rapporti S/V possono determinare accumulo di O₂, surriscaldamento delle colture e fenomeni di inibizione legati all'escrezione di sostanze di rifiuto (Tredici, 2004; Weissman et al., 1988).

- Il controllo della temperatura è uno degli aspetti critici della coltivazione massiva dei microrganismi autotrofi in FBR, specialmente all'aperto. È condizionato da fattori quali la latitudine, la stagione e la temperatura ottimale dei microrganismi coltivati ed è uno degli obiettivi più impegnativi da raggiungere in quanto la soluzione adottata può incidere significativamente sui costi di gestione dell'impianto. Per il controllo della temperatura vengono tipicamente utilizzati i seguenti sistemi: immersione dei reattori o parte di essi in piscine, spruzzo di acqua nebulizzata sulla superficie del reattore, utilizzo di scambiatori di calore interni al reattore.
- Gli scambi gassosi. Durante il processo della fotosintesi viene prodotto ossigeno la cui concentrazione è strettamente correlata con la quantità di biomassa prodotta per unità di volume (l'incremento di 1 g di biomassa comporta il rilascio di circa 1 g di ossigeno). Concentrazioni elevate di ossigeno risultano tossiche per molte specie microalgali e, se associate a elevata radiazione luminosa, possono portare alla morte delle cellule per fotossidazione.
- L'agitazione della coltura è fondamentale per evitare la sedimentazione delle cellule e la stratificazione termica, per distribuire uniformemente i nutrienti, per rimuovere l'ossigeno fotosintetico e per assicurare a tutte le cellule una alternanza di periodi di luce-buio. I principali sistemi di agitazione adottati nei fotobioreattori prevedono l'utilizzo di pompe, di aria compressa insufflata alla base del reattore o l'utilizzo di sistemi "airlift".
- L'orientamento dei FBR rispetto al sole e la loro inclinazione a vari angoli rispetto all'orizzontale dà la possibilità di intercettare più o meno radiazione luminosa. Il diverso orientamento può avere il duplice scopo di ottenere la massima intercettazione della luce incidente e/o la diluizione della stessa. I sistemi verticali, a differenza di quelli orizzontali, possono essere orientati e inclinati in modo da intercettare la massima radiazione solare ed incrementare la produttività della coltura, oppure essere orientati in modo da diluire la luce incidente ed aumentare l'efficienza fotosintetica (Tredici e Chini Zittelli, 1997).

Tredici e Chini Zittelli (1998) hanno confrontato FBR piatti e tubolari dimostrando che quest'ultimi ottengono efficienze fotosintetiche e produttività più elevate in quanto la loro superficie curva permette la diluizione spaziale della luce attenuando gli effetti negativi della fotosaturazione.

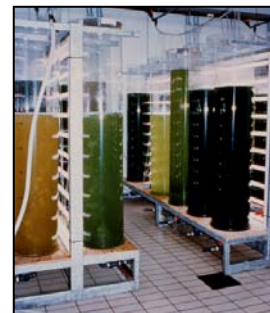
- La tipologia del materiale utilizzato che deve essere trasparente, non tossico, resistente alle intemperie, avere una buona stabilità chimica, facile da pulire ed economico.

Anche se non ancora ottimizzati, la biotecnologia algale sembra ormai puntare sui sistemi chiusi che conseguono più elevate produttività volumetriche ed areali e consentono di coltivare quelle specie che, non crescendo su mezzi selettivi, sono difficili da mantenere come colture unialgali nei bacini aperti. Tuttavia, i costi di investimento ed operativi notevolmente maggiori e non sempre compensati dalla maggior produttività, rendono lo scaling-up dei FBR più difficile rispetto a quello delle vasche "raceway". Nei FBR si usano sistemi di agitazione così energeticamente dispendiosi che solo per il rimescolamento della coltura si perde gran parte dell'energia contenuta nella biomassa. Ciò deve essere accuratamente valutato in sede preventiva nel caso si produca biomassa per ottenere biocombustibili.

I FBR possono essere classificati tenendo conto di alcuni parametri (Tredici, 2004) come: design, modalità di funzionamento e materiali costruttivi.

Alcune delle tipologie di fotobioreattori sono di seguito brevemente descritte:

- Sacchi in polietilene e colonne verticali: tali dispositivi sono tipicamente utilizzati negli impianti di acquacoltura per la produzione del fitoplancton, essi hanno un diametro di 30-50 cm, possono contenere un volume di coltura compreso tra 200 e 500 L e vengono di solito illuminati artificialmente mediante lampade fluorescenti collocate all'esterno dei reattori. L'insufflazione di aria compressa arricchita in CO₂ alla base del cilindro o sacco permette il rimescolamento della coltura. I sacchi di polietilene rappresentano il sistema di produzione più economico e ciò a causa del basso costo del materiale e della facilità



di costruzione. I sacchi di PE hanno però vita breve a causa dell'adesione di materiale alle pareti (biofouling) che riduce la penetrazione della luce. In alternativa ai sacchi di polietilene si possono utilizzare cilindri rigidi trasparenti, più costosi ma molto più resistenti e riutilizzabili dopo pulitura e disinfezione. Il principale svantaggio di tali sistemi è il basso rapporto S/V e quindi le basse produttività volumetriche ottenibili. Per risolvere tale problema sono state realizzate presso il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università degli Studi di Firenze colonne anulari in plexiglass, nelle quali la coltura viene introdotta nell'intercapedine creata tra due cilindri di differente diametro disposti l'uno dentro l'altro ed incollati ad una base. Internamente può essere predisposto un sistema di illuminazione artificiale (Chini Zittelli et al., 2003; 2006).

– Fotobioreattori tubulari: questo tipo di sistemi chiusi possono essere classificati in tre gruppi:

– *Reattori a serpentina*: sistemi in cui tubi di vetro o di plastica trasparente sono uniti da giunzioni ad “U”. All'interno di essi la coltura circola ad una velocità di 20-30 cm s⁻¹ mediante pompe o sistemi di “air lift” (Molina Grima et al., 2003). Con questo ultimo sistema si riducono al minimo gli stress meccanici sulle cellule (shear stress), evitando così di danneggiarle.



– *Reattori manifold*: consistono in una serie di tubi paralleli, alle cui estremità sono connessi due collettori (manifold) uno per la raccolta della sospensione cellulare, l'altro per la movimentazione e distribuzione della coltura. I principali vantaggi di questo sistema rispetto ai reattori a serpentina sono le minori perdite di carico e il minor accumulo di ossigeno fotoprodotto.



Presso il dipartimento il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università di Firenze, il Prof. Tredici e collaboratori hanno sviluppato un reattore di questa tipologia: l'NHTR (Near Horizontal Tubular Reactor).

- *Reattori “helical”*: formati da tubulari flessibili di ridotto diametro (2,5-5 cm) generalmente in materiali plastici (polietilene o PVC) avvolti a spirale su dei supporti verticali cilindrici. La coltura circola all’interno del sistema attraverso pompe o un sistema air-lift (Tredici, 2004). Il degassaggio della coltura è disposto a termine della spirale; da qui la coltura viene convogliata in un bagno termostato necessario alla termoregolazione della coltura.



- Fotobioreattori piatti: questa tipologia si presta molto meglio dei reattori tubolari ad essere inclinata e orientata a differenti angoli così da aumentare o ridurre la radiazione intercettata. Ciò consente di ridurre il contributo della radiazione diretta ed aumentare quello della radiazione diffusa e riflessa. Queste ultime due componenti, caratterizzate da minore intensità rispetto alla diretta, giocano un ruolo fondamentale nel determinare l’efficienza fotosintetica della coltura e quindi della produttività (Tredici, 2010). Si possono suddividere in:

1. *Pannelli alveolari*: sviluppati a partire dagli anni ’80, sono costituiti da fogli di materiale plastico (PVC o polietilene) , aventi delle piccole divisioni interne, gli “alveoli”, dove viene fatta scorrere la coltura. Gli alveoli possono essere disposti parallelamente al terreno o verticalmente ad esso. Se gli alveoli sono paralleli al terreno la coltura viene agitata tramite pompe, se sono disposti verticalmente al terreno la coltura è agitata attraverso l’insufflazione di aria compressa. I ridotti spessori di questi reattori garantiscono elevati rapporti S/V (160 m^{-1}) e conseguentemente elevate produttività volumetriche ($> 2 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$) e concentrazioni superiori ai 4 g L^{-1} . Questo si riflette positivamente al momento della raccolta. L’elevato biofouling, rappresenta il maggiore limite di tali sistemi.

2. *Pannelli in vetro*: costituiti da lastre in vetro montate a formare un parallelepipedo di ridotto spessore il quale è internamente suddiviso da paratie verticali che gli conferiscono rigidità strutturale. Le lastre possono avere differenti spessori. Anche se questa tipologia di reattori è facile da pulire e

sono molto trasparenti, presentano un elevato costo che non permette l'impiego su larga scala (Tredici, 2007).

3. *Pannelli "disposable"*: tipicamente costituito da un sacco in polietilene ad elevata trasparenza (>80% del PAR) che costituisce la camera di coltura, la quale è contenuta all'interno di una struttura metallica in modo da dare rigidità e ridurre al minimo il rigonfiamento dovuto alla pressione idrostatica. La movimentazione della coltura avviene mediante una tubazione, appositamente forata, disposta sul fondo del reattore nella quale viene insufflata aria compressa. La termostatazione è ottenuta mediante la nebulizzazione di acqua sulla superficie esterna del reattore o attraverso l'inserimento nella camera di coltura di una serpentina all'interno della quale viene fatta circolare acqua termostata. Sono sistemi facilmente assemblabili e consentono lo *scaling-up* del sistema fino ad impianti industriali. Il sacco di polietilene può essere pulito facilmente, altrimenti può essere sostituito con uno nuovo. Un esempio di tale tipo di reattore è il "Green Wall Panel" sviluppato e brevettato (brevetto:WO2004/074423) presso il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie (Tredici e Rodolfi, 2004) ed impiegato con successo per la coltura di *Tetraselmis suecica* (periodo settembre-ottobre, Fienze) con produttività 20-27 g m⁻² giorno⁻¹ a seconda dell'orientamento. *Nannochloropsis* sp. coltivata in azoto starvation, ha fornito produttività in biomassa di 0,3 g L⁻¹ giorno⁻¹ ed un contenuto in lipidi del 60% (Rodolfi et al., 2009). Oltre alle elevate produttività, il "Green Wall Panel" ha dimostrato possedere anche un buon mass-transfer, condizione fondamentale per evitare sovraccumulo di ossigeno. Tale reattore è stato anche impiegato per la sperimentazione all'aperto condotta in questa tesi. Per poter rendere ancora più competitivo il "Green Wall Panel" nei confronti delle altre tipologie di FBR, ma anche di sistemi aperti come le vasche, nell'ultimo anno, sempre presso il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie è stata sviluppata e brevettata (Tredici et al., 2009, brevetto italiano) una nuova versione del suddetto reattore. L'altezza del FBR è stata diminuita da 1 m a 0,7 m, questo ha consentito di ridurre le dimensioni, il



peso e di conseguenza il costo della struttura. Il costo a metro lineare di pannello si è così abbassato dai 150 €m⁻² della prima tipologia a 30 €m⁻² della nuova versione. Entrambi i reattori sono attualmente commercializzati da Fotosintetica & Microbiologica S.r.l. (spin-off dell'Università di Firenze).

2.3 Applicazioni industriali a sistemi aperti e a sistemi chiusi

Oggi assistiamo ad un crescente interesse volto a migliorare e sviluppare tecnologie per una coltivazione su larga scala delle microalghe. Gli impianti commerciali per la produzione di biomassa algale si basano soprattutto su tipologie di reattori aperti. In figura 2.1 sono riportati alcuni esempi di realtà commerciali in cui vengono impiegate principalmente vasche “raceway”.

Sebbene siano state sviluppate molte tipologie di fotobioreattori chiusi (FBR) per la coltivazione di microrganismi fotosintetici, pochissimi sono quelli impiegati per impianti commerciali. La maggior parte degli impianti attualmente in funzione usano FBR tubolari, in plastica o in vetro, ad eccezione di **BioReal, Inc.** che ha realizzato un impianto che si estende su una superficie di 8 ha costituito da bioreattori di particolare design (“biodome”).

In figura 2.2 sono mostrati gli impianti a FBR chiusi attualmente operativi nel settore delle energie rinnovabili, degli health foods, degli integratori alimentari ed altri “chemicals” pregiati. Di seguito una sommaria descrizione di alcuni dei dispositivi, aperti o chiusi, utilizzati (Tredici et al. 2010):

NTB Ltd. Eilat (Israele). L'impianto, destinato alla coltura intensiva di *Dunaliella salina* per la produzione di β-carotene, occupa una superficie complessiva di 100.000 m². La biomassa, raccolta mediante centrifugazione (centrifughe Westfalia) è successivamente essiccata a formare una polvere mediante sistema spray-drying.

Cyanotech (Hawaii, USA). Sviluppa e commercializza prodotti naturali da microalghe: BioAstin® astaxantina naturale da *Haematococcus* e Hawaiian Spirulina Pacifica®. La coltivazione massiva di entrambe le specie viene fatta in vasche profonde non più di 20 cm.

Western Biotechnology Ltd. (Hutt Lagoon, Australia). L'impianto, 250 ha di laguna. Costituisce uno dei più grandi esempi di sfruttamento di bacini naturali per la coltura di

microrganismi fotosintetici. L'impianto destinato alla produzione di β -carotene da *Dunaliella salina*, ha una capacità di produzione di 6 tonnellate di β -carotene.

GreenFuel Technologies Corp. (Massachusetts, USA). Fondata nel 2001 da ricercatori del MIT (Massachusetts Institute of Technology) e di Harvard. Produce inoculi come fonte di biocombustibile.

AlgaeLink N.V. (Olanda). In passato ha sviluppato e pubblicizzato fotobioreattori di tipologia a colonna verticale avente il diametro di 0,9 m ed altezza fino 12 m. Attualmente commercializza un fotobioreattore a serpentina orizzontale costituito da tubulari in Plexiglas® di 0,64 m di diametro. Fornisce impianti di differenti dimensioni, dichiarando una capacità produttiva dalle 10 alle 100 tonnellate di biomassa secca al giorno come fonte di biocombustibile (Tredici et al., 2009).

Mera Pharmaceuticals, Inc. (già Aquasearch Inc. USA). La compagnia ha sviluppato e brevettato un reattore chiamato Aquasearch Growth Module (AGM), avente un volume di 25.000 L e costituito da un tubolare in polietilene di 38 cm di diametro ripiegato su se stesso a formare tubi paralleli. La coltura è agitata mediante una pompa. Il FBR è utilizzato per produrre inoculi di *H. pluvialis* da destinare alla coltura in vasche raceway per la produzione di astaxantina.

Algatechnologies Ltd. (Israele). L'impianto, che si sviluppa su di una superficie di 1,2 ha, è costituito da reattori tubolari manifold sia orizzontali che verticali ed è utilizzato per la coltura di *H. pluvialis* per la produzione di carotenoidi, funzionanti come pigmenti accessori, quali astaxantina. La peculiarità di questo impianto è che sia la "fase verde" che la "fase rossa" (accumulo di asta xantina) avvengono entrambe impiegando il fotobioreattore. Generalmente, vedi compagnie quali *Cyanotech Corp.* (Hawaii, USA), la coltura viene stressata ed indotta ad accumulare astaxantina in sistemi aperti tipo in vasche raceway .

Bioprodukte Prof. Steinberg GmbH (Klötze, Germania). È l'impianto più grande a fotobioreattori, mai costruito per la produzione di microalghe. Esso occupa un'area di 12.000 m², consiste di 20 moduli di FBR tubolari costituiti da tubi di vetro (diametro 48 mm) giuntati fra loro, per una lunghezza totale di 500 km ed un volume complessivo di 700 m³ L'impianto è usato per la coltura di *Chlorella* sp. con produzioni potenziali di 100-130 t/anno di biomassa.

Salata GmbH (Ritschenhausen, Germania). L'impianto, in fase di scaling-up, è simile al precedente ed utilizza moduli da 15-25 m³ per coltivare diverse specie microalgali).

Earthrise Farms (USA)



Gong Bi Microalgae (Taiwan)



Cyanotech (Hawaii)



MPI (Myanmar)



WB Ltd (Australia)



NTB Ltd (Israele)



Figura 2.1 - Principali impianti commerciali a vasche oggi operativi

Compagnia	Microrganismo coltivato	Prodotto
Earthrise farms (USA)	<i>Arthrospira platensis</i>	Integratore alimentare
Cyanotech (Hawaii)	<i>Arthrospira platensis</i>	Integratore alimentare Ficobiliproteine per diagnostica
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina naturale: acquacoltura, mangimi, integratore alimentare
Gong Bi Microalgae (Taiwan)	<i>Chlorella</i> sp.	Integratore alimentare
Myanmar Pharmaceutical Industries (Myanmar)	<i>Arthrospira</i> sp.	Health foods
Western biotechnology (Australia)	<i>Dunaliella salina</i>	β -carotene naturale: integratore alimentare
Nature Beta Technologies (Israele)	<i>Dunaliella</i> sp.	

(*Nannochloropsis* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp., *Porphyridium* sp., *Oscillatoria* e *Lyngbia*. La maggior parte degli impianti a FBR attualmente operativi coltivano microalghe per ottenere prodotti ad alto valore commerciale che possono giustificare gli alti costi di produzione. Tuttavia, quando si prospettano le colture algali come fonte di biocombustibili o sistemi per abbattere le emissioni di gas serra è necessario premettere quanto si sia ancora abbastanza lontani dall'obiettivo. Le numerose iniziative di carattere prettamente commerciale nate a questo proposito (si veda ad esempio: <http://www.greenfuelonline.com>; <http://www.valcent.net>; <http://www.algaelink.com>), sono da ridimensionare.

In Tabella 2.1 sono riassunte la principali applicazioni commerciali della microalghe.

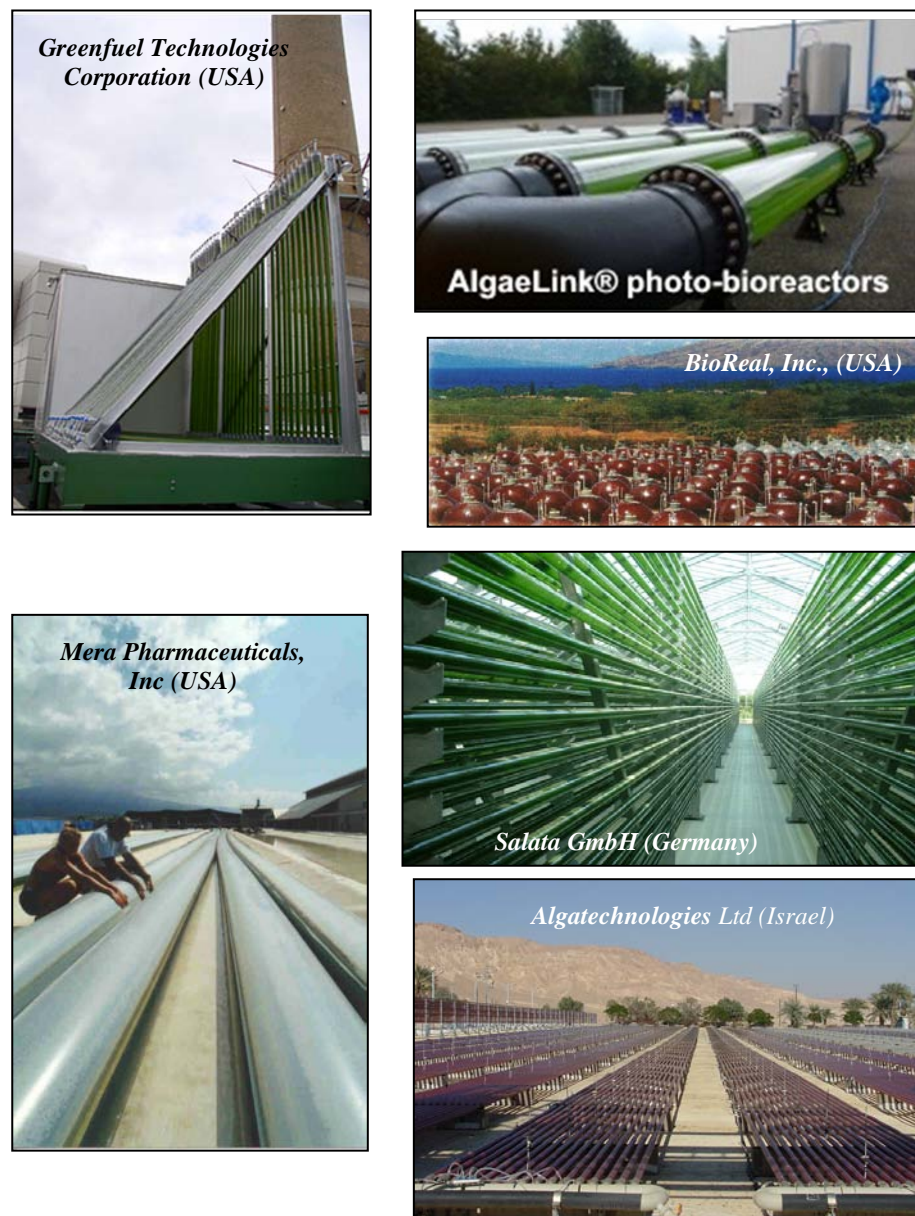


Figura 2.2 - Principali impianti a FBR oggi operativi.

Tabella 2.1- Applicazioni commerciali e potenziale delle microalghe (Tredici et al., 2009)

Genere	Produzione (tonnellate anno⁻¹)	Sistema di coltura	Luogo	Area di applicazione/ prodotto
<i>Arthospira</i>	3000 (p.s.)	Vasche “raceway”, bloom naturali	Asia, USA	Integratori alimentari, cosmetici, ficoliliproteine, additivi alimentari
<i>Chlorella</i>	2000 (p.s.)	Vasche circolari, fermentatori, FBR	Asia, Germania	Integratori alimentari, cosmetici, acquacoltura
<i>Dunaliella</i>	1200 (p.s.)	Vasche “raceway”, lagune	Australia, Israele, Asia	Integratori alimentari, cosmetici, β-carotene
<i>Haematococcus</i>	300 (p.s.)	Vasche “raceway”, FBR	USA, Israele	Integratori alimentari, acquacoltura, astaxantina
<i>Aphanizomenon</i>	500 (p.s.)	Bloom naturali	USA	integratori alimentari
<i>Nostoc</i>	600 (p.s.)	Suolo arido, semiarido	Asia *, America	Health food
<i>Odontella</i>	n.d.	Vasche “raceway”	Francia, Germania	Integratori alimentari
<i>Cryptocodinium</i>	240 (olio)	Fermentatori (10-100 m ³)	USA	ω3-PUFA (DHA) come integratori alimentari, nutraceuticals, additivi alimentari
<i>Schyzochytrium</i>	10 (olio)	fermentatori (10-100 m ³)	USA	ω3-PUFA (DHA) come integratori alimentari e additivi alimentari
<i>Ulkenia</i>	n.d.	Fermentatori (80 m ³)	Germania	ω3-PUFA (DHA) come integratori alimentari, nutraceuticals
<i>Porphyridium</i>	n.d	Sacchi, FBR	Israele	Cosmetici, ficoeritrine, ω6-PUFA (AA)
Varie spp.	1000 (p.s.)	Vasche, cilindri, sacchi	mondiale	Mangimi per acquacoltura

* In Cina la raccolta del genere *Nostoc* è limitata

FBR = fotobioreattori

CAPITOLO 3

La nutrizione dei pesci e la qualità del prodotto ittico

La pesca e l'acquacoltura nel 2010 hanno fornito a livello mondiale 148 milioni di t di pesce di cui circa 128 milioni sono state utilizzate come alimento per l'uomo. I dati del 2011 mostrano un incremento della produzione fino a raggiungere i 154 milioni di t di cui 131 sono state destinate all'alimentazione umana.

L'acquacoltura a livello mondiale produce attualmente 64 milioni di tonnellate all'anno di prodotti ittici, pari al 50% del pesce consumato globalmente e tale percentuale è in continua crescita, con un tasso annuo medio del 9%, a causa del continuo incremento della popolazione (Tabella 3.1), della maggiore richiesta di pesce come alimento e della minore pescosità (FAO, 2012).

Attualmente l'acquacoltura moderna italiana è inserita, a pieno titolo, nel sistema europeo e mediterraneo. Nell'acquacoltura italiana le specie marine di pesci compaiono nella scena nei primi anni settanta. Prima la spigola, poi l'orata hanno mostrato un progressivo affermarsi come produzioni ittiche dominanti, con produzioni che sono cresciute rapidamente e che, già nel 2000, hanno raggiunto rispettivamente 8.100 t e 6.000 t (Figura 3.1).

La spigola e l'orata sono tra le specie ittiche più pregiate del Mediterraneo. Abbondantemente presenti nelle lagune costiere e nelle aree estuariali e rocciose della fascia costiera sono state tradizionalmente le specie bersaglio della pesca costiera.

L'impresa acquacolturale italiana, che nel 2003 ha incrementato la produzione della spigola del 18,5% rispetto al 2000 (raggiungendo le 9600 t), deve confrontarsi con l'agguerrita concorrenza dei Paesi che realizzano la produzione a costi molto più bassi (Grecia, Turchia).

Il grado di approvvigionamento nazionale per la spigola nel 2003 è stato del 40,2% e nel 2004 l'import è salito a 17.447 t (+ 48,9% rispetto al 2000). In particolare nel 2004 l'importazione dalla Grecia (con un prezzo medio di 4,85 €kg⁻¹) è salita al 50,8% dei volumi totali e quella dalla Turchia (con un prezzo medio di 4,31 €kg⁻¹) è salita al 36% dei volumi totali importati (Poli et al., 2008).

Oggi, nel Mediterraneo sia la spigola che l'orata sono diventate le specie di punta dell'acquacoltura di specie marine, grazie ai successi nella riproduzione controllata ottenuti a partire dai primi anni settanta. Allevate originariamente in impianti a terra, queste specie sono state poi allevate in gabbie galleggianti in mare sia per disporre di ambienti di allevamento migliori, sia per contenere l'impatto ambientale generato dagli allevamenti a terra.

Tabella 3.1 - Pesca e produzione di acquacoltura di prodotti ittici e loro utilizzo a livello mondiale. Valori espressi in milioni di tonnellate.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011
PRODUZIONE						
CATTURA						
in acqua dolce	9,8	10,0	10,2	10,4	11,2	11,5
in mare	80,2	80,4	79,5	79,2	77,4	78,9
Totale cattura	90,0	90,3	89,7	89,6	88,6	90,4
ACQUACOLTURA						
in acqua dolce	31,3	33,4	36,0	38,1	41,7	44,3
in mare	16,0	16,6	16,9	17,6	18,1	19,3
Totale acquacoltura	47,3	49,9	52,9	55,7	59,9	63,6
Totale	137,3	140,2	142,6	145,3	148,5	154,0
UTILIZZO						
Consumo umano	114,3	117,3	119,7	123,6	128,3	130,8
Uso non alimentare	23,0	23,0	22,9	21,8	20,2	23,2
Popolazione (miliardi)	6,6	6,7	6,7	6,8	6,9	7,0
Consumo pro capite (kg)	17,4	17,6	17,8	18,1	18,6	18,8

(da FAO, 2012)

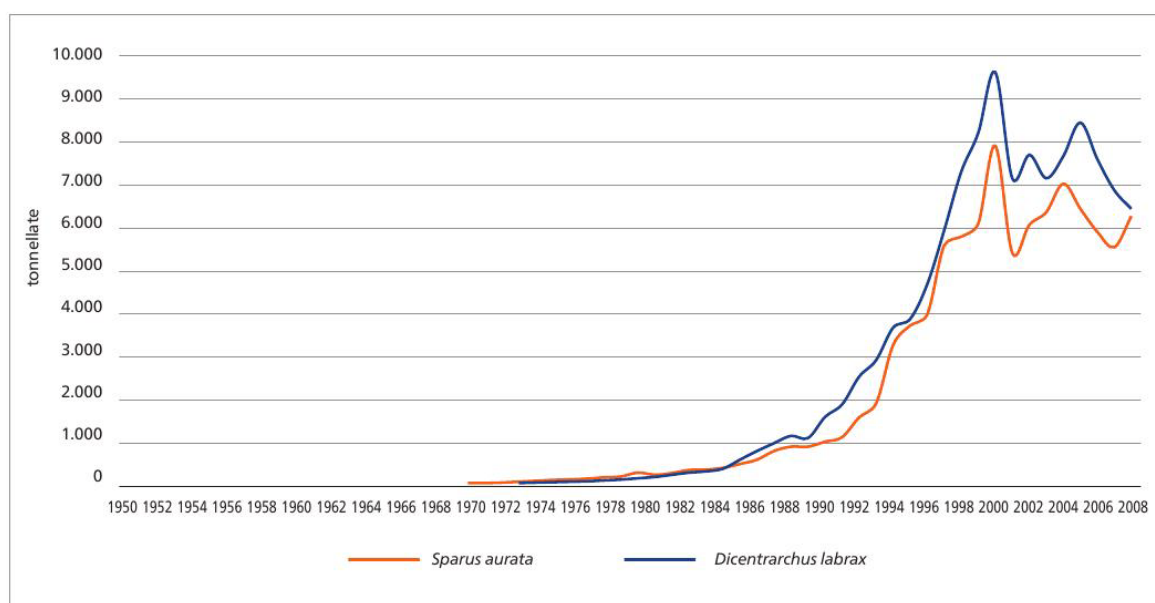


Figura 3.1 - Produzione ittica della spigola e dell'orata dal 1950 al 200 (da Poli, 2011)

Fattore determinante per ottimizzare la produzione ittica negli impianti di allevamento è l'alimentazione dei pesci, in quanto da questa dipende il benessere del pesce e la qualità del prodotto ittico.

3.1 Nutrizione dei pesci in acquacoltura

La nutrizione degli organismi acquatici negli allevamenti intensivi riveste una notevole importanza sia dal punto di vista tecnico che economico. Sebbene le conoscenze sui fabbisogni dei pesci non abbiano ancora raggiunto un livello paragonabile a quello conseguito per le specie omeoterme, i dati acquisiti finora appaiono sufficienti a garantire più che soddisfacenti risultati tecnici ed economici nelle specie di tradizionale allevamento, assicurando ottime prestazioni, elevata resistenza agli stress ed alle malattie, contenimento dell'impatto ambientale e qualità del prodotto. Parlando di alimentazione è importante considerare anche gli aspetti gestionali relativi alla distribuzione dei mangimi, spesso trascurati dagli allevatori, con conseguente spreco di alimento, aumento nell'inquinamento e peggioramento dei risultati economici dell'impresa. Qui di seguito verranno analizzati dapprima i fattori che influenzano l'ingestione di alimento e gli aspetti gestionali dell'alimentazione, illustrando poi le più recenti acquisizioni sul ruolo nutrizionale svolto da proteine, aminoacidi, lipidi, vitamine e elementi minerali, presentando infine i fabbisogni nutritivi delle principali specie allevate.

3.1.1 Ingestione dell'alimento

La quantità di alimento ingerita dai pesci dipende da molteplici fattori classificati come intrinseci ed estrinseci. Tra i fattori intrinseci più importanti si segnalano il peso vivo del pesce, poiché la quantità di alimento ingerita (espressa in percentuale del peso vivo) diminuisce al crescere della taglia, lo stato fisiologico dell'animale e la specie. Tra i fattori estrinseci, si hanno le caratteristiche dell'alimento quali il suo valore energetico, la presenza di quantità elevate di proteine vegetali o di sostanze anti-nutrizionali e le dimensioni del pellet, e le condizioni ambientali di allevamento, cioè il livello di ossigeno, temperatura, fotoperiodo e intensità luminosa. Molti di questi fattori vengono

considerati dai produttori di mangimi che forniscono idonee tabelle di razionamento in funzione della specie e della taglia del pesce e della temperatura dell'acqua. Le formule che consentono di stimare la quantità di alimento che può essere ingerito per la spigola e l'orata sono:

$$\text{per la spigola } R\% = 0,51 \times W^{-0,15} \times e^{0,07T}$$

$$\text{per l'orata } R\% = 2,78 \times \ln W + 0,148 T$$

dove R% è l'ingestione volontaria giornaliera in % del peso vivo, W è il peso vivo che è espresso in grammi e T è la temperatura dell'acqua in °C (Tibaldi et al., 2001).

Per il calcolo delle quantità di alimento da fornire è necessario conoscere la taglia media dei pesci ed anche la biomassa totale, ricorrendo a campionamenti periodici. La raccolta periodica di questi dati permette di calcolare il tasso di accrescimento specifico (TAS) nel proprio impianto e stimare con questo anche il peso vivo che verrà raggiunto dopo un periodo di giorni "t":

$$TAS = [(\ln(\text{peso finale}) - \ln(\text{peso iniziale})) / \text{numero giorni}] \times 100$$

Infatti il peso finale al tempo t (Pt) sarà uguale a

$$P_t = P_o \times e^{(TAS \times t / 100)}$$

dove Po è il peso iniziale ed "e" è il numero di Nepero (o Eulero) pari a 2,718 (Tibaldi et al., 2001).

La formulazione di un alimento può essere variata sia nella combinazione che nella selezione di vari ingredienti base, al fine di ottenere un mix capace di fornire i nutrienti necessari al pesce ed ottenere un perfetto mix alimentare. Inoltre è importante che i pellets del mangime rimangano integri nell'acqua finché il pesce non li consuma. Ciò per assicurare una buona ingestione dei nutrienti, ma anche minimizzare l'inquinamento dell'acqua causato dalla disintegrazione del pellet.

Inoltre è importantissimo che i costi delle diete siano contenuti in modo che non pesino troppo sul prezzo di vendita del pesce (Halver e Hardy, 2002).

3.1.2 Proteine e aminoacidi nella dieta

Le proteine sono il principale costituente delle carni dei pesci, tra 65-75% del peso secco. Quantità inadeguate di proteine nella dieta determinano la riduzione o la

completa assenza di crescita. Dall'altro lato se la dieta presenta proteine in eccesso rispetto al fabbisogno, solo una parte dei loro aminoacidi sarà utilizzata per sintetizzare proteine e i rimanenti saranno utilizzati come fonte di energia.

Possono essere utilizzati due metodi per stimare o determinare la richiesta di proteine per la crescita. Il primo è un metodo diretto che misura l'escrezione dell'azoto endogeno come componente fecale, urinario e degli escreti branchiali. Tale procedura viene svolta fornendo al pesce diete carenti o a basso contenuto di proteine e viene analizzato ciò che viene perso tramite l'escrezione e la perdita branchiale. Il secondo o metodo indiretto, è più conveniente. La ritenzione di azoto può essere misurato dalla differenza tra azoto consumato e azoto trattenuto dal pesce alla fine del periodo sperimentale.

La richiesta di proteine per i giovanili di spigola europea, *Dicentrarchus labrax*, è il 45-50% e di orata, *Sparus aurata*, il 40-45% del mangime secco. Tali valori sono stati stimati dalle curve dose-risposta, fornendo nella dieta la minima quantità di proteine che sostengono la massima crescita (Tibaldi et al., 2001; Halver e Hardy, 2002).

La dieta con i livelli di proteine ottimali per i pesci è una dieta con un buon bilancio proteine-energia. Generalmente la richiesta delle proteine da parte dei pesci diminuisce con l'aumentare della taglia e dell'età. La proteina è digerita con rilascio di aminoacidi liberi, che sono assorbiti a livello del tratto intestinale e distribuiti nel sangue a organi e tessuti. Il 5-15% delle proteine si perde nelle feci mentre parte degli aminoacidi assorbiti viene catabolizzata per ottenere energia specialmente nel caso dei pesci carnivori, non in grado di utilizzare a tal fine amidi e zuccheri. Questo processo origina "scorie azotate" costituite in prevalenza da ammoniaca eliminata prevalentemente a livello delle branchie che, assieme alle feci, contribuiscono ad incrementare il carico inquinante dell'allevamento. Un'alimentazione responsabile del pesce deve pertanto massimizzare l'utilizzo della proteina dietetica per l'accrescimento, minimizzando il rilascio di scorie azotate nell'acqua (Tibaldi et al., 2001).

In tabella 3.2 è riportato il contenuto ideale in aminoacidi essenziali che ottimizzano la performance zootecnica di alcune specie ittiche in rapido accrescimento.

La variabilità del livello proteico ottimale fra le diverse specie dipende in modesta misura da fattori quali la taglia del pesce, la temperatura e la salinità dell'acqua ed è invece condizionato soprattutto dal contenuto energetico del mangime ed in particolar modo dall'apporto calorico delle frazioni lipidica e glucidica. Un corretto rapporto tra proteina ed energia digeribile (PD/ED) è realizzato bilanciando i macronutrienti nella dieta. Per energia digeribile s'intende quella parte di energia rimanente, la quale viene

assorbita attraverso la mucosa intestinale, dopo che parte del cibo non digerito viene rilasciato attraverso le feci. Anche la qualità della proteina condiziona il livello ottimale nel mangime: ingredienti proteici poco digeribili e con composizione in aminoacidi limitante rispetto ai fabbisogni del pesce portano ad incrementare il livello proteico del mangime a discapito di una efficiente conversione proteica (Tibaldi et al., 2001).

Tabella 3.2 - Fabbisogno in aminoacidi essenziali (% della proteina della dieta) di alcune specie ittiche e confronto con il profilo aminoacidico della farina di pesce.

Aminoacidi	Salmonidi	Spigola	Anguilla	Farine di pesce
Arginina	4,4	3,9	4,5	5,8-6,4
Istidina	1,6	1,3	2,1	2,0-3,4
Isoleucina	2,0	2,6	4,0	3,7-4,5
Leucina	3,6	4,3	5,3	6,5-7,5
Lisina	4,8	4,8	5,3	6,9-7,9
Metionina + Cistina	3,3	4,1	4,2	3,5-4,0
Fenilalanina + Tirosina	5,3	5,1	5,2	5,9-7,6
Treonina	2,0	2,6	4,0	3,9-7,3
Triptofano	0,6	0,6	1,1	0,9-1,2
Valina	3,3	2,9	4	4,5-5,4

(da Tibaldi et al., 2001)

3.1.3 I lipidi nella dieta

I lipidi presenti nella dieta dei pesci sono un'importante fonte di energia metabolica, specialmente nelle specie carnivore, che includono la maggior parte dei pesci marini oggetto di allevamento.

In genere, una quantità di lipidi pari al 10-20% del peso secco della dieta è sufficiente per permettere alle proteine di essere effettivamente utilizzate per la crescita senza accumuli eccessivi di lipidi nei tessuti corporei dei pesci. Oggi, l'interesse verso tali nutrienti si è concentrato sull'aspetto energetico dal momento che i lipidi, se forniti in quantità idonee, consentono di evitare il consumo di proteine per fini energetici, di ridurre il rilascio di N nell'ambiente e di migliorare l'indice di conversione alimentare. Non esiste un fabbisogno assoluto per i lipidi, tuttavia i livelli lipidici nelle diete non possono prescindere dalla specie, dallo stato di sviluppo (avannotto, pesce in accrescimento, riproduttore), dal rapporto ottimale energia/proteina per quella data specie (Tabella 3.3), nonché dai limiti tecnologici di fabbricazione del mangime.

Tabella 3.3- Livelli proteici ottimali (% mangime secco) e rapporto PD/ED consigliati nella dieta di alcune specie ittiche

Specie	Prot. grezza (%)	PD/ED (mg kJ ⁻¹)
Trota iridea	38-45	17-19
Spigola	45-50	20-22
Orata	40-45	19-20
Anguilla	44-48	nd

(da Tibaldi et al., 2001)

Troppi lipidi nella dieta portano ad un incremento della deposizione di grassi nel pesce con cambiamenti sui principali siti di accumulo (tessuto adiposo periviscerale, muscolo, fegato) e con possibili modifiche delle caratteristiche organolettiche della parte edibile (Tibaldi et al., 2001; Halver e Hardy, 2002; Corraze e Kaushik, 2009).

Con l'avvento dei mangimi estrusi (nuovo tipo di lavorazione e cottura dell'alimento), si è verificato un progressivo innalzamento dei tenori in grasso delle diete, per tutte le specie. Queste diete, se ben gestite, consentono di minimizzare l'impatto ambientale e di ottenere accrescimenti molto elevati. L'impiego dei mangimi estrusi richiede un maggior controllo del razionamento e dello stato di conservazione dei grassi, che possono essere soggetti ad ossidazione.

I lipidi alimentari sono anche importanti come fonte di acidi grassi essenziali (AGE), necessari per l'accrescimento e lo sviluppo del pesce in quanto non possono essere sintetizzati dai pesci stessi. Tuttavia solo una carenza dietetica molto prolungata di AGE porta alla morte del pesce, mentre sub-carenze o carenze periodiche danneggiano le prestazioni produttive e riproduttive.

I fabbisogni in AGE differiscono da specie a specie e, in generale, si osserva che i pesci di acqua dolce richiedono l'ac. linoleico (18:2 n-6) e/o l'ac. α -linolenico (18:3 n-3), mentre quelli marini e stenoalini, necessitano l'ac. eicosapentanoico (20:5 n-3) e/o l'ac. docosaesaenoico (22:6 n-3). Ad esempio il fabbisogno della spigola in PUFA n-3 è l'1% della dieta. I pesci marini carnivori si nutrono di pesci più piccoli che sono ricchi in ac. eicosapentanoico e docosaesaenoico derivanti dal fitoplancton attraverso lo zooplancton (Coutteau et al., 1996; Tibaldi et al., 2001; Alasalvar et al., 2002; Halver e Hardy, 2002; Corraze e Kaushik, 2009).

3.1.4 Le vitamine e i minerali nella dieta

Le vitamine sono classificate in liposolubili (A, D, E e K) ed idrosolubili (gruppo B, vit. C, colina e inositolo). Le prime vengono assorbite a livello intestinale in presenza di lipidi e possono essere accumulate nelle riserve adipose. Le seconde vengono assorbite mediante trasporto attivo, sono solubili in acqua e non possono essere accumulate dai pesci. La vitamina A (retinolo), che è presente negli alimenti vegetali soltanto come provitamina A o β -carotene, agisce sulla moltiplicazione cellulare, sulla vista e sulla protezione degli epitelii; la vitamina D interviene nel ricambio del calcio e del fosforo; la vitamina E partecipa al metabolismo cellulare ed ha una funzione antiossidante e la vitamina K interviene nella coagulazione del sangue. Le principali vitamine idrosolubili sono la tiamina (B1) che agisce come coenzima nel metabolismo dei carboidrati; la riboflavina (B2) e l'acido pantotenico (B5), che intervengono sul metabolismo energetico; la piridossina (B6) che svolge un ruolo importante nel metabolismo proteico dell'integrità dei diversi tessuti e come fattore anti-stress. Inoltre un alto contenuto di vitamina C incrementa l'immunità umorale del pesce.

I minerali essenziali per i pesci sono circa 20 e hanno la funzione di formare la struttura dello scheletro, mantenere il sistema colloidale (diffusione, pressione osmotica) e regolare l'equilibrio acido-base. I minerali essenziali sono importanti componenti di ormoni, enzimi e attivatori di enzimi. Na^+ , K^+ e Cl^- mantengono l'omeostasi e il bilancio acido base. Il Ca^{2+} richiesto dai pesci per la formazione dello scheletro e per la coagulazione del sangue, viene assunto diversamente dai pesci di acqua dolce e da quelli marini: nei primi attraverso le branchie e la superficie corporea, nei secondi attraverso l'acqua di mare. L'orata e la carpa richiedono infatti nella dieta un quantitativo basso di calcio, pari allo 0,34% o anche meno (Halver e Hardy, 2002). Tra i macronutrienti assume una notevole importanza il fosforo (il fabbisogno minimo per le trote è tra lo 0,03 e lo 0,24% s.s.), il quale è scarsamente assunto dall'acqua e quindi deve essere fornito con la dieta. L'uso di proteine vegetali addizionate con l'enzima fitasi consente di mantenere alti i livelli di fosforo negli alimenti, di ridurre la quantità di fosforo nelle acque reflue a 6-7 kg/t di pesce prodotto e permette un migliore utilizzo di altri ioni (Zn e Fe) e delle proteine. Infine il Mg^{2+} viene metabolizzato in associazione al calcio e al fosforo ed è un costituente fondamentale di diversi enzimi (Tibaldi et al., 2001).

3.2 Le diete in acquacoltura

L'alimentazione in acquacoltura è molto importante anche dal punto di vista economico in quanto incide sui costi di produzione in misura pari al 50% circa. La dieta formulata per l'industria dell'acquacoltura contiene proteine e lipidi, con un piccolo ammontare di vitamine e minerali. Mono e disaccaridi facilmente digeribili ed idrosolubili come glucosio e fruttosio sono sicuramente necessari nella dieta dei pesci.

Per l'elevato tenore proteico, l'ottimo profilo aminoacidico (Tabella 3.2) e le alte digeribilità ed appetibilità, la farina di pesce, purché ottenuta con idonei processi industriali a partire dal pescato fresco e privo di contaminanti, rappresenta la fonte proteica ideale nei mangimi per l'acquacoltura. Inoltre contiene tra il 4 e il 20% di lipidi. Nel 2003 l'acquacoltura mondiale ha utilizzato il 53% della produzione di farina di pesce e l'87% di olio di pesce.

L'allevamento della spigola, specie carnivora, avviene con l'utilizzo di mangimi. Normalmente, negli allevamenti ittici non viene fornita la medesima tipologia di mangime alle varie specie di pesci allevate, in quanto non esiste un'unica composizione in ingredienti della dieta valida per qualsiasi specie. Importante è produrre un mangime che soddisfi le esigenze nutrizionali dei pesci (Tabella 3.4). Normalmente i mangimi contengono un elevato contenuto proteico (45-50% di proteine) e il 10-20% di lipidi.

Nella formulazione dei mangimi per l'acquacoltura c'è stata una continua evoluzione. Le recenti forti oscillazioni nella disponibilità di mercato delle farine e degli oli di pesce hanno portato ad un aumento dei prezzi di queste materie prime, influenzando negativamente la redditività degli allevamenti ittici. Recenti studi (Mazzola e Marino, 2001) hanno dimostrato che le proteine di origine vegetale possono sostituire fino al 31% delle proteine totali della dieta della spigola, senza incidere sulle prestazioni produttive, e consentendo di conseguire un certo risparmio nei costi di alimentazione. L'utilizzo di queste nuove formulazioni ha l'indubbio beneficio di ridurre la quota di composti azotati rilasciata nell'ambiente, e di ridurre l'uso di farine di pesce; d'altra parte la composizione delle carni ed in particolare il tenore lipidico del muscolo risultano spesso modificati, per cui il prodotto a fine ciclo contiene oltre il 4% di lipidi ed è meno apprezzato sul mercato (Mazzola e Marino, 2001). Per la sostenibilità del sistema produttivo, la ricerca nel settore mangimistico si è sempre più spostata verso formulazioni a basso impatto ambientale, dove si valuta sempre di più la sostituzione di

parte della farina di pesce e olio di pesce, ingredienti base dei mangimi per l'acquacoltura, con farine e oli di origine vegetale.

Tabella 3.4 - Richieste nutrizionali della spigola

Nutrienti	Valore
Proteine grezze ^(1 e 2)	45-50 (% della dieta)
<i>Aminoacidi</i> ^(1 e 2)	(% di proteine)
Arginina	3,9
Istidina	1,3
Isoleucina	2,6
Leucina	4,3
Lisina	4,8
Metionina + Cisteina	4,1
Fenilalanina + Tirosina	5,1
Treonina	2,6
Triptofano	0,6
Valina	2,9
Lipidi ⁽³⁾	10-20 (% della dieta)
<i>Acidi grassi</i>	1 (% della dieta)
<i>polinsaturi PUFA n-3</i> ⁽³⁾	

(da: (1) Halver e Hardy., 2001; (2) Tibaldi et al., 2001; (3) Oliva-Teles, 2000)

Questi alimenti sono molto diversi per origine botanica e in relazione al processo tecnologico di produzione cui sono sottoposti e presentano almeno uno dei seguenti limiti rispetto alla farina di pesce: minor titolo proteico, ridotte digeribilità e appetibilità, profilo aminoacidico carente e/o sbilanciato, presenza di fattori antinutrizionali e, in alcuni casi, possono essere di origine OGM (Tibaldi et al., 2001; Corraze e Kaushik, 2009; Orban, 2011).

L'introduzione in queste diete delle farine vegetali, che possono presentare proteine carenti di alcuni aminoacidi che sono essenziali per le specie ittiche, non determinano lo stesso effetto delle diete contenenti esclusivamente farina di pesce, in quanto si ha una minor efficienza di utilizzo della proteina.

La più importante fonte di proteine di origine vegetale è la farina di semi oleaginosi, che ottenuta dopo l'estrazione dell'olio dalla soia, dal seme di cotone, dalle arachidi, dal girasole o dalla noce di cocco. Ad esempio la farina di soia contiene il 44% di proteine, ma purtroppo anche molti fattori antinutrizionali che importante devono essere tenuti presenti nella nutrizione del pesce. Alcuni (come l'inibitore della tripsina) possono

essere inattivati dal calore, mentre altri (come l'acido fitico) rimangono inalterati in presenza del calore.

Sia la farina di grano che la farina di glutine di mais sono sottoprodotti della lavorazione dei cereali e sono ingredienti altamente proteici (>60% e >75% proteine, rispettivamente) (Halver e Hardy, 2002; Corraze e Kaushik, 2009).

Quindi con le farine vegetali si può ricreare la composizione della farina di pesce, ma si avranno sicuramente problemi sulla qualità del prodotto ittico.

Grazie al buon contenuto proteico (40-50% del peso secco), un adeguato contenuto in vitamine (A, C, E) ed acidi grassi polinsaturi (Gouveia et al., 2008) le microalghe possono essere un'importante fonte alimentare alternativa nei mangimi per l'allevamento di animali acquatici (Milledge, 2011) (Tabella 3.5).

Recenti studi hanno mostrato che la parziale sostituzione della farina di pesce con *I. galbana* (T-ISO) nell'alimentazione dell'orata non determina cambiamenti né nella composizione del filetto di pesce né nella crescita (Palmegiano et al., 2009;). La microalga T-ISO si è mostrata altamente digeribile e le orate alimentate con diete a base di T-ISO hanno presentato una migliore crescita rispetto a quelle alimentate con la normale dieta di controllo (Palmegiano et al., 2009).

Tabella 3.5 - Composizione centesimale di differenti microalghe confrontate con la composizione centesimale della farina di pesce e della farina di soia.

Risorsa alimentare	Proteine (% s.s.)	Carboidrati (% s.s.)	Lipidi (% s.s.)
Farina di pesce	60-72	-	6-10
Farina di Soia	37-48	30	20
<i>Tetraselmis suecica</i>	45-50	13-15	15-20
<i>Isochrysis galbana</i>	40-45	12-15	25-30

(da: www.algae4feed.org)

3.3 I prodotti ittici

Il pesce, ma più in generale i prodotti ittici, forniscono proteine di elevato valore biologico, bilanciate nella composizione in aminoacidi essenziali, ricche in metionina e lisina. Tale caratteristica rende i prodotti ittici importanti non solo per la dieta dei Paesi

industrializzati, ma anche per l'alimentazione delle popolazioni più povere, che è spesso basata sul consumo di tuberi o cereali nei quali alcuni aminoacidi sono limitati. I prodotti ittici marini e di acqua dolce fredda sono anche caratterizzati da una composizione dei grassi particolare, che li rende differenti rispetto alle carni degli animali terrestri. Questi sono ricchi di acidi grassi polinsaturi, a catena lunga (20, 22 atomi di carbonio) e fra questi di particolare rilevanza sono quelli della serie n-3, tra i quali l'EPA e DHA dei quali i prodotti ittici sono l'unica fonte alimentare significativa. Come per gli acidi grassi PUFA n-6, è stata dimostrata l'essenzialità degli acidi grassi PUFA n-3. Infatti, studi recenti hanno dimostrato che una dieta mancante di n-3 provoca visione ridotta, anormalità nella retina, profonde modificazioni biochimiche nella composizione in acidi grassi delle membrane cerebrali, della retina ed altri organi. L'assunzione abituale di pesce è in grado di determinare un abbassamento del livello dei trigliceridi e del colesterolo, diminuendo quindi i fattori di rischio coronarico. Tali acidi grassi, uniti ad un'alimentazione equilibrata, possono quindi contribuire alla prevenzione delle malattie cardiovascolari. La quantità di acidi grassi PUFA n-3 da inserire nella dieta (3,5 g/settimana) viene inclusa tra i livelli di assunzione raccomandati dai nutrizionisti (Alasalvar et al., 2002; Yildiz et al., 2008; Orban 2011). Studi condotti da Alasalvar et al. (2002) hanno mostrato che ci sono alcune differenze tra la composizione della carne della spigola selvatica, pescata nel Mar Egeo, e quella della spigola allevata (alimentata con una dieta costituita da: 46% proteine, 20% grassi, 17,6% carboidrati, 1,2% fibra grezza) (Tabella 3.6).

Tab.3.6 - Analisi della composizione biochimica della carne di spigola allevata e selvatica. I valori medi \pm ds (n=4) sono espressi come % della carne fresca

Composizione biochimica	Spigola allevata	Spigola selvatica
Proteine	20,7 \pm 1,0	19,2 \pm 0,7
Grassi	5,2 \pm 1,3	1,4 \pm 1,3
Umidità	72,2 \pm 1,8	75,5 \pm 3,6
Ceneri	1,5 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1

(da Alasalvar et al., 2002)

Le spigole allevate avevano quantitativi di grassi maggiori ed una più bassa umidità rispetto alla spigola selvatica, probabilmente riconducibile alla dieta con alto contenuto di lipidi e alla ridotta attività dei pesci allevati (Alasalvar et al., 2002).

Inoltre Orban et al. (2001) riportano che indipendentemente dal periodo, dalla taglia e dalla zona di prelievo sono state sempre rilevate differenze significative di composizione chimico-nutrizionale ed organolettica nelle spigole allevate e selvatiche che hanno contraddistinto i prodotti di diversa origine (Tabella 3.7).

Tabella 3.7 - Composizione in nutrienti (g/100g peso fresco) e della frazione lipidica insaponificabile (mg/100 g peso fresco) di filetti di spigole (*Dicentrarchus labrax*) di allevamento e selvatiche.

	Allevato	Selvatico
Umidità	66,95-73,19	76,11-77,19
Proteine	19,22-19,93	18,92-20,12
Lipidi totali	5,66-11,71	1,54-3,25
Ceneri	1,09-1,30	1,24-1,34
Colesterolo	58,03-74,86	60,28-72,94
α-tocoferolo	0,75-2,08	0,62-0,97
Squalene	0,70-1,90	0,26-0,69
All-trans-retinolo (μg)	8,15-63,64	3,44-12,57

(da Orban et al., 2001)

In particolare Orban et al. (2001) hanno riscontrato:

- 1) tenore lipidico più elevato nel prodotto allevato (Tab. 3.7)
- 2) acidi grassi saturi superiori nel selvatico
- 3) acidi grassi monoinsaturi superiori nel prodotto allevato
- 4) contenuto in n-3 totali equivalente in spigole allevate e selvatiche
- 5) per il profilo in acidi grassi saturi e monoinsaturi: percentuali di 14:0, 20:1, 22:1 n-9 e n-11 superiori nelle specie allevate
- 6) profilo in polinsaturi: percentuali di 18:2 n-3, 18:3 n-3, 18:4 n-3, 20:5 n-3 superiori nelle specie allevate.

In un altro studio condotto da Yildiz et al. (2008) è stato anche osservato che le differenti stagioni non causano variazioni nel profilo degli acidi grassi del filetto della spigola allevata poiché esso riflette il profilo in acidi grassi del mangime commerciale. Inoltre è stato precedentemente osservato da Cordier et al. (2002) che spigole alimentate tutto l'anno con lo stesso mangime industriale non mostravano una correlazione significativa tra temperatura dell'acqua e DHA nel muscolo, bensì tra salinità dell'acqua e contenuto in DHA nel muscolo .

L'analisi sensoriale effettuata da Orban et al. (2001) in un laboratorio attrezzato dell'INRAN (Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione) ha rivelato differenze tra spigole selvatiche e allevate nella colorazione ed iridescenza della pelle, odore marino di alga e compattezza delle carni, sempre superiori nelle spigole selvatiche (Tabella 3.8)

Tabella 3.8 - Analisi sensoriale di spigole allevate e selvatiche (valore quantitativo dei descrittori: 0=min, 9=max)

	Allevato	Selvatico	
	Media \pm ds	Media \pm ds	t-test
Descrittori valutativi sul prodotto crudo			
Colore della carne	4,0 \pm 1,9	5,3 \pm 1,2	**
Consistenza della carne	6,3 \pm 0,9	6,8 \pm 0,7	*
Odore di alga	1,6 \pm 0,8	2,0 \pm 1,3	
Odore marino	4,9 \pm 1,1	5,6 \pm 0,8	*
Odore melmoso	1,7 \pm 1,8	0,4 \pm 0,6	**
Odore amminico	0,0 \pm 0,1	0,3 \pm 0,6	*
Descrittori valutativi sul prodotto cotto			
Odore marino	4,6 \pm 1,7	5,6 \pm 1,5	*
Odore di pesce/amminico	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	
Odore di ristagno	0,0 \pm 0,2	0,4 \pm 0,8	*
Odore marino di alga	3,5 \pm 1,7	4,9 \pm 1,5	**
Odore di ristagno	0,7 \pm 1,3	0,1 \pm 0,4	**
Fibrosità	2,3 \pm 1,9	2,6 \pm 1,6	
Succosità	6,3 \pm 1,2	5,2 \pm 1,5	**

Ns=non significativo; *P \leq 0,05; ** P \leq 0,01; ***P \leq 0,001 (da Orban et al., 2001)

3.4 Il benessere del pesce e la qualità del prodotto ittico

Il sistema produttivo acquacolturale ha subito, nel corso degli ultimi anni, alcuni mutamenti, mettendo sempre più al centro dei processi i principi di sostenibilità e di qualità.

La richiesta di avere sempre maggiori informazioni sulla composizione chimico-nutrizionale delle specie ittiche non viene solo dal consumatore, ma anche dal mondo della produzione; cooperative di pesca e acquacoltura, aziende di trasformazione, GDO (grande distribuzione organizzata) richiedono ai produttori informazioni sempre maggiori sul loro prodotto, incluso il valore nutrizionale. Di grande attualità è la possibilità di identificazione genetica e nutrizionale dell'origine dei prodotti, sia quale

strumento di sicurezza per attuare la tracciabilità cogente dal 2005 che per evitare frodi. Attenzione particolare viene rivolta all'ottimizzazione delle condizioni alimentari, igienico-sanitarie e di benessere degli animali, finalizzate ad ottenere prodotti salubri, di buona qualità nutrizionale ed organolettica, ma anche a carattere nutraceutico, cioè tale da garantire un certo grado di prevenzione verso alcune patologie come le malattie cardio-circolatorie ed alcuni tipi di tumore.

In acquacoltura ci sono vari standard di qualità, ma sono tutti abbastanza generici eccetto DOP e IGP. Prodotti certificati, che richiedono la supervisione di un ente terzo, sono anche i cosiddetti "prodotti tipici". Tali prodotti sono regolamentati, a livello europeo, tramite il regolamento 2081/92 CE che riguarda la protezione delle indicazioni geografiche e delle indicazioni di origine dei prodotti agricoli e alimentari.

– **DOP (Denominazione di Origine Protetta)**: per alimenti prodotti, trasformati e preparati all'interno di una determinata area geografica, con determinate caratteristiche che devono essere dovute alla stessa area. Anche le metodologie di produzione devono essere distintive della zona;

– **IGP (Indicazione Geografica Protetta)**: per alimenti prodotti, trasformati e preparati all'interno di un'area geografica e aventi una reputazione, una caratteristica o determinate qualità attribuibili alla stessa area.

Il 6 luglio 2011 il Parlamento Europeo ha approvato il nuovo regolamento sulle norme dell'informazione sui prodotti alimentari in vendita al consumatore. Una delle principali novità è l'inserimento della dichiarazione nutrizionale nell'elenco delle indicazioni obbligatorie, come previsto nell'art. 9 lett. I (Orban, 2011).

La sicurezza è un pre-requisito essenziale della qualità e rappresenta essa stessa lo standard minimo che contraddistingue l'alimento dal punto di vista igienico-sanitario. Ulteriori strumenti di sicurezza sono rappresentati dalla tracciabilità e dall'etichettatura del prodotto, che forniscono informazioni dettagliate e precise agli operatori della filiera: n. di identificazione di ogni partita, n. di identificazione e nome del peschereccio o nome dell'unità di produzione in acquacoltura, data di cattura o di produzione, quantitativi catturati di ciascuna specie, zona geografica di provenienza, metodo di produzione (allevato o pescato), pre-surgelati. Le ultime quattro informazioni devono essere fornite anche al consumatore secondo reg. (CE) 1224/2009.

Una condizione di benessere animale, garantita durante l'allevamento grazie al controllo dei parametri relativi alla qualità dell'acqua e dell'alimento, alla corretta densità e al buono stato di salute, è alla base dell'accrescimento e dello sviluppo degli animali da

carne. Inoltre, analogamente a quanto verificato in tutti gli animali da carne, le corrette procedure al momento della cattura/raccolta sono determinanti per ottenere un prodotto finale che rispecchi la qualità posseduta dell'animale in vita. Procedure che causano condizioni di stress severo negli animali si riflettono infatti in una serie di risposte endocrine/fisiologiche/ biochimiche prima della morte e biochimiche dopo la morte, che possono danneggiare la qualità e l'attitudine alla conservazione del prodotto, causando precoce sviluppo del rigor, discesa del pH muscolare, perdita di compattezza/durezza, minore capacità di ritenzione dell'acqua, peggiori proprietà dielettriche, maggiore lucentezza delle carni, ridotta shelf life (Poli et al., 2005).

La valutazione della qualità del prodotto inizia dall'attento esame dell'aspetto esteriore del pesce, sulla base di caratteri quali colore della livrea e tratti morfologici di interesse a livello commerciale. Morfologia e tratti merceologici appropriati vengono valutati mediante misure di lunghezza e di peso. Le misure di lunghezza (Figura 3.2) assumono anche un importante ruolo a livello commerciale per le specie di maggior interesse. In tabella 3.9 sono riportati i principali indici morfologici e merceologici e come vengono calcolati. Per ciascuna specie è stata definita una taglia minima, al di sotto della quale non è permessa la pesca e la commercializzazione (reg. (CE) 1967/2006, Allegato III).

Le caratteristiche fisiche ed organolettiche vengono valutate mediante l'andamento delle fasi di rigor mortis (fase pre rigor, pieno rigor, rilascio del rigor), delle proprietà dielettriche (i cui cambiamenti indicano modifiche nell'integrità del pesce), del pH, del colore, della consistenza e dello stato di freschezza/qualità.

Lo stato di freschezza, in particolare, è valutato con metodo sensoriale dall'aspetto generale di occhi, pelle, branchie, odore delle branchie, consistenza, elasticità e colore della carne sul crudo e consistenza, colore, sapore, aroma e succosità delle carni sul cotto. Questo parametro è in grado, anche da solo, di indicare con buona affidabilità la qualità del pesce. I metodi di valutazione più frequentemente usati sono quello ufficiale in Europa (reg. (UE) 2406/1996), che si applica sul pesce intero e che individua tre classi di freschezza del pesce, molto fresco (Extra), fresco (A) e stantio (B), e il Quality Index Method, che prevede la valutazione delle caratteristiche del pesce mediante l'attribuzione di un indice di demerito che assume valore uguale a 0 nel pesce freschissimo e che aumenta con il peggioramento della qualità (Luten e Martinsdøttir, 1997; Poli et al., 2005; Poli, 2011).

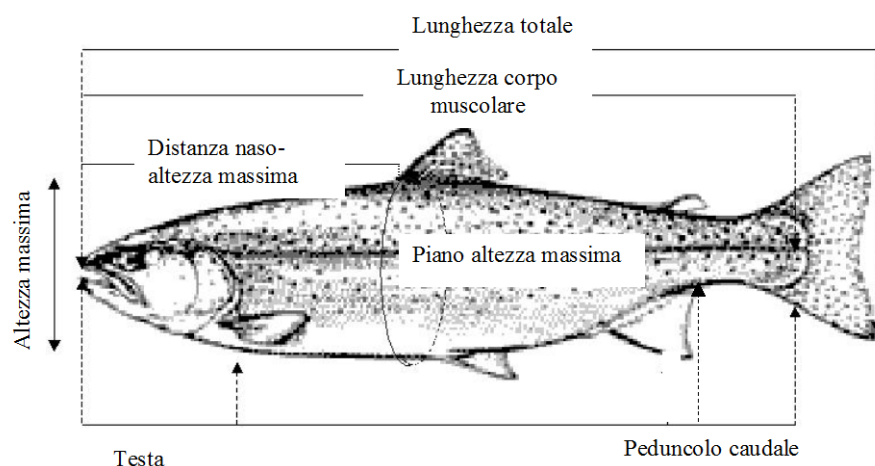


Figura 3.2 – Le principali misure lineari

Tabella 3.9 - Principali indici morfometrici e merceologici

INDICE MORFOMETRICO	FORMULA	UNITA' DI MISURA
FATTORE DI CONDIZIONE	$\text{Peso totale} \times 100 / \text{lunghezza totale}^3$	g/cm^3
INDICE CRANIALE	$\text{Lunghezza della testa} / \text{lunghezza totale}$	adimensionale
PROFILO RELATIVO	$\text{Altezza massima} / \text{lunghezza totale}$	adimensionale
PROFILO RELATIVO ANTERIORE	$\text{Distanza naso e piano massima altezza} / \text{lunghezza totale}$	adimensionale
INDICE DI AGILITA'	$\text{Distanza tra piano caudale e piano massima altezza} / \text{altezza massima}$	adimensionale
INDICE EPATOSOMATICO	$\text{Peso del fegato} \times 100 / \text{peso corporeo}$	percentuale
INDICE VISCERALE	$\text{Peso dei visceri} \times 100 / \text{peso corporeo eviscerato}$	percentuale
INDICE GRASSO VISCERALE	$\text{Grasso mesenterico} \times 100 / \text{peso dei visceri}$	percentuale
INDICE DI ADIPOSITA' GENERALE	$\text{Grasso mesenterico} \times 100 / \text{peso corporeo}$	percentuale
RESA IN PESO EVISCERATO	$\text{Peso corporeo eviscerato} \times 100 / \text{peso corporeo}$	percentuale
TOTALE SCARTI	$(\text{Testa, cuore e branchie} + \text{visceri totali} + \text{pinne} + \text{residuo sfilettato}) \times 100 / \text{peso corporeo}$	percentuale
RESA FILETTO SINISTRO SENZA PELLE	$\text{Peso del filetto sinistro senza pelle} \times 100 / \text{peso corporeo}$	percentuale
RESA FILETTI CON PELLE	$(\text{Peso filetto destrto con pelle} + \text{peso del filetto sinistro con pelle}) \times 100 / \text{peso corporeo}$	percentuale

La spigola, è una specie pregiata assai apprezzata dal consumatore italiano, al punto che le sue elevate produzioni nei paesi costieri del Mediterraneo sono destinate quasi

esclusivamente al mercato italiano. L'impresa italiana non può competere con i prezzi del mercato straniero in quanto non può fare a meno del controllo e del mantenimento della migliore qualità del prodotto finale. La fornitura di spigole da come prodotto/alimento di ottima qualità, sicuro per la salute umana, controllato lungo tutta la filiera produttiva e distributiva, dovrebbe essere dunque adeguatamente valorizzato tramite certificazione europea.

Gli standard da inserire negli schemi di certificazione devono essere misurabili e verificabili con precisione e continuità. Quindi è importante e necessario predisporre di studi ad hoc sui prodotti dell'acquacoltura per caratterizzare e discriminare il pregio del prodotto.

CAPITOLO 4

Materiale e Metodi

4.1 Produzione degli inoculi e condizioni di coltura

La biomassa utilizzata per la sperimentazione è stata prodotta in condizioni strettamente controllate presso i laboratori dell'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi del CNR di Firenze. Come mezzo di coltura è stata utilizzata acqua di mare artificiale (salinità 30 g L⁻¹) sterilizzata ed arricchita con i nutrienti del mezzo *f* (Guillard e Ryther, 1962) la cui composizione è riportata in tabella 4.1.

Tabella 4.1 - Composizione del mezzo *f* (Guillard and Ryther, 1962)

	Concentrazione
Sali sintetici dell'acqua di mare	30 g/L
Macroelementi	
NaNO ₃	150 mg/L
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	10 mg/L
FeCl ₃ * H ₂ O	6.3 mg/L
Na ₂ EDTA	8.72 mg/L
Na ₂ SiO ₃ * 9H ₂ O	30 - 60 mg/L solo per le Diatomee
Microelementi	
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.0196 mg/L
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.044 mg/L
CoCl * 6H ₂ O	0.020 mg/L
MnCl ₂ * 4H ₂ O	0.360 mg/L
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.0126 mg/L
Vitamine	
Tiamina – HCl	0.2 mg/L
Biotina	1 µg/L
B12	1 µg/L

La figura 4.1 mostra il processo di scaling-up necessario sia per ottenere una quantità di coltura microalgale sufficiente ad inoculare reattori GWP, sia per permetterne l'acclimatazione alle condizioni tipiche dell'ambiente all'aperto: luce naturale, ciclo luce-buio e variazioni di temperatura.

Circa 150 mL di coltura madre sono stati utilizzati per inoculare tubi di vetro del volume di 0,6 mL, insufflati con una miscela aria-CO₂, e mantenuti in condizioni strettamente controllate di laboratorio, con luce artificiale e in ambiente termostato. Sono stati necessari almeno due tubi alla concentrazione di 2 g L⁻¹ per allestire un tubo da 6-10 L ad una concentrazione di partenza di ca 0.2-0,3 g L⁻¹.

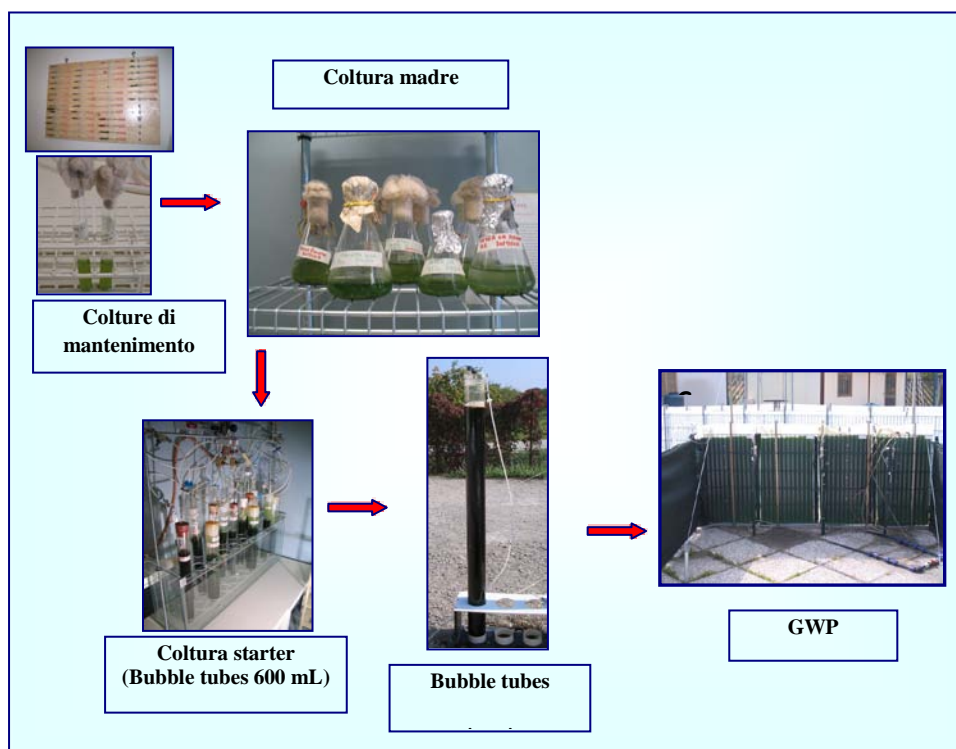


Figura 4.1 - Produzione degli inoculi attraverso un processo di scaling up.

Successivamente, raggiunta una concentrazione di circa 2 g L⁻¹, tutta la coltura presente in questo dispositivo è stata utilizzata per allestire un reattore GWP, nel quale è stato aggiunto mezzo di coltura fresco fino ad arrivare al volume finale (Figura 4.1).

Prima di essere inoculato il GWP è stato disinfettato con ipoclorito di sodio (NaClO) per almeno 12 ore, quindi il cloro residuo neutralizzato con tiosolfato di Na (Na₂S₂O₃ x 5H₂O) ed il reattore lavato due volte con H₂O deionizzata filtrata.

Anche per la sperimentazione all'aperto, le colture sono state fatte crescere su mezzo *f* preparato con acqua di mare artificiale (Zoomix Tropic Marine, Germany) avente salinità 30 g L⁻¹. La dissoluzione del sale sintetico in acqua deionizzata avveniva all'interno di un serbatoio mediante una pompa centrifuga. Per favorire la solubilizzazione del sale veniva aggiunto HCl puro, nella concentrazione di 0,5 mL L⁻¹,

in modo da portare il pH ad un valore di circa 7. Prima dell'uso l'acqua di mare veniva filtrata attraverso una batteria di filtri a cartuccia di porosità decrescente (50, 10 e 0,6 μm assoluti) quindi integrata con le soluzioni dei nutrienti, sterilizzate in autoclave.

Nelle colture veniva insufflata CO_2 sia per mantenere il pH nel range ottimale (7,5-8) che come fonte di carbonio per la fotosintesi. La CO_2 veniva insufflata solamente durante le ore diurne, grazie a un sistema di rilascio automatico che consentiva di chiudere le valvole per il passaggio del gas durante le ore notturne. Il flusso di CO_2 in ingresso ad ogni singolo fotobioreattore veniva inoltre regolato per mezzo di regolatori di flusso. La temperatura della coltura era controllata per mezzo di un sistema di termostatazione che impediva alle colture di raggiungere temperature superiori ai 27-28 $^\circ\text{C}$.

4.2 Gestione delle colture

La gestione delle colture microalgali è stata condotta o in semicontinuo o in "batch". Il regime di raccolta in semicontinuo, consiste in diluizioni giornaliere della coltura e il volume di coltura asportato con la diluizione viene ripristinato mediante aggiunta di acqua di mare arricchita con i nutrienti del mezzo *f*. Aliquote di NaNO_3 e NaH_2PO_4 venivano reintegrate giornalmente in funzione della crescita delle colture in modo da evitare carenze di azoto e fosforo e considerando un contenuto di questi due macronutrienti rispettivamente il 10% e l'1% della biomassa. Pertanto una crescita in biomassa di 1 g (p.s.) L^{-1} giorno $^{-1}$ richiede che siano disponibili almeno 100 mg L^{-1} giorno $^{-1}$ di N e 10 mg L^{-1} giorno $^{-1}$ di P. Nel Box I è riportato un esempio di calcolo delle quantità di macronutrienti da aggiungere nel caso di una crescita pari a 0,5 g (p.s.) L^{-1} giorno $^{-1}$.

La gestione in batch delle colture lascia raggiungere ad esse una densità cellulare massima. Anche in questo caso aliquote di NaNO_3 e NaH_2PO_4 venivano reintegrate giornalmente in funzione della crescita delle colture in modo da evitare carenze di azoto e fosforo con la stessa metodica descritta sopra. Ogni mattina erano prelevati campioni di coltura per la valutazione della crescita, l'osservazione microscopica e le analisi della composizione biochimica. I principali parametri culturali (pH e temperatura) erano monitorati ogni giorno.

Box I. Esempio di calcolo delle reintegrazioni di N e P

Il calcolo è riferito ad una coltura cresciuta in un reattore avente capacità 300 L. Allo start (**A**) la coltura dispone per la crescita di: $N=100 \text{ mg L}^{-1}$, $P=10 \text{ mg L}^{-1}$. Il giorno successivo (**B**) vengono fatte le reintegrazioni in funzione della crescita e della diluizione operata ed in modo da riportare la concentrazione dei nutrienti a $N=100 \text{ mg L}^{-1}$, $P=10 \text{ mg L}^{-1}$. Si considera che il mezzo reintegrato dopo diluizione non contenga N e P.

Per le reintegrazioni sono utilizzate le seguenti soluzioni stock:

$$\text{NaNO}_3 \text{ } 300 \text{ g L}^{-1} = 300 \text{ mg mL}^{-1} \text{ (N=50 mg mL}^{-1}\text{)}$$

$$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \text{ x H}_2\text{O } 75 \text{ g L}^{-1} = 75 \text{ mg mL}^{-1} \text{ (P}\cong\text{17 mg mL}^{-1}\text{)}$$

A	
Volume di coltura	300 L
N disponibile per la crescita	100 mg L^{-1}
P disponibile per la crescita	10 mg L^{-1}
B	
Volume di coltura	300 L
Produttività volumetrica ottenuta	$0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$
N residuo prima della diluizione	$50 \text{ mg L}^{-1} = (100 \text{ mg L}^{-1} \text{ disponibili in A} - 50 \text{ mg L}^{-1} \text{ consumati per la crescita e pari al } 10\% \text{ di } 0,5 \text{ g L}^{-1})$
P residuo prima della diluizione	$5 \text{ mg L}^{-1} = (10 \text{ mg L}^{-1} \text{ disponibili in A} - 5 \text{ mg L}^{-1} \text{ consumati per la crescita e pari al } 1\% \text{ di } 0,5 \text{ g L}^{-1})$
Diluizione 40%	- 120 L di coltura + 120 L acqua di mare/mezzo riciclato privo di N e P
N residuo dopo diluizione	$30 \text{ mg L}^{-1} = [(300 \text{ L} - 120 \text{ L}) \times 50 \text{ mg L}^{-1} / 300 \text{ L}]$
N necessario per ripristinare la concentrazione finale di 100 mg L^{-1}	$70 \text{ mg L}^{-1} = (100 \text{ mg L}^{-1} - 30 \text{ mg L}^{-1})$
N necessario per l'intero volume di coltura (300 L)	$21000 \text{ mg} = (70 \text{ mg L}^{-1} \times 300 \text{ L})$
Volume di s. stock di NaNO_3 da reintegrare nella coltura	$420 \text{ mL} = (21000 \text{ mg} / 50 \text{ mg mL}^{-1})$
P residuo dopo diluizione	$3 \text{ mg L}^{-1} = [(300 \text{ L} - 120 \text{ L}) \times 5 \text{ mg L}^{-1} / 300 \text{ L}]$
P necessario per ripristinare la concentrazione finale di 10 mg L^{-1}	$7 \text{ mg L}^{-1} = (10 \text{ mg L}^{-1} - 3 \text{ mg L}^{-1})$
P necessario per l'intero volume di coltura (300 L)	$2100 \text{ mg} = (7 \text{ mg L}^{-1} \times 300 \text{ L})$
Volume di s. stock di NaH_2PO_4 da reintegrare nella coltura	$123,5 \text{ mL} = (2100 \text{ mg} / 17 \text{ mg mL}^{-1})$

4.3 Misure e procedure analitiche sulla coltura e biomassa microalgale

Determinazione del peso secco

La determinazione del peso secco era effettuata su un campione rappresentativo della coltura algale da cui era prelevato un volume noto (5-10 mL) che veniva filtrato su membrana di fibra di vetro (Whatman GF/C) di $1,2 \mu\text{m}$ di porosità precedentemente essiccata in stufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ e lavato con 25 mL di acqua distillata. Il tutto era poi lavato nuovamente con altri 25 mL di acqua distillata per allontanare i sali residui. Le membrane con la biomassa erano quindi poste in stufa per 3 ore a $105 \text{ }^\circ\text{C}$, fino a peso costante, raffreddate in essiccatore e poi pesate. Dalla differenza tra il peso secco così ottenuto e la tara della membrana, si otteneva la biomassa secca presente nel volume colturale filtrato espressa in g L^{-1} . La produttività volumetrica era calcolata dalla differenza della concentrazione in biomassa tra due giorni consecutivi.

Determinazione della conta cellulare

La stima della concentrazione cellulare viene eseguita su campioni di coltura diluiti (1:20-1:50) a cui sono aggiunte poche gocce di formalina (10%) o di liquido di Lugol per immobilizzare le cellule. Per la conta del numero delle cellule viene utilizzata tipicamente una camera contaglobuli del tipo Bürker ed un microscopio ad ingrandimento 400x.

Per il montaggio della camera contaglobuli è necessario far aderire tenacemente un vetrino coprioggetti sopra i reticoli di conta come mostrato in figura 4.2. Per mezzo di una pipetta Pasteur, poche gocce del preparato

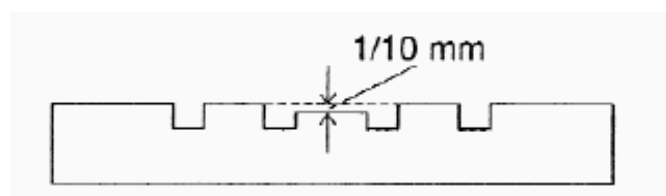


Figura 4.2 - Vista laterale di una camera Bürker

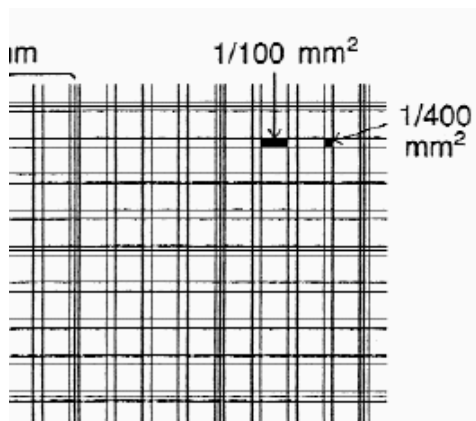


Figura 4.3 - Reticolo della camera Bürker.

vengono fatte diffondere nella camera di conta fino ad ottenerne un'omogenea distribuzione.

La camera Bürker presenta, nella parte centrale, due reticoli ciascuno costituito da nove quadrati delimitati da una linea tripla,

ciascuno con una superficie di 1 mm² e suddiviso in 16 quadrati piccoli di superficie 0,0025 mm² e volume 0,004 mm³ (Figura 4.3). In totale sono quindi presenti 144 quadratini ognuno con un volume di 0,004 mm³. Le cellule vengono contate nei 12 quadratini che formano la diagonale del reticolo e quelle che cadono su una linea del quadrato sono considerate per metà. Il numero delle cellule in un quadrato deve essere compreso tra 5 e 30, altrimenti ripetere la diluizione. Per ogni preparato, vengono eseguite due conte, una per ogni reticolo della camera Bürker. Per determinare il numero di cellule per millilitro viene calcolato il numero medio di cellule in un quadratino (dividendo per dodici il numero di cellule totali contate nella diagonale) ed applicata la seguente formula che tiene conto delle dimensioni del quadratino e della diluizione del campione:

$$n^{\circ}\text{cellule/mL} = \frac{\text{Media numero cellule in un quadrato} \times \text{fattore di diluizione} \times 1000}{0,004}$$

NB. Per la conta del numero delle cellule può essere utilizzata anche la camera conta globuli Thoma (16 quadrati grandi, ciascuno suddiviso in 16 quadrati piccoli di superficie 0,0025 mm² e volume 0,004 mm³).

Controllo delle condizioni colturali (aspetto macroscopico e microscopico)

Mediante osservazione microscopica si hanno informazioni sullo stato di salute della coltura. In particolare l'osservazione al microscopio deve essere fatta a piccolo ingrandimento per avere una visione di insieme e poter apprezzare l'eventuale presenza di aggregati cellulari e precipitati salini. Quindi per evidenziare alterazioni cellulari, presenza di lisi cellulare e di contaminazione da batteri, protozoi od altre specie algali è necessario utilizzare ingrandimenti maggiori (40x e 100x).

L'osservazione macroscopica delle colture ed in particolare il loro colore, la presenza di schiuma e di flocculi non deve essere sottovalutata in quanto permette di individuare l'insorgenza di problemi biologici o tecnici e può aiutare a capirne le cause.

Determinazione della carica batterica

La determinazione della carica batterica aerobica associata a colture di *T. suecica* è stata effettuata mediante la tecnica della conta vitale su piastra. Campioni di coltura (50 mL)

sono stati prelevati in contenitori sterili, messi in agitazione per 40 minuti e sottoposti a diluizioni seriali (fino a 10^{-8} - 10^{-12}). Aliquote di ciascuna diluizione (100 μ L) sono state seminate in capsule Petri contenenti Marine Agar 2216 (Difco). Le piastre sono state osservate dopo 24-48-72 e 96 ore di incubazione a 30 °C. Le colonie sviluppatesi sono state definitivamente contate dopo 96 h e classificate in base a colore, forma ed aspetto. La carica batterica è stata espressa come CFU mL^{-1} di coltura e come CFU mg^{-1} di biomassa secca. Le colonie numericamente più rappresentative sono state osservate al microscopio per una preliminare differenziazione, quindi isolate e caratterizzate per la reazione di Gram con KOH 3% secondo il metodo di Povers.

Misura della salinità

Per la misura della salinità è stato usato un rifrattometro. Un volume di coltura pari ad 1 ml è stato centrifugato ed una goccia di surnatante letta mediante lo strumento precedentemente tarato con acqua distillata.

Misura dell' irradianza

La radiazione fotosinteticamente attiva (PAR) ricevuta dalle superfici dei reattori (Nord e Sud) è stata misurata in tipiche giornate serene. L'andamento delle curve nei diversi mesi è stato confrontato e la radiazione totale intercettata (irradianza, espressa come moli di fotoni per m^2 di superficie illuminata per giorno) è stata ricavata dall'area delle singole curve.

L'irradianza (PAR) è stata misurata usando un sensore Li-Cor modello LI-190 SB (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) connesso ad un quantum/radiometer/photometer modello LI-185 B sia nelle prove all'aperto che quelle in laboratorio.

I valori della radiazione globale incidente sulla superficie orizzontale ($\text{MJ m}^{-2} \text{giorno}^{-1}$) e quelli della temperatura ambiente sono stati forniti dalla stazione agrometeorologica LaMMA (CNR-IBIMET, Firenze).

Durante la sperimentazione in laboratorio i dispositivi di crescita (bubble tubes) sono stati illuminati in continuo con luce fornita da un dispositivo (Figura 4.4A) contenente sei lampade fluorescenti (Osram FQ 39W/865-T5) aventi lo spettro di emissione mostrato in figura 4.4 B.

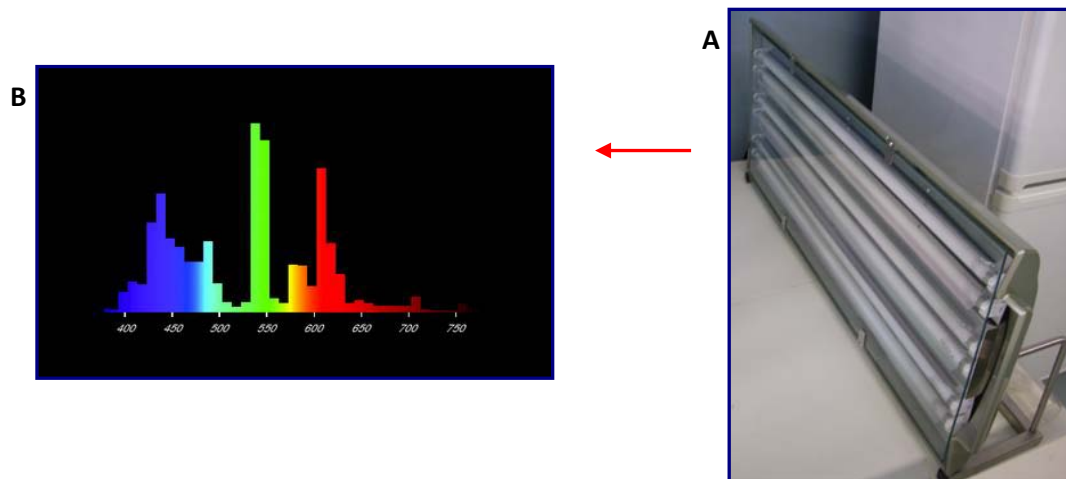


Figura 4.4 - Dispositivo di illuminazione utilizzato per le prove di laboratorio (A) e spettro di emissione delle lampade illuminanti (B).

Le misure della luce sono state effettuate in otto punti equidistanti 5 cm l'uno dall'altro lungo i tubi di vetro come mostrato in Figura 4.5.

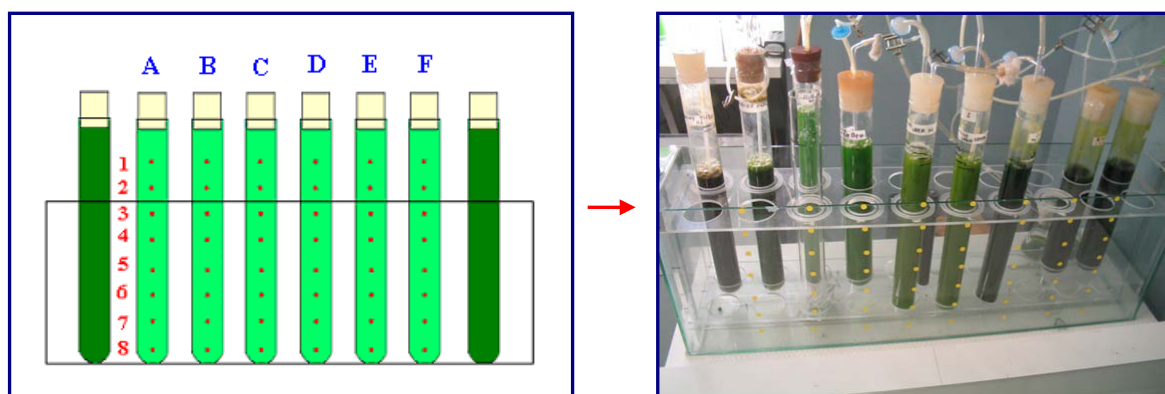


Figura 4.5 Rappresentazione schematica della procedura adottata per la misura della radiazione luminosa sui tubi di prova.

Determinazione della clorofilla

Il contenuto in clorofilla è stato stimato mediante il metodo descritto da Pearson e Strickland (1963). Una quantità nota di campione (5-10 mL) era centrifugato per 10 minuti a 3500 rpm per allontanare il surnatante: Venivano quindi aggiunte al pellet 1,5-2,0 g di microsferi di vetro (\varnothing 0,4 mm) e qualche goccia di acetone 90%. Il campione era agitato su vortex per 3 minuti al fine di rompere le cellule e completare l'estrazione dei pigmenti, prelevata la fase liquida ed aggiunto acetone 90% fino ad un volume finale di 25 mL. Dopo centrifugazione per 10 minuti a 3500 rpm e recupero del surnatante, la misura della concentrazione dei diversi tipi di clorofilla veniva fatta

tramite lettura allo spettrofotometro a quattro diverse lunghezze d'onda (750, 663, 645 e 630 nm) contro un bianco costituito da acetone 90%. La lettura a 750 nm rappresenta la misura della torbidità del mezzo il cui valore era sottratto da quelli delle altre letture. Il tipo e la quantità di clorofilla presente (espressa in mg L⁻¹) era determinata mediante le formule proposte dal metodo Scor-Unesco (1996).

$$Chla \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = [11,64 (DO_{663} - DO_{750}) - 2,16 (DO_{663} - DO_{750}) + 0,10 (DO_{630} - DO_{750})] \times V_1 / V_2$$

$$Chlb \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = [20,97 (DO_{663} - DO_{750}) - 3,94 (DO_{663} - DO_{750}) - 3,66 (DO_{630} - DO_{750})] \times V_1 / V_2$$

$$Chlc \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = [54,22 (DO_{663} - DO_{750}) - 14,81 (DO_{663} - DO_{750}) - 5,53 (DO_{630} - DO_{750})] \times V_1 / V_2$$

dove:

DO₆₆₃, DO₆₄₅, DO₆₃₀, DO₇₅₀ = valori densità ottica alle diverse lunghezze d'onda

V₁ = volume dell'estratto (L)

V₂ = volume del campione (L)

Analisi della composizione biochimica

Per la determinazione della composizione biochimica i campioni di biomassa sono stati raccolti mediante centrifugazione, congelati e liofilizzati prima delle analisi.

Carboidrati totali (metodo al fenolo, Dubois et al., 1956).

La determinazione dei carboidrati totali è stata eseguita su campioni sonicati in acqua distillata. Dopo sonicazione ed opportuna diluizione, il campione veniva stoccato e congelato fino al momento della determinazione analitica. La procedura per la determinazione dei carboidrati è la seguente:

Reattivi: fenolo 5% (p/v) in acqua distillata

H₂SO₄ concentrato

Procedura:

1. ad 1 mL di campione si aggiunge 1 mL di fenolo e 5 mL di H₂SO₄ concentrato;
2. si agita e si lascia a riposo per 10 minuti;
3. si trasferisce in bagno d'acqua a 20-25 °C per almeno 20 minuti;
4. si effettua la lettura allo spettrofotometro (Beckman DU 640) a 488 nm contro un bianco d'acqua e reagenti.

Poiché si tratta di un metodo in cui avviene una reazione colorimetrica fortemente esotermica, apposite provette in vetro pirex munite di tappo a smeriglio devono essere usate. Ogni campione è stato preparato e testato in triplo e parallelamente veniva eseguita una curva di taratura con concentrazioni note di glucosio.

Proteine (Lowry et al., 1951).

La preparazione del campione per il dosaggio delle proteine è analoga a quella usata per il dosaggio dei carboidrati. Il principio del metodo si basa sulla reazione della frazione proteica con il Cu in ambiente alcalino e successiva riduzione del reattivo fosfomolibdico-fosfotungstico da parte della proteina trattata con il rame.

Reattivi:

soluzione A: 5% Na₂CO₃ in acqua

soluzione B: 0,5% CuSO₄ 5H₂O in 1% tartrato di K-Na

soluzione C: miscelare le soluzioni A e B nella proporzione 25:1

soluzione D: reattivo Folin-Ciocalteu diluito in acido fino a 1N (indicatore fenoftaleina).

Procedura:

1. a 0,5 mL di campione aggiungere 0,5 mL di NaOH 1N;
2. porre in bagno maria bollente per 5 minuti senza tappo;
3. raffreddare in acqua;
4. aggiungere 2,5 mL di soluzione C e far riposare per 10 minuti;
5. aggiungere rapidamente 0,5 mL di soluzione D;
6. dopo 30 minuti lettura allo spettrofotometro (Beckman DU 640) a 750 nm contro un bianco di acqua distillata + reattivi.

Per il calcolo della concentrazione delle proteine (mg L^{-1}) viene utilizzata una curva di taratura ottenuta con albumina bovina con grado di purezza del 96%.

Lipidi

Per la determinazione del contenuto lipidico della biomassa, i campioni sono stati precedentemente estratti in cloroformio-metanolo secondo il procedimento di Bligh e Dyer (1959), come descritto da Holland e Gabbott (1971). Successivamente i campioni, trattati secondo la metodica basata sulla carbonizzazione in acido solforico (Marsh e Weinstein, 1966), sono stati sottoposti a lettura allo spettrofotometro (Beckman DU 640) a 375 nm. Come standard di riferimento è stata utilizzata la tripalmitina (Sigma, T-58888) con la quale è stata costruita una curva (retta) di calibrazione la cui equazione è stata usata per il calcolo della concentrazione dei lipidi.

4.4 Misure lineari, ponderali e analitiche sui pesci

In occasione di ogni singolo campionamento, su ciascun soggetto, entro 24-48 ore dalla cattura, sono state effettuate misurazioni, lineari, ponderali ed analisi chimiche.

Misure lineari

Le misurazioni lineari dei singoli soggetti sono state effettuate tramite l'utilizzo di un misuratore ortometrico tridimensionale (Geri et al., 1994). Le misure rilevate sono state (Figura 4.6):

1. lunghezza totale;
2. lunghezza del corpo muscolare;
3. lunghezza della testa;
4. altezza massima;
5. altezza minima;

Misure ponderali

I pesci sono stati poi sezionati e tutte le principali componenti corporee pesate separatamente, in modo da calcolarne le relative incidenze percentuali sul peso corporeo

totale. Le parti corporee che sono state separate e pesate per ogni singolo pesce sono state :

1) testa, branchie e cuore; **2)** filetto (con pelle) destro e sinistro; **4)** grasso mesenterico; **5)** residuo sfilettato (colonna vertebrale, compresi i residui di carne rimasti aderenti alle vertebre); **6)** pacchetto viscerale (stomaco, intestino); **7)** fegato.

Il filetto sinistro successivamente è stato spellato e la pelle e la effettiva porzione muscolare del filetto sono state pesate separatamente.

Successivamente si è proceduto all'operazione di omogeneizzazione della porzione muscolare del filetto, effettuata mediante Moulinex (Moulinette D 56). Dal muscolo omogeneizzato sono stati prelevati 2 g, da destinare alla successiva analisi dei lipidi, e 50 g da utilizzare per le altre analisi chimiche, previa liofilizzazione. Entrambe le pesate sono state effettuate tramite bilancia di precisione ed al netto dei rispettivi contenitori.

Indici morfometrici

La rilevazione di questi indici ha lo scopo principale di valutare l'accrescimento, la conformazione e lo sviluppo corporeo dei pesci, attraverso la misura di distanze, spessori e circonferenze e dei pesi delle varie porzioni corporee. Tali misurazioni, opportunamente combinate fra loro, permettono di calcolare particolari indici che, mettendo in relazione tra loro le suddette misure, consentono di descrivere la morfologia dell'animale e di quantificarne la produzione di carne (Geri et al., 1995) o l'entità delle parti non edibili. L'"aspetto" del pesce riveste un'importanza tutt'altro che trascurabile, come del resto accade per le altre specie di interesse zootecnico. Infatti la forma esteriore del pesce è spesso la prima caratteristica percepita dal consumatore e, proprio per questo, è capace di influenzarne le scelte d'acquisto (Annovazzi e Trincanato, 2002). Un pesce che presenti adeguate caratteristiche esteriori, quali armoniosità delle forme, livrea brillante ed integra verrà associato dall'acquirente ad un'idea di salubrità alimentare, rivelandosi dunque come un fattore potenzialmente importante nel condizionare le scelte d'acquisto del consumatore.

Gli indici morfometrici calcolati sono elencati di seguito:

Indice epato-somatico: esprime il rapporto percentuale tra il peso del fegato ed il peso totale dell'animale:

$$IE = P_{fegato} * 100 / P_{Tot}$$

Il fegato, dal punto di vista commerciale, è considerato una parte di scarto. L'incidenza del peso di tale componente sul peso corporeo totale, rappresenta un importante indicatore della quantità e della qualità dell'alimento somministrato all'animale durante il periodo di allevamento. Questo indice rappresenta inoltre un importante strumento per valutare lo stato di salute del pesce, infatti un fegato di notevole sviluppo e di consistenza molle spesso è indice di condizioni patologiche, come nel caso della steatosi. Tale malattia generalmente è causata dalla somministrazione di elevati quantitativi di alimento durante la fase di finissaggio (ultima fase di allevamento), allo scopo di accelerare il raggiungimento della taglia commerciale.

Indice viscerale: è il rapporto percentuale tra il peso del pacchetto viscerale e quello del corpo eviscerato:

$$IV = P \text{ visceri} * 100 / P \text{ eviscerato}$$

Indici elevati indicano una notevole incidenza del peso dei visceri (parti corporee di scarto) sul peso dell'animale eviscerato.

Indice del grasso viscerale: esprime la relazione percentuale tra il peso del grasso mesenterico e quello del pacchetto viscerale:

$$IGV = P \text{ grasso} * 100 / P \text{ pacchetto viscerale}$$

Indice di adiposità generale: definisce il rapporto percentuale tra il peso del grasso mesenterico ed il peso totale dell'animale:

$$IAG = P \text{ grasso} * 100 / \text{Peso Tot}$$

Elevati valori di questo indice si associano alla presenza di notevoli quantità di grasso mesenterico, quale conseguenza della somministrazione all'animale di eccessivi quantitativi di alimento. Questo può portare anche a stati patologici, come la steatosi epatica. Inoltre, dal punto di vista commerciale, la parte adiposa per il consumatore rappresenta una componente di scarto.

Resa in peso eviscerato: consiste nel rapporto percentuale tra il peso del corpo eviscerato ed il peso totale del pesce:

$$RM = P \text{ eviscerato} * 100 / \text{Peso Tot}$$

Una elevata resa al macello si associa ad una bassa incidenza, sul peso totale del pesce, delle componenti di scarto.

Totale scarti: definisce il rapporto percentuale fra il peso totale delle parti di scarto (testa, cuore e branchie + visceri totali + pinne + residuo sfilettato) sul peso corporeo totale:

$$Tot.scarti = P(\text{testa, cuore e branchie} + \text{visceri Tot} + \text{pinne} + \text{residuo sfilettato}) * 100 / P_{Tot}$$

Resa in filetto sinistro senza pelle: esprime la relazione percentuale tra il peso del filetto sinistro spellato ed il peso totale del corpo:

$$Resa \text{ filetto sx senza pelle} = P \text{ filetto sx senza pelle} * 100 / P_{Tot}$$

Resa in filetti con pelle: consiste nel rapporto percentuale tra la somma dei pesi dei filetti destro e sinistro (con pelle) ed il peso corporeo totale:

$$Resa \text{ filetti con pelle} = P \text{ filetto sx con pelle} + P \text{ filetto dx con pelle} * 100 / P_{Tot}$$

Analisi chimiche sul filetto

Sul filetto sinistro spellato sono state effettuate le seguenti analisi chimiche:

Umidità totale (A.O.A.C. 1995)

Viene determinata sottoponendo a liofilizzazione un campione di filetto di peso definito. Il calcolo dell'umidità del campione deriva dall'applicazione della formula:

$$Umidità \text{ Tot} = [(P \text{ netto iniziale} - P \text{ netto liofilizzato}) / P \text{ netto iniziale}] * 100$$

Umidità riacquistata dal campione dopo liofilizzazione (A.O.A.C. 1995)

Capsule di porcellana resistenti alle alte temperature, identificate con il numero del campione che ci verrà introdotto (scritto con vernice resistente alle alte temperature), vengono tarate mettendole in stufa a 105 °C per 30' e lasciandole poi raffreddare in essiccatore a cristalli di silice, in modo da togliere ogni traccia di umidità.

Dopo aver pesato la capsula se ne registra il peso, poi si pesano 4 g di campione liofilizzato, con precisione alla 4° cifra decimale, utilizzando una bilancia di precisione. I campioni pesati, introdotti nei relativi recipienti in porcellana, vengono poi posti in stufa a 105 °C per 3 ore.

I campioni vengono poi messi a raffreddare in essiccatore e successivamente ripesati, in modo da misurare la perdita di umidità, secondo la formula:

$$Umidità (\%) = [(P \text{ lordo iniziale} - P \text{ lordo secco}) / \text{grammi analizzati}] * 100$$

Ceneri (A.O.A.C. 1995)

I campioni utilizzati per il calcolo dell'umidità vengono utilizzati anche per la determinazione delle ceneri. All'inizio si effettua la pesatura delle capsule di porcellana precedentemente tarate contenenti il campione residuo all'essiccazione e successivamente si procede con il pre-incenerimento, che viene effettuato posizionando i campioni sopra una piastra riscaldante, sotto cappa a flusso laminare. Poi si spostano i campioni all'interno della muffola, dove rimarranno per 6 ore.

Si procede quindi alla fase di raffreddamento dei campioni, che deve avvenire all'interno di un essiccatore portatile a cristalli di silice, che serve anche per il trasferimento delle capsule dalla muffola alla bilancia di precisione (per evitare che i campioni si umidifichino a contatto con l'aria). I campioni vengono quindi nuovamente pesati.

La formula per il calcolo delle ceneri grezze è la seguente:

$$\text{Ceneri (\%)} = \left[\frac{\text{peso della capsula e delle ceneri} - \text{peso capsula vuota}}{\text{grammi campione analizzati}} \right] * 100$$

Estrazione dei lipidi totali (Folch et al., 1957, modificato)

Questo procedimento viene utilizzato per l'estrazione dei lipidi totali da campioni di tessuto animale (muscolo, fegato).

Il campione fresco, dopo essere stato macinato ed omogeneizzato utilizzando un Moulinex, viene pesato con una bilancia di precisione. La quantità di campione iniziale viene preventivamente stabilita in relazione al tipo di carne considerata, dal momento che deve contenere una percentuale di grasso sufficiente per le successive analisi che verranno effettuate sull'estratto lipidico, nel nostro caso lipidi totali e acidi grassi.

-Estrazione dei lipidi totali sul filetto di pesce. Per quanto riguarda l'analisi sul filetto di pesce, la quantità di campione fresco utilizzata è pari a 2 g, che vengono pesati con precisione su una striscia di carta stagnola precedentemente tarata. Dopo la pesatura il campione viene racchiuso nella stessa carta stagnola sulla quale è stato pesato e, nel caso in cui l'estrazione non venga effettuata immediatamente, viene trasferito in congelatore alla temperatura di -80 °C.

Al momento dell'analisi i 2 g di campione vengono trasferiti "quantitativamente" nel cilindro d'acciaio dell'Omni-mixer (*OMNI International*) ed addizionati con 34 ml (17 volte il volume del campione) di soluzione Cloroformio:Metanolo (2:1 v/v, contenente lo 0,01% di BHT, cioè il 2,6-di-ter-butil-p-cresolo, come antiossidante). Il campione,

aggiunto della soluzione, viene poi omogeneizzato per 5 minuti in un bagno di acqua e ghiaccio (in modo da evitare l'eccessivo surriscaldamento dello stesso, con conseguente ossidazione dei lipidi)

L'estratto lipidico ottenuto viene opportunamente filtrato su carta filtro di tipo "rapida" e raccolto all'interno di una provetta, tramite un imbuto. Per assicurare il recupero totale dell'estratto lipidico devono essere eseguiti 2 lavaggi del cilindro d'acciaio, delle lame, del coperchio dell'Omni-mixer e del filtro di carta, ognuno con 2 ml di soluzione Cloroformio:Metanolo. Infine si effettua un ultimo lavaggio dei bordi interni dell'imbuto (sempre con 2 ml di soluzione), facendo sgocciolare bene la soluzione all'interno del contenitore, lungo le pareti.

L'estratto grezzo ottenuto viene quindi lavato con una soluzione, aggiungendo 10 ml di KCl 0,88%, poi si agita vigorosamente per 30 secondi fino a che non si forma l'emulsione. Successivamente si procede al lavaggio delle pareti dell'imbuto separatore con 1,5 ml di soluzione Cloroformio:Metanolo.

L'estratto viene lasciato riposare per almeno 2 ore o preferibilmente per tutta la notte, cioè fino a quando non si verifica la separazione dell'emulsione in 2 fasi, una superiore o idrofila ed una inferiore o lipofila. Il rapporto Cloroformio:Metanolo:acqua (aggiunta mediante la soluzione salina ed apportata dal campione) deve sempre rispettare la proporzione 8:4:3, in modo da avere la completa separazione delle due fasi, quella lipofila a livello inferiore e quella idrofila a livello superiore.

Il recupero della fase inferiore avviene per aspirazione tramite una pipetta capillare, direttamente immersa nella frazione da prelevare; viene quindi eliminato il solvente, tramite evaporatore rotativo (temperatura di 30 °C e pressione maggiore di quella atmosferica) ed infine si aggiungono all'estratto lipidico ottenuto, 5 ml di Cloroformio. L'estratto lipidico purificato viene travasato in bottigliette di vetro ambrato a chiusura ermetica. Prima di chiudere ermeticamente le bottigliette è necessario insufflare azoto all'interno, in modo da creare uno strato isolante che non faccia ossidare i lipidi. Le bottigliette chiuse vengono poste in freezer a -20 °C, in attesa delle analisi.

-Determinazione quantitativa dei grassi presenti. Per questa analisi 2 ml della soluzione precedentemente diluita con 5 ml di Cloroformio vengono prelevati, sotto cappa, e vengono posti dentro vasetti di carta stagnola già tarati. Successivamente una piastra in ceramica da essiccatore viene messa in stufa a 105 °C. Una volta raggiunta la temperatura desiderata la piastra viene portata sotto cappa, quindi vi si appoggiano

sopra i vasetti di carta stagnola riempiti e si attende che la soluzione all'interno evapori completamente (circa 15 minuti).

I campioni vengono poi trasferiti all'interno di una stufa dotata di pompa a vuoto, dove rimangono per 30 minuti; quindi vengono raffreddati all'interno di un essiccatore portatile. Quando sono freddi si procede alla pesatura, si calcola il peso netto e si applica la seguente formula:

*Grassi presenti nei 2 g di campione = [(P netto/quantità prelevata (2ml)) * 5 ml disciolti]*

Per ottenere la quantità di lipidi contenuta in 1 g di campione, il risultato ottenuto viene diviso per 2.

Acidi grassi (Morrison e Smith, 1964)

La determinazione quali-quantitativa degli acidi grassi è stata eseguita seguendo il metodo di Morrison e Smith (1964), che prevede due fasi distinte: la prima fase riguarda la saponificazione degli acidi grassi con idrossido di potassio ed il recupero degli stessi mediante estrazione con un solvente; la seconda fase consiste nell'esterificazione degli acidi grassi saponificati con BF₃-Metanolo, in modo da iniettarli nella colonna gascromatografica sotto forma di esteri metilici.

-Saponificazione. Viene prelevata e trasferita in una provetta con tappo a vite una quantità di estratto lipidico corrispondente ad un contenuto di circa 3 mg di lipidi. All'estratto, portato a secco mediante evaporatore rotativo, viene aggiunto come standard interno il C23:0 (0,5 ml di soluzione madre contenente 0,1 mg/ml disciolti in benzene) e viene addizionata anche una quantità di 5 ml di KOH 0,5 M in metanolo. Successivamente si procede all'insufflazione con azoto ed alla saponificazione vera e propria, ottenuta mettendo i campioni a bagno maria a 80 °C per 40 minuti, agitandoli ogni 10 minuti.

Successivamente si rimuove il campione dal bagno maria e lo si pone a raffreddare. A raffreddamento avvenuto si aggiunge 1 ml di acqua distillata e si effettua il controllo del pH che, in caso di completa saponificazione, deve risultare superiore a 10. Poi, per spostare l'estratto saponificato ad acidi grassi liberi, viene addizionata una quantità pari a 2,5 ml di HCl 2M, agitando. A questo punto si procede all'estrazione degli acidi grassi mediante l'utilizzo di 2,5 ml di etere di petrolio 40-60, ripetendo un paio di volte tale

operazione. Si procede quindi all'eliminazione del solvente, tramite evaporatore rotativo.

-Esterificazione. Gli acidi grassi precedentemente liberati dell'etere di petrolio, vengono disciolti in 1 ml di benzene, quindi si aggiungono 2 ml di BF₃-Metanolo al 14%. Dopo aver praticato un'insufflazione con azoto si pone il tutto in bagno maria ad 80 °C per 3 minuti.

Ai campioni tolti dal bagno maria e raffreddati vengono aggiunti 2,5 ml di acqua distillata. Si passa poi all'estrazione degli esteri metilici, utilizzando 2,5 ml di etere di petrolio 40-60, ripetendo due volte tale operazione. Successivamente si effettua l'eliminazione del solvente ed i metil-esteri vengono sciolti in 1 ml di esano e trasferiti all'interno di fialette di vetro ambrato, provviste di tappo ermetico.

L'analisi gascromatografica viene effettuata entro 24 ore dall'esterificazione.

Le condizioni operative del gascromatografo *DANI 86.10* sono state le seguenti:

- Colonna capillare Stabilwax (Restek), 30 m di lunghezza, diametro interno di 0,32 mm, spessore della fase legata 0,25 mm
- Temperatura programmata: 160 °C per 1 minuto, rampa di 2 °C/minuto fino a 220 °C, isoterma a 220 °C per 9 minuti. Tempo totale: 40 minuti
- Iniezione totale (1 ml di campione), con apertura dello split dopo 40 secondi
- Carrier: Elio (1.1 bar).

Proteina grezza (A.O.A.C., 1995)

L'analisi è stata effettuata applicando il metodo Kjeldahl, che permette di determinare le quantità di azoto proteico, amminico, ammoniacale ed ureico presenti nel campione.

Attraverso una fase di mineralizzazione per via umida, la soluzione acida viene alcalinizzata con l'utilizzo di una soluzione di idrossido di sodio. In questo modo, l'ammoniaca liberata può essere isolata per distillazione e raccolta in acido borico, mentre l'eccesso viene titolato con acido solforico.

La fase di mineralizzazione avviene sotto cappa, in grandi provettoni di vetro pyrex, nei quali si pongono 0,5 g del campione liofilizzato, 15 ml di acido solforico concentrato al 99% e 4-5 g di catalizzatore al selenio (o pastiglie preconfezionate).

I provettoni contenenti il miscuglio posizionati negli appositi alloggiamenti del termoreattore posto sottocappa, vengono chiusi con gli appositi cappucci, quindi si inseriscono le piastre di protezione. Una volta acceso il termoreattore il miscuglio

subisce un riscaldamento di circa 2 ore, fino alla completa mineralizzazione delle sostanze presenti, e quando esso è completamente limpido i provettoni vengono posti a raffreddare per circa 1 ora su un'apposita rastrelliera.

Successivamente viene effettuato un lavaggio con acqua distillata, sia delle pareti dei provettoni che dei cappucci, quindi si passa alla fase di determinazione utilizzando l'apparecchio Kjeldahl.

Per prima cosa viene effettuata una pulizia preliminare dell'apparecchio, dotato al suo interno di due alloggiamenti, inserendo un provettone contenente 30 ml di acqua distillata nell'alloggiamento di sinistra, mentre in quello di destra viene posizionata una beuta adibita al recupero delle acque di lavaggio. Al termine di questa fase preliminare si inseriscono i provettoni contenenti i campioni che, all'interno del macchinario, subiscono un'alcalinizzazione mediante una soluzione di idrossido di sodio al 40%. Nell'altro alloggiamento (quello di destra) viene posta una beuta contenente 60 ml di acido borico al 4%, a cui vengono aggiunte 4-5 gocce di indicatore misto di pH, rosso di metile e blu di metilene, che essendo in ambiente acido fa virare il colore della soluzione a violetto.

4.5 Analisi statistica

Nella sperimentazione svolta con i sei ceppi di *Tetraselmis* all'aperto e a temperature superiori a quella ottimale, la linearità delle rette di regressione, ottenute dall'interpolazione delle curve di crescita, e la significatività della differenza fra le pendenze delle rette sono state valutate mediante l'analisi dei residui (runs test) ed il test del parallelismo, rispettivamente.

Le produttività ottenute nelle prove con *T. suecica*, utilizzando differenti AMA (acqua di mare artificiale) e differenti salinità, sono state analizzate con l'analisi della varianza (ANOVA ad una via) e precisamente con il test Dunnett ($P < 0,05$) che ha permesso di confrontare le tre tipologie di coltura con la coltura di controllo.

Per confrontare le produttività volumetriche ed areali nella coltura massiva di *Isochrysis* (T-ISO) è stato utilizzato il t-test unpaired ($P < 0,05$), il quale ha confrontato le medie dei gruppi, assumendo che i valori seguano una distribuzione gaussiana (GraphPad software, San Diego, USA).

Tutti i dati sperimentali delle prove di alimentazione svolte con la spigola, erano soggetti all'analisi statistica (analisi della varianza, ANOVA); e i valori medi sono stati confrontati utilizzando il test Duncan per $P < 0,05$ utilizzando il software statistico SPSS-PC 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

CAPITOLO 5

Il Green Wall Panel utilizzato nella sperimentazione

5.1 Descrizione del Fotobioreattore GWP

Il Fotobioreattore tipologia GWP utilizzato nella sperimentazioni, nel quale avviene il processo fotosintetico ad opera delle microalghe, è costituito da quattro pannelli alti 1 metro, disposti in file parallele distanziate di 1- 1,5 metro. La distanza di 1-1,5 m tra le file consente, alle latitudini dove si sono svolte le sperimentazioni (Istituto per lo studio degli Ecosistemi – CNR Sesto Fiorentino (Firenze), Archimede Ricerche S.r.l. Campososso (Imperia)), di evitare ombreggiamenti reciproci dei pannelli durante i mesi più produttivi (Aprile-Settembre).

A ciascun pannello viene data una pendenza di 0.5% così da facilitare le operazioni di scarico/raccolta giornaliera della coltura e il recupero dell'acqua di termostatazione.

Ciascun pannello è composto da:

- camera di coltura in polietilene a bassa densità (spessore materiale = 355 μm) di lunghezza 5 o 10 m;
- grigliati metallici rivestiti in poliestere verde, maglia rettangolare 200 x 50 mm, lunghezza 2500 mm, altezza 1030 mm;
- paletti di supporto alle griglie in acciaio zincato;
- canaletta in lamiera zincata spessore 10/10, con funzione di raccolta di fuoriuscite accidentali della coltura e dell'acqua di termostatazione;
- dispositivo di distribuzione aria/ CO_2 , formato da tubazione in PVC-U Pn 16, diametro esterno 16 mm, forata ogni 3 cm con fori aventi 1 mm di diametro;
- dispositivo di termostatazione mediante ugelli nebulizzatori ($Q=45$ l/h a 1,5 bar).

5.2 Impianti accessori

5.2.1 Sistema di alimentazione del mezzo di coltura

Il sistema di alimentazione del mezzo di coltura, costituito da acqua prefiltrata arricchita degli elementi nutritivi necessari alla crescita delle microalghe (azoto, fosforo e micronutrienti), comprende:

- Serbatoio cilindrico verticale in polietilene lineare, 100% riciclabile, avente capacità 1500 L;
- Elettropompa centrifuga monogirante in ghisa, 0.55 kW, tensione monofase 230 V +/-10%, 50Hz. (Q= 3-16.5 mc/h, H= 17.3 -6.3 m);
- Tubazione in PVC-U (diametri impiegati De 40 mm e De 25 mm) per l'adduzione di acqua e fluidi in pressione, conforme a UNI EN 1452 con giunzione a incollo;
- Raccorderia e valvolame in PVC-U;
- Filtri in linea a porosità decrescente (50 µm, 10 µm e 1 µm) per la filtrazione del mezzo di coltura.

Il sistema di alimentazione del mezzo di coltura permette di poter caricare in maniera indipendente ogni pannello.

5.2.2 Sistema di scarico della sospensione algale

Il sistema di scarico permette di effettuare la raccolta della sospensione algale ed è composto da:

- Serbatoio a base conica in polietilene lineare, capacità 1000 L, dotato di piedistallo;
- Tubazione in PVC-U (diametri impiegati De 40 mm e De 25 mm) per l'adduzione al serbatoio della sospensione colturale, conforme a UNI EN 1452 con giunzione a incollo;
- Raccorderia e valvolame in PVC-U;
- Elettropompa centrifuga monogirante in ghisa, 0.55 kW, tensione monofase 230 V +/-10%, 50Hz. (Q= 3-16.5 mc/h, H= 17.3 -6.3 m).

5.2.3 Sistema di agitazione della coltura

Il sistema di agitazione permette il rimescolamento continuo della coltura algale, impedendo fenomeni di sedimentazione e determinando un regime luminoso ottimale per le cellule. Esso è costituito da:

- Soffiante bistadio monofase a canale laterale da 1.5 kW, 230 V-50Hz, dotata di valvola di sovrappressione, valvola di ritegno, filtro e silenziatore in aspirazione [rumorosità a 1 m a 300 mbar di prevalenza = 73 dB(A)];

- Tubo per adduzione aria in PVC-C conforme EN ISO 15493 per utilizzo nei sistemi di tubazioni plastici di tipo industriale (diametri impiegati De 32 e De 25 mm);
- Raccorderia e valvolame in PVC-C;
- Flussimetro per aria mod. C4CR in PMMA, senza valvola di regolazione;
- Flussimetro per aria mod. A5A in PMMA, senza valvola di regolazione;
- Valvola motorizzata a tre vie completa di servomotore rotativo per scambio flusso aria/CO₂.

Per la sperimentazione effettuata con *Isochrysis* (T-ISO), il mixing della coltura nei fotobioreattori produttivi era svolto con un sistema air-lift. Tale sistema era costituito da due tubature in plastica a forma di “U” di cui un’estremità di queste era ad uncino. Nella sperimentazione suddetta, questa struttura univa i due GWP-500 (Figura 5.1) e le tubature erano poste alle due estremità dei fotobioreattori. Il rimescolamento della coltura era permesso grazie ad un flusso di aria continuo generato da una soffiante.



Figura 5.1 – Sistema air lift, il quale unisce i due GWP-500 nel quale è coltivata la microalga *Isochrysis* (T-ISO).

5.2.4 Sistema di erogazione della CO₂

Il sistema di erogazione della CO₂ permette di fornire alle colture algali la CO₂ necessaria sia come fonte di carbonio che per la regolazione del pH. L’impianto pilota prevede l’utilizzo di CO₂ pura in forma gassosa contenuta in bombole commerciali per usi di laboratorio aventi capacità indicativa di 40 litri. Le bombole sono allocate all’interno di un armadio per gas compressi. La CO₂ viene fornita alle colture sottoforma di microbolle mediante appositi diffusori posti nei pannelli o

attraverso la tubazione di erogazione dell'aria, in funzione del pH istantaneamente rilevato nel mezzo di coltura.

Il sistema di erogazione è costituito da:

- Armadio gas compressi biposto;
- Riduttore di pressione per CO₂;
- Elettrovalvole a basso voltaggio, normalmente chiuse, comandate dal sistema di controllo;
- Flussimetri/riduttori di flusso;
- Tubazione in PVC, raccorderia e tubo gas rigido RILSAN, diffusori.

5.2.5 Sistema di termoregolazione della coltura

La termostatazione della coltura avviene nebulizzando acqua di rete sulla superficie esterna dei pannelli per impedirne il surriscaldamento. Il sistema di termostatazione consente il riciclo dell'acqua ed è composto da:

- Elettropompa centrifuga ad asse orizzontale 0.75 kW, monofase 230 V-50 Hz, (Q max 5 mc /h, H max 48 m);
- Tubazione in PVC-U conforme a UNI EN 1452 con giunzione a incollo (diametri impiegati De 32 mm e De 25 mm) per l'adduzione di acqua e fluidi in pressione dal serbatoio di accumulo ai nebulizzatori e dalla canaletta di contenimento al serbatoio di accumulo;
- Raccorderia e valvolame in PVC-U a filettare.

Nella sperimentazione con *Isochrysis* (T-ISO) il raffreddamento della coltura avveniva per “scambio di calore” attraverso serpentine in acciaio inossidabile di spessore 1,5 mm alloggiato all'interno della coltura e disposte in parallelo, entro le quali passava acqua fredda. Una valvola a tre vie permetteva il passaggio di acqua fredda, controllandone la portata. Il raffreddamento era effettuato con acqua di falda, la cui temperatura era compresa tra 12 e 17°C.

CAPITOLO 6

Tetraselmis

6.1 Introduzione generale sulla microalga *Tetraselmis*

Classificazione, morfologia e composizione biochimica

Tetraselmis è una microalga appartenente alla classe delle *Prasinophyceae*, inserita nella divisione *Chlorophyta*. Tutte le alghe appartenenti alla classe delle *Prasinophyceae* sono unicellulari, caratterizzate dalla presenza di 2-4 flagelli (eccezionalmente 6-8). Un ulteriore carattere distintivo è la presenza di scaglie organiche sui flagelli e sul corpo cellulare.

Le clorofille tipiche delle *Prasinophyceae* sono la clorofilla *a* e la clorofilla *b*, gli altri pigmenti accessori presenti sono i carotenoidi e le xantofille. La maggioranza delle specie appartenenti al genere *Tetraselmis* presenta cellule di forma allungata, lunghe 10-20 µm e con un peso di 100-200 pg/cellula. Nella parte apicale della cellula, in una zona in cui la parete cellulare forma una invaginazione, sono inseriti i quattro flagelli. La parete cellulare è formata di minute scaglie costituite da sostanze simil-pectiche, prodotte dall'apparato del Golgi. Il ciclo vitale delle cellule prevede 4 fasi: una fase in cui vengono rilasciate le cellule figlie dalla cellula madre; una fase dove la cellula è matura ed è mobile, quadri-flagellata e dotata di parete; una fase dove i flagelli sono persi e si ha la formazione della ciste; e una fase dove avviene la divisione cellulare longitudinalmente, dando origine a cellule figlie delle stesse dimensioni, interamente dotate di parete propria. Durante la divisione, una delle due cellule figlie si inverte così che il polo anteriore di una viene a trovarsi adiacente al polo posteriore dell'altra. La ciste può ulteriormente germinare dando origine a quattro cellule (tetradi) (Figura 6.1). È infatti, capace di tollerare un'ampia gamma di temperature (da 2 a 34 °C), nonché un ampio range di salinità e pH: ad esempio *T. gracilis* clone C1 isolata da ambienti estuarini è normalmente esposta a variazioni della salinità dell'acqua da 8,6 a 34‰ e a pH che vanno da 6,8 a 8,3 (Lourenço et al, 1997). Inoltre le sue necessità nutrizionali

sono minime e può utilizzare indistintamente ammonio, urea, nitrati o aminoacidi quali fonti di azoto (Molina et al., 1991).

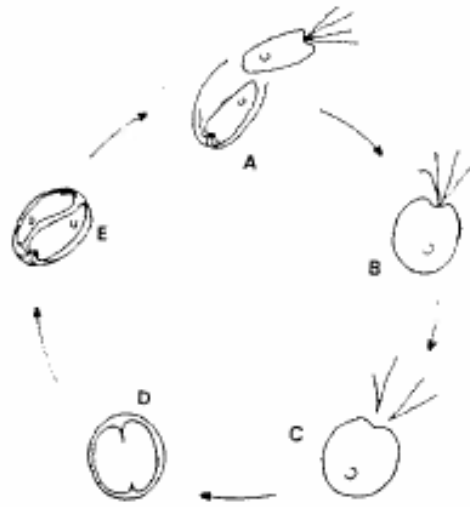


Figura 6.1 - *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Buchter. Il ciclo vitale: (A) fase in cui vengono rilasciate le cellule figlie dalla cellula madre; (B) fase dove la cellula è matura ed è mobile, quadri-flagellata e dotata di pareti; (C) fase dove i flagelli sono persi e si ha la formazione della miste; (D-E) fasi dove avviene la divisione cellulare.

Impieghi e modalità di coltivazione

La specie *Tetraselmis suecica* (Figura 6.2) è frequentemente utilizzata in acquacoltura perché è ricca in steroli (Patterson et al., 1993) e vitamina E (Carballo-Cárdenas et al., 2003). Ha un buon contenuto in lipidi che varia dal 12 fino al 28-30% del peso secco (Otero e Fàbregas, 1997). Per quanto riguarda gli acidi grassi, tra i saturi il principale è il 16:0; tra i monoinsaturi il 16:1 n-9 e il 18:1 n-9; tra i polinsaturi il 16:3 n-3, il 18:3 n-3, il 18:4 n-3, ma è priva di DHA (Montaini et al., 1995; Zukova e Aizdaicher, 1995; Otero e Fàbregas, 1997, Muller-Fuega, 2003).

Dai numerosi studi condotti sul valore nutrizionale di *T. suecica* è emerso che questa costituisce un ottimo alimento per ostriche, vongole e mitili, specialmente quando

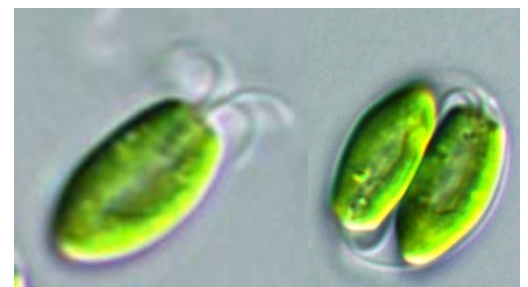


Figura 6.2 - *Tetraselmis suecica* cellula vegetativa e cellula incistata in fase di riproduzione.

somministrata in diete plurispecifiche (Robert et al., 2001).

T. suecica oltre che direttamente somministrata agli stadi giovanili di molluschi, è anche impiegata come alimento per il nauplii di *Artemia*, un microcrostaceo (zooplancton) largamente utilizzato in acquacoltura come alimento vivo per larve di pesci e gamberetti (Fàbregas et al., 1996; Muller-Fuega et al 2003). *T. suecica* è stata anche descritta come eccellente alimento per rotiferi (*Brachionus plicatilis*) (Fulk e Main, 1991), i quali costituiscono un alimento vivo indispensabile, durante i primi 20-25 giorni di sviluppo, per le larve di numerosi pesci marini pregiati. Inoltre è risaputo che molte microalghe producono sostanze ad attività antibatterica e antifungina (Pesando, 1990). Fra di esse *T. suecica* sembra svolgere un ruolo essenziale nella selezione e controllo della microflora presente nelle vasche di allevamento di pesci e crostacei e riduce l'insorgenza di malattie provocate da batteri patogeni (Austin e Day, 1990; Austin, 1992).

Tipicamente *Tetraselmis* è coltivata in autotrofia. È stato dimostrato che alcune specie possono essere coltivate in condizioni di mixotrofia, utilizzando varie fonti di carbonio organico (peptone, glucosio, estratto di lievito o una combinazione dei tre) in presenza di luce. In ogni caso le crescite ottenute e le concentrazioni cellulari raggiunte sono state sempre maggiori rispetto al controllo mantenuto in condizioni di autotrofia (Cid et al., 1992). Queste prove sono state realizzate in laboratorio con piccoli volumi di coltura (40 ml) e in condizioni di luce artificiale molto bassa. È infatti noto che la crescita di colture in mixotrofia è notevolmente rallentata in condizioni di elevata illuminazione (Ukeless e Rose, 1976). La crescita di *T. suecica* in condizioni mixotrofiche è stata anche proposta per la produzione di α -tocoferolo (di cui la microalga è ricca) che per la sua capacità antiossidante è largamente utilizzato come additivo alimentare e in cosmesi (Caraballo-Càrdenas et al, 2003). *Tetraselmis* può essere coltivata anche in condizioni eterotrofiche, ovvero al buio, in fermentatori, usando esclusivamente una fonte di carbonio organico (in genere glucosio) invece della luce come fonte di energia per la cellula. Questa tecnologia, ormai affermata in campo microbiologico, è stata utilizzata per la produzione su scala commerciale di *Tetraselmis* ottenendo rese in biomassa superiori a $100 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$ (Day et al., 1991).

La sperimentazione con il genere *Tetraselmis* si è articolata in diverse fasi, alcune di esse sono state svolte in laboratorio in quanto propedeutiche per la sperimentazione su scala pilota svoltasi successivamente in sistemi di coltura di nuovo disegno ed a luce

naturale. Una parte importante del lavoro si è focalizzata sui costi di produzione della biomassa cercando di mettere a punto strategie per una sua riduzione.

In particolare gli obiettivi della ricerca sono stati i seguenti:

- screening in laboratorio di 17 differenti ceppi per la capacità di crescere in condizioni mixotrofiche. Tale studio ha permesso di selezionare quei ceppi con maggior capacità di crescita sia in autotrofia che in mixotrofia e di restringere quindi il numero di ceppi da portare avanti nella successiva sperimentazione.
- screening all'aperto dei ceppi risultati più idonei per individuare quello migliore in termini di resa in biomassa e resistenza agli stress fra cui di particolare importanza la capacità di crescere a temperature elevate per ridurre o eliminare i costi richiesti per il “cooling”
- formulazione di un nuovo mezzo di coltura a base di acqua di mare artificiale preparata con sali a basso costo e sua valutazione per la coltura del ceppo di *Tetraselmis* prescelto;
- coltura all'aperto sul mezzo più economico e valutazione della possibilità di usare refluo avicolo come fonte di nutrienti;
- coltura massiva in fotobioreattori a basso costo, tipologia GWP, di *Tetraselmis* per valutare la capacità di crescita nel periodo invernale e osservare l'andamento della produttività e della composizione biochimica nel lungo periodo di coltivazione (luglio-dicembre).

6.2 Screening di ceppi di *Tetraselmis* in funzione della capacità mixotrofica

6.2.1 Introduzione

Solitamente le microalghe sono coltivate in condizioni autotrofiche dove la radiazione luminosa è usata utilizzano come fonte di energia per ridurre la CO₂ attraverso l'ossidazione di substrati (principalmente l'acqua) con il rilascio di O₂. Alcune specie possono crescere in presenza di una fonte di carbonio organico con (mixotrofia) o senza (eterotrofia) luce (Cid et al., 1992; Perez-Garcia et al., 2011). Recentemente, molta attenzione è stata focalizzata alla messa a punto di tecniche di coltura massiva delle

microalghe alternative alle vasche aperte, includendo l'uso di fotobioreattori chiusi e processi mixotrofici ed eterotrofici (Xie et al., 2001; Mojtaba Azma, 2011). La mixotrofia è una condizione intermedia tra autotrofia ed eterotrofia. Consiste in un regime di crescita nel quale viene utilizzata la radiazione luminosa come fonte di energia e vengono assimilati sia CO₂ che carbonio organico. Quindi i processi metabolici di fotosintesi e respirazione avvengono contemporaneamente. Il tasso di crescita delle colture mixotrofiche è perciò definito dalla somma dei tassi di crescita specifici ottenuti in condizioni fotoautotrofiche ed eterotrofiche. In presenza di luce, le microalghe sono capaci di utilizzare il glucosio in modo più efficiente. Infatti è stato visto che in condizioni mixotrofiche, diminuisce la frazione di energia luminosa utilizzata per fissare la CO₂ ed incrementa quella utilizzata per l'assimilazione della fonte di carbonio (Grobbelaar, 1994). La coltivazione mixotrofica è comunque soggetta a due tipi di limitazione: la bassa irradianza e la bassa concentrazione della fonte di carbonio organico. È tuttavia noto che la crescita di colture in mixotrofia è notevolmente rallentata in condizioni di elevata illuminazione (Ukeless e Rose, 1976). In condizioni di coltura all'aperto dove non è possibile operare/mantenere colture axeniche, il C organico, di solito fornito in forma di glucosio o acetato, è aggiunto in continuo in piccole dosi e durante le ore di luce. Ciò al fine di incrementare la resa in biomassa ed al tempo stesso prevenire l'eccessiva crescita dei batteri. (Perez-Garcia e al., 2011).

L'approccio basato sulla crescita eterotrofa consente l'uso dei fermentatori cioè di una tecnica ormai standardizzata nell'industria alimentare e farmaceutica che nella maggior parte dei casi ha come vantaggio principale una significativa riduzione dei costi. Le colture eterotrofe di microalghe hanno tuttavia alcune limitazioni fra cui il numero limitato di specie eterotrofe, la facile contaminazione e la impossibilità di produrre metaboliti la cui sintesi è indotta/regolata dalla luce (Perez-Garcia e al., 2011).

Precedenti studi hanno mostrato che alcune specie di *Tetraselmis* come *T. suecica*, *T. tetrathele* e *T. verrucosa* sono in grado di utilizzare il glucosio come fonte di carbonio organico e quindi di crescere in condizioni mixotrofiche o eterotrofiche (Cid et al., 1992; Gladue & Maxey, 1994; Xie et al., 2001).

Le colture di microalghe dotate di elevata capacità di crescita mixotrofica possono essere coltivate in fotobioreattori chiusi (preferibilmente) ottenendo concentrazioni cellulari e rese in biomassa significativamente più elevate che in condizioni

autotrofiche. Pertanto microalghe mixotrofiche rappresentano una risorsa e la loro coltura costituisce una valida alternativa per ridurre i costi di produzione della biomassa algale (Cid et al., 1992; Xie et al., 2001) specialmente se come fonte di C vengono utilizzati sottoprodotti da altri processi industriali (etanolo, glicerolo) (Goksan et al., 2010; Heredia-Arroyo et al., 2010) o acque di scarico (Wang et al., 2012).

6.2.2 Materiali e Metodi

Lo screening per testare la capacità mixotrofica dei 17 ceppi di *Tetraselmis*, è stato svolto in laboratorio. I ceppi testati sono elencati in Tabella 6.1.

La sperimentazione è stata condotta in tubi di vetro con capacità 40 mL muniti di tappo a vite. Il tappo era forato ed il foro chiuso mediante membrana di silicone; attraverso tale membrana era introdotta la cannula di insufflazione ed un ago da siringa con cotone per la fuoriuscita dell'aria. Ciascun tubo conteneva 20 mL di coltura, la quale era agitata insufflando una miscela di aria/CO₂ (98/2 v/v). Le colture erano esposte ad un'illuminazione continua di 100 μmoli di fotoni m⁻² s⁻¹, fornita da 6 lampade fluorescenti da 58-W (Philips MASTER TL-D58W/840) e mantenute ad una temperatura di 25°C.

Ogni ceppo era coltivato sia in condizioni autotrofiche (luce + CO₂) che mixotrofiche (glucosio + luce + CO₂). Le colture autotrofiche erano cresciute su mezzo *f* ed erano considerate colture di controllo per confrontarle con quelle mixotrofiche. Le colture mixotrofiche erano cresciute su mezzo *f* con glucosio come fonte di carbonio organico. Quest'ultimo era fornito alle colture mixotrofiche solo all'inizio della sperimentazione e ad una concentrazione di 5 g L⁻¹. Due repliche per ogni condizione (autotrofia, mixotrofia) sono state testate (4 tubi allestiti per ogni ceppo)

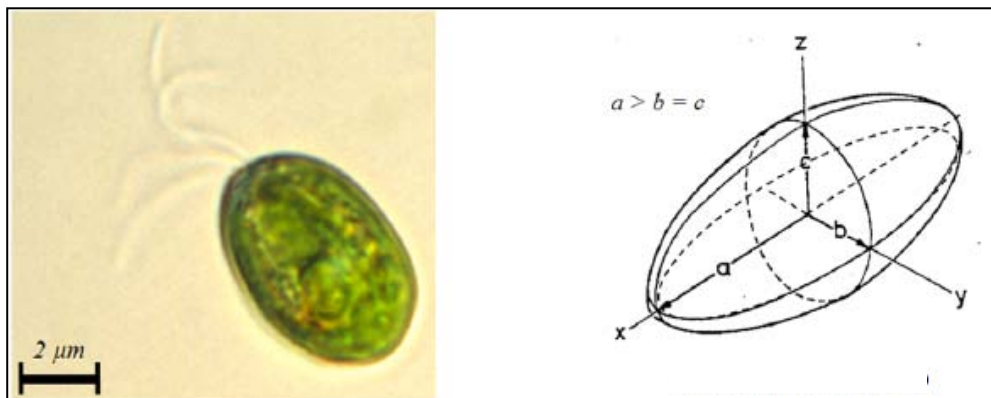
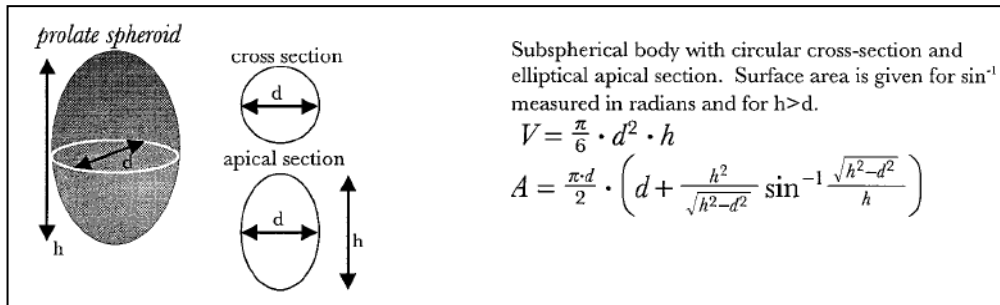
Le colture sono state gestite in batch per un periodo di 8 giorni e all'inizio e alla fine di tale periodo è stato prelevato un campione sul quale era determinata la concentrazione cellulare attraverso conta cellulare (camera Burker). Tutte le colture sono partite con una concentrazione iniziale compresa tra 0,2 e 0,4 x 10⁴ cellule mL⁻¹. Come parametro di crescita è stata scelta la conta cellulare e non il peso secco per evitare che l'eventuale incremento della carica batterica interferisse sulla stima della concentrazione cellulare, soprattutto nelle colture mixotrofiche. Giornalmente erano fatte misure del pH ed

osservazioni macroscopiche e microscopiche. Tutti i ceppi sono stati caratterizzati in base alle loro dimensioni all'inizio ed alla fine della curva di crescita ed è stato quindi calcolato il biovolume. Il biovolume dei ceppi di *Tetraselmis* è stato calcolato dalle misure delle dimensioni fatte al microscopio ed assumendo per tutti i ceppi che la singola cellula avesse la forma geometrica di uno sferoide prolato il cui volume è dato dalla seguente formula (Hillebrand et al., 1999; Bunthawin et al., 2011):

Tabella 6.1 - Ceppi di *Tetraselmis* testati in laboratorio per valutarne la capacità mixotrofica.

Ceppi di <i>Tetraselmis</i>
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M – M33
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M – M35
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M – M34
<i>Tetraselmis tetrathele</i> . F&M –M55
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M – M86
<i>Tetraselmis</i> sp. R/F&M47
<i>Tetraselmis</i> sp. R/F&M30
<i>Tetraselmis</i> sp. R/F&M157
<i>Tetraselmis</i> sp. R/F&M218
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M89
<i>Tetraselmis</i> sp. R/F&M224
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M – M85
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M90
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M91
<i>Tetraselmis</i> sp. R/F&M497
<i>Tetraselmis</i> sp. R/F&M789
<i>Tetraselmis tetrathele</i> F&M-M92
<i>Tetraselmis subcordiformis</i> F&M-M93

La produttività espressa in termini di biovolume è stata calcolata come differenza dei valori ottenuti moltiplicando il numero di cellule finale ed iniziale per il rispettivo biovolume medio.



6.2.3 Risultati

Per verificare la capacità mixotrofica i 17 ceppi di *Tetraselmis* sono stati coltivati in tubi di vetro da 40 mL usando il mezzo *f* con aggiunta del glucosio. In Figura 6.3 sono riportate le produttività volumetriche in termini sia di numero di cellule (A) che di biovolume (B). Tuttavia, rappresentare le produttività giornaliere in termini di numero di cellule non è completamente corretto e potrebbe portare a delle conclusioni erranee, in quanto le cellule dei differenti ceppi mostravano dimensioni diverse, non solo tra i ceppi stessi ma anche all'interno dello stesso ceppo in funzione delle condizioni di crescita mixotrofiche o autotrofiche.

Quindi tutti i ceppi sono stati caratterizzati in funzione delle loro dimensioni ed è stato calcolato il biovolume all'inizio e alla fine della sperimentazione sia in condizioni autotrofiche che mixotrofiche (Tabella 6.2).

Tabella 6.2 – Biovolume dei ceppi di *Tetraselmis* all'inizio e alla fine della sperimentazione calcolato dalle dimensioni cellulari (lunghezza e larghezza) I valori sono la media (\pm ds) di almeno 10 misure al microscopio.

Ceppo di <i>Tetraselmis</i>	Biovolume iniziale (μm^3)	Biovolume finale (μm^3)	
		Coltura in autotrofia	Coltura in mixotrofia
<i>T. suecica</i> F&M-M33	235,09 \pm 73,2	426,57 \pm 197,0	387,73 \pm 97,9
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M34	439,86 \pm 139,8	680,40 \pm 48,9	380,23 \pm 42,5
<i>T. suecica</i> F&M-M35	530,49 \pm 65,3	404,77 \pm 36,8	388,07 \pm 92,7
<i>T. tetrathele</i> F&M-M55	524,70 \pm 194,2	295,40 \pm 92,1	320,27 \pm 56,4
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M85	503,40 \pm 58,9	673,93 \pm 63,8	241,56 \pm 78,5
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M86	333,22 \pm 52,0	309,71 \pm 71,4	221,46 \pm 14,8
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M89	410,90 \pm 85,3	423,16 \pm 181,0	320,61 \pm 112,7
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M91	309,03 \pm 124,0	144,46 \pm 51,4	137,99 \pm 61,9
<i>T. tetrathele</i> F&M-M92	269,84 \pm 55,3	230,80 \pm 32,1	282,31 \pm 48,8

<i>T. subcordiformis</i> F&M-M93	489,60 ± 182,0	644,56 ± 160,9	620,23 ± 112,8
<i>Tetraselmis</i> sp. R/F&M30	280,41 ± 87,9	304,94 ± 115,2	284,49 ± 73,4
<i>Tetraselmis</i> sp. R/F&M47	408,51 ± 127,1	617,71 ± 28,9	605,10 ± 155,8
<i>Tetraselmis</i> sp. R/F&M157	270,18 ± 74,2	415,33 ± 107,7	553,32 ± 52,5
<i>Tetraselmis</i> sp. R/F&M218	783,64 ± 263,5	206,13 ± 66,7	297,44 ± 69,1
<i>Tetraselmis</i> sp. R/F&M224	201,36 ± 66,1	251,45 ± 37,2	683,49 ± 163,1
<i>Tetraselmis</i> sp. R/F&M497	501,87 ± 151,8	711,41 ± 51,9	137,99 ± 61,9
<i>Tetraselmis</i> sp. R/F&M789	143,44 ± 41,3	578,87 ± 180,3	255,19 ± 43,2

La Figura 6.3 B mostra che in autotrofia tre ceppi hanno ottenuto produttività superiori a $2 \text{ mm}^3 \text{ mL}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$ e cioè: *Tetraselmis* sp. F&M-M34, *Tetraselmis* sp. F&M-M91 e *Tetraselmis* sp. R/F&M789. Confrontando le produttività in termini di biovolume ottenute in condizioni autotrofiche e mixotrofiche, i ceppi possono essere suddivisi in tre gruppi. Un primo gruppo comprende i ceppi che hanno mostrato più elevate produttività in mixotrofia che in autotrofia, ed è costituito da: *Tetraselmis* sp. F&M-M89 (+10%), *T. suecica* F&M-M33 (+15%), *Tetraselmis* sp. R/F&M30 (+24%), *T. tetrathele* F&M-M55 (+27%), *Tetraselmis* sp. R/F&M47 e *T. suecica* F&M-M35 (entrambi +32%), *Tetraselmis* sp. R/F&M157 (48%), *Tetraselmis* sp. R/F&MM224 (+80%), e *T. tetrathele* F&M-M92 (+173%). Un secondo gruppo comprende i ceppi che hanno mostrato la medesima produttività sia in autotrofia che in mixotrofia (*Tetraselmis* sp. R/F&M218, *Tetraselmis* sp. F&M-M91 e *T. subcordiformis* F&M-M93). L'ultimo gruppo comprende i ceppi che non hanno mostrato una capacità mixotrofica in quanto hanno presentato produttività in biovolume dal 27 all'81% inferiori rispetto a quelle ottenute in condizioni autotrofiche e comprendono: *Tetraselmis* sp. F&M-M34, *Tetraselmis* F&M-M85, *T. suecica* F&M-M86, *Tetraselmis* sp. R/F&M497 e *Tetraselmis* sp. R/F&M789.

Al microscopio è stata osservata un'elevata crescita dei batteri, in quei ceppi, che hanno mostrato una minore crescita in condizioni mixotrofiche, come *Tetraselmis* sp. R/F&M218 e *Tetraselmis* sp. R/F&M789. Al contrario nelle colture mixotrofiche con un alto tasso di crescita, la contaminazione batterica era simile a quella presente nelle colture di controllo (autotrofe) (dati non mostrati).

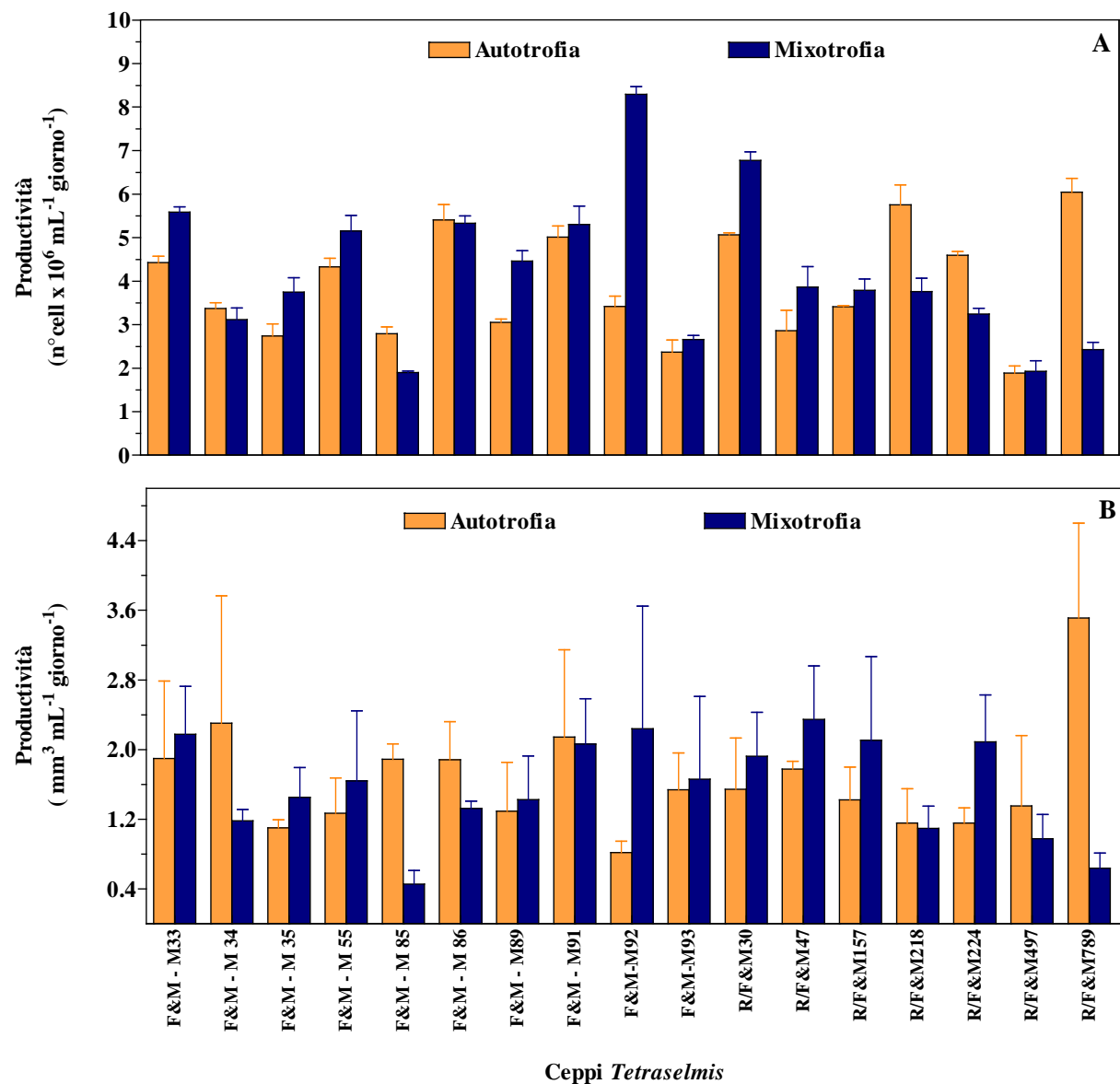


Figura 6.3 – Produttività volumetrica espressa in termini di numero di cellule (A) e in termini di biovolume (B) dei 17 ceppi di *Tetraselmis*, coltivati in condizioni autotrofiche e mixotrofiche. È riportata la media (\pm ds) di due repliche per ogni ceppo e condizione di coltura

6.2.4 Conclusioni

I risultati di questo screening iniziale hanno mostrato che circa la metà dei ceppi di *Tetraselmis* testati sono in grado di crescere in condizioni mixotrofiche utilizzando il glucosio come fonte di carbonio organico. Solamente tre ceppi (*Tetraselmis* sp. R/F&M157, *Tetraselmis* sp. R/F&MM224 e *T. tetrathele* F&M-M92) hanno mostrato una crescita almeno del 50% superiore in mixotrofia. Tuttavia in nessuno di questi casi possiamo dire di aver ottenuto delle produttività molto elevate da giustificare la loro coltura in mixotrofia ed infatti la resa di questi ceppi su glucosio non è significativamente più alta di quella di altri ceppi cresciuti in autotrofia (ad es. di *Tetraselmis* sp. F&M-M33, *Tetraselmis* sp. F&M-M34, *Tetraselmis* sp. F&M-M91).

Inoltre è stato osservato che nelle colture di alcuni ceppi non capaci di crescere in condizioni mixotrofiche, la carica batterica incrementava notevolmente, mentre i ceppi con capacità mixotrofica riescono a controllare la carica batterica, non facendola aumentare.

Da questo screening, sono stati scelti 6 ceppi con i quali è stata condotta una successiva selezione all'aperto. I ceppi sono stati scelti in quanto hanno mostrato buone produttività in condizioni autotrofiche (*Tetraselmis* sp. F&M-M34, *Tetraselmis* sp. F&M-M86), ma anche in condizioni mixotrofiche (*T. suecica* F&M-M33, *T. suecica* F&M-M35, *T. tetrathele* F&M-M55, *Tetraselmis* sp. F&M-M89) e capacità di controllare la carica batterica.

6.3 Selezione all'aperto dei ceppi di *Tetraselmis* in funzione della crescita e resistenza alla temperatura

6.3.1 Introduzione

Lo screening di laboratorio, sebbene necessario e propedeutico per la selezione di ceppi aventi maggiore potenziale produttivo e capaci di accumulare componenti di interesse, può non essere sufficiente per una valutazione completa, in quanto non tiene conto delle variazioni ambientali e delle condizioni di stress a cui sono sottoposte le colture all'aperto. Elevata radiazione luminosa, ciclo luce/buio e variazioni della temperatura potrebbero infatti essere fattori limitanti o comunque influenzare significativamente la resa delle colture ed il loro profilo biochimico. Da un punto di vista applicativo ceppi coltivabili in laboratorio ma con scarsa adattabilità e resistenza all'aperto sarebbero da evitare.

Uno dei problemi principali in coltura massiva a luce naturale è il controllo della temperatura delle colture, in quanto temperature di circa 40 °C possono essere facilmente raggiunte all'aperto sia in vasche che in particolar modo in fotobioreattori chiusi. Le vasche aperte non vengono termostate artificialmente in quanto grazie all'elevata evaporazione riescono a mantenere valori tollerabili ovviamente in funzione della specie coltivata e dell'area geografica in cui operano. Invece uno dei maggiori costi operativi (circa il 23% dei costi energetici) nella produzione commerciale di biomassa algale in fotobioreattori chiusi è proprio la termostatazione delle colture senza la quale esse possono facilmente raggiungere e di gran lunga superare i 40°C. (Pushparaj et al., 1997; Tredici et al. 2010). Riuscire a trovare un ceppo capace non solo di tollerare, ma anche di crescere ad alte temperature risulta quindi fondamentale per realizzare impianti commerciali in ambienti arido-desertici e per ridurre i costi di produzione.

Lo scopo della sperimentazione è stato valutare la capacità dei 6 ceppi di *Tetraselmis* selezionati nello screening di laboratorio di crescere ad una temperatura sovraottimale (35-40°C) facilmente raggiungibile nei fotobioreattori all'aperto.

6.3.2 Materiali e Metodi

Sei dei ceppi di *Tetraselmis* precedentemente selezionati in laboratorio sono stati coltivati all'aperto nel mese di agosto (Tabella 6.3).

Tabella 6.3 - Ceppi di *Tetraselmis* testati nelle due sperimentazioni

Ceppi testati all'aperto
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M33
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M34
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M35
<i>Tetraselmis tetrathele</i> F&M-M55
<i>Tetraselmis suecica</i> F&M-M86
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M89

L'inoculo dei differenti ceppi è stato prodotto in laboratorio, quindi trasferito in "bubble tubes" di vetro (5 cm di diametro, 50 cm di altezza, 600 mL in volume) all'aperto e fatto crescere per ca 5 giorni con il duplice scopo di produrre la biomassa necessaria e consentire l'adattamento alle condizioni "outdoors". Sono stati quindi allestiti 12 "bubble tubes (due per ogni ceppo) contenenti ciascuno 600 ml di coltura, suddivisi in due gruppi ognuno posizionato in una vasca da acquario contenente acqua. Un gruppo di 6 tubi è stato mantenuto durante le ore diurne (7.30-19.30) a 25-27°C mediante l'impiego di un circolatore con serpentina che nel primo mattino scaldava l'acqua della vasca mentre quest'ultima veniva raffreddata quando la temperatura superava 25°C. Un secondo gruppo invece era mantenuto a 35-40°C sin dal primo mattino mediante l'ausilio di due resistenze elettriche (temperatura impostata 32°C) e non era fornito raffreddamento. Durante la notte la temperatura oscillava secondo le fluttuazioni ambientali. Il pH era controllato solo nelle ore diurne mediante miscela aria/CO₂ (1,5% v/v) fornita ad intermittenza (15 min ON-30 min OFF) ad eccezione delle ore centrali (in continuo ON) con un dispositivo valvola + timer. Le colture erano gestite in batch per un periodo di una settimana.

La Figura 6.4 mostra il dispositivo di crescita impiegato e l'aspetto delle colture allo start, dopo 1, 4 e 6 giorni di crescita.

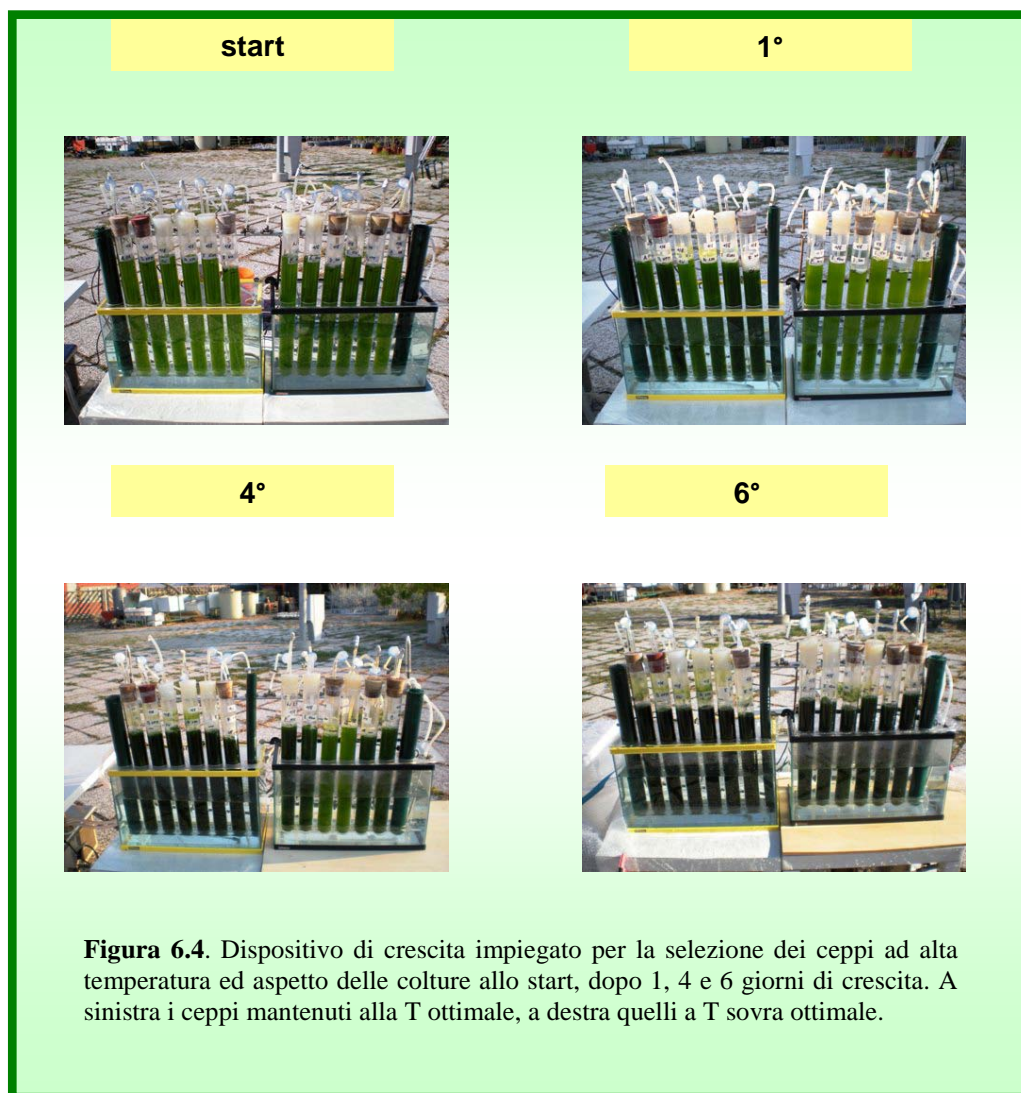


Figura 6.4. Dispositivo di crescita impiegato per la selezione dei ceppi ad alta temperatura ed aspetto delle colture allo start, dopo 1, 4 e 6 giorni di crescita. A sinistra i ceppi mantenuti alla T ottimale, a destra quelli a T sopra ottimale.

6.3.3 Risultati

Curva di crescita e produttività

I sei ceppi di *Tetraselmis* sono stati coltivati nel mese di agosto presso l'area esterna dell'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi - CNR (Sesto Fiorentino, Firenze, Italia)

(Latitudine 43°50'7''N; Longitudine 11°11'46''E). Il periodo della sperimentazione era caratterizzato da una radiazione solare alta (mediamente 27,2 MJ m⁻² giorno⁻¹ sulla superficie orizzontale) e da una temperatura media giornaliera di 34°C.

Le curve di crescita dei sei ceppi di *Tetraselmis* coltivati all'aperto alla temperatura ottimale ed a quella sovraottimale sono riportate in figura 6.5. Dall'interpolazione dei punti della curva è stata ottenuta la linea di regressione lineare per ogni ceppo e per entrambe le temperature. Queste linee sono state analizzate statisticamente con l'analisi dei residui (Runs Test) e la significatività della differenza tra le pendenze è stata valutata con il test del parallelismo.

Cinque ceppi mostravano differenze significative tra le pendenze delle linee di regressione delle curve a 26°C ed a 40°C dimostrando un deleterio effetto dell'alta temperatura sin dal primo giorno (Tabella 6.4). La riduzione in produttività di questi ceppi era tra 22% (*T. suecica* F&M-M33) e 40% (*T. suecica* F&M-M35) confrontandola a quella ottenuta dalle colture di controllo (Figura 6.6). Le pendenze delle linee di regressione ottenute dalle colture del ceppo *Tetraselmis* sp. F&M-M89 non hanno evidenziato differenze significative e perciò era possibile calcolare una pendenza comune ai due trattamenti. Questa pendenza rappresenta la produttività media ottenuta nel periodo di sperimentazione che era uguale a circa 0,76 g L⁻¹ giorno⁻¹. Da notare che alla temperatura ottimale i ceppi più produttivi (> 0,9 g L⁻¹ giorno⁻¹) sono stati *T. suecica* F&M-M33, *T. tetrathele* F&M-M55, *T. suecica* F&M-M86 e *Tetraselmis* sp. F&M-M89. In figura 6.7 è mostrato l'andamento della temperatura delle due colture in una tipica giornata estiva.

Tra i ceppi testati *Tetraselmis* sp. F&M-M89 sembra essere capace non solo per tollerare ma anche per crescere a 40°C raggiungendo produttività comparabili a quelle della coltura mantenuta alla temperatura ottimale. Sebbene ottengano una minore resa anche i ceppi *T. suecica* F&M-M33 e *T. tetrathele* F&M-M55 tollerano abbastanza bene l'alta temperatura.

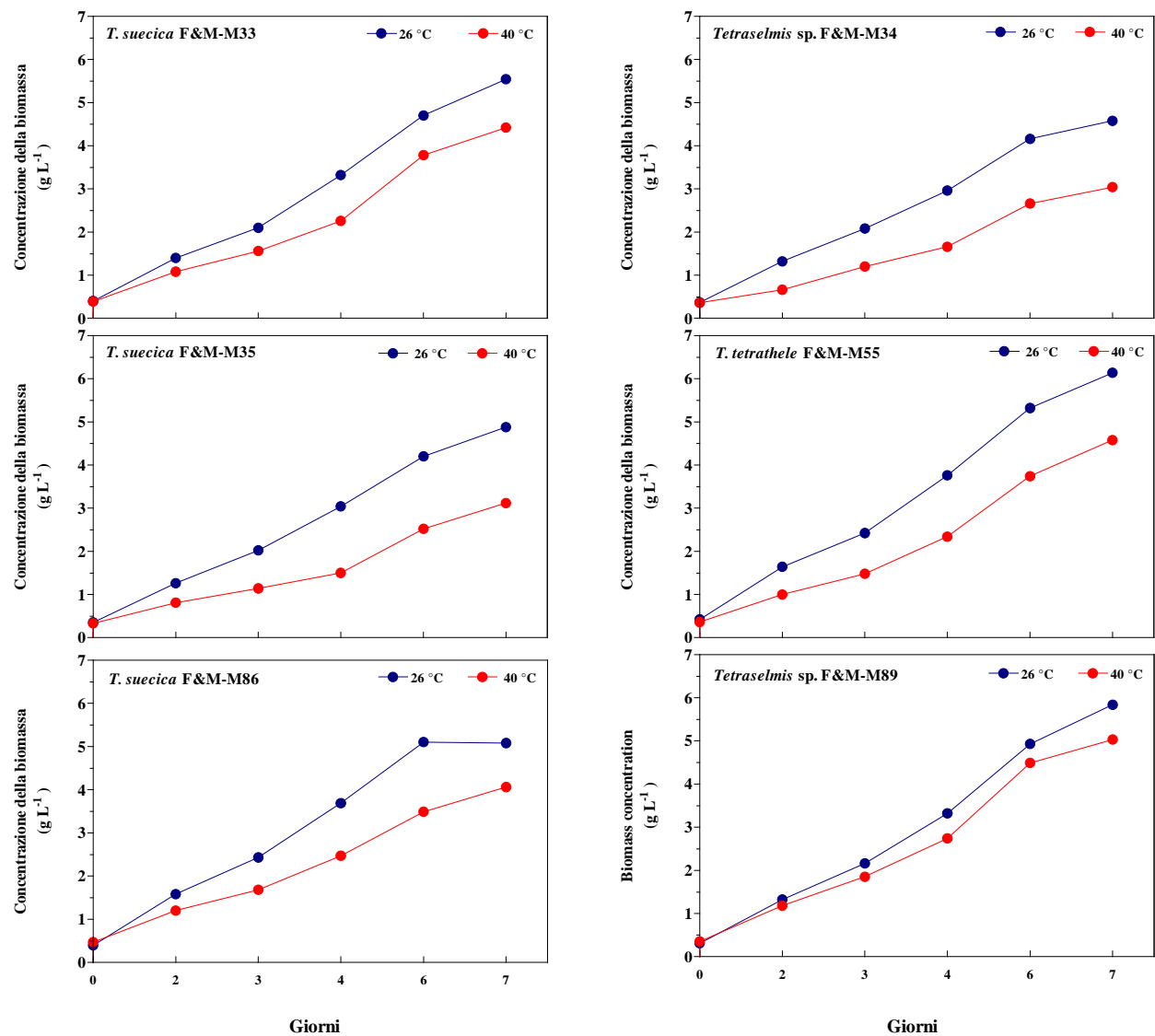


Figure 6.5 - Curve di crescita dei differenti ceppi di *Tetraselmis* coltivati all'aperto in "bubble tubes" a due differenti temperature (26°C e 40°C) durante la prima settimana di Agosto.

Tabella 6.4 - Confronto tra le linee di regressione ottenute dalla interpolazione delle curve di crescita mostrate in figura 6.5. La linearità delle linee e la significatività della differenza tra le pendenze delle linee è stata analizzata con l'analisi dei residui (Runs test) e con il test del parallelismo rispettivamente (GraphPad Software, San Diego, USA).

<i>Ceppo /Temperature</i>	<i>Equazione LRL</i>	<i>r²</i>	<i>Differenza tra slopes</i>
<i>T. suecica</i> F&M-M33 26 °C 40 °C 26 °C vs 40 °C	Y=0.7602X - 0.6376 Y=0.6011X - 0.5568	0.9866 0.9749	* (P=0.041)
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M34 26 °C 40 °C 26 °C vs 40 °C	Y=0.6305X - 0.3640 Y=0.4102X - 0.3176	0.9917 0.9701	** (P=0.0014)
<i>T. suecica</i> F&M-M35 26 °C 40 °C 26 °C vs 40 °C	Y=0.6705X - 0.5040 Y=0.4038X - 0.3144	0.9896 0.9688	*** (P=0.0007)
<i>T. tetrathele</i> F&M-M55 26 °C 40 °C 26 °C vs 40 °C	Y=0.8474X - 0.6712 Y=0.6240X - 0.6620	0.9899 0.9697	* (P=0.013)
<i>T. suecica</i> F&M-M86 26 °C 40 °C 26 °C vs 40 °C	Y=0.7314X - 0.3682 Y=0.5297X - 0.2436	0.9715 0.9892	* (P=0.019)
<i>Tetraselmis</i> sp. F&M-M89 26 °C 40 °C 26 °C vs 40 °C	Y=0.8190X - 0.8420 Y=0.7102X - 0.7076	0.9869 0.9810	<i>ns</i> (P=0.15)

LRL = Linea di Regressione Lineare

* significativo (P<0.05)

** molto significativo (P<0.005)

*** estremamente significativo (P<0.001)

ns non significativo (P>0.05).

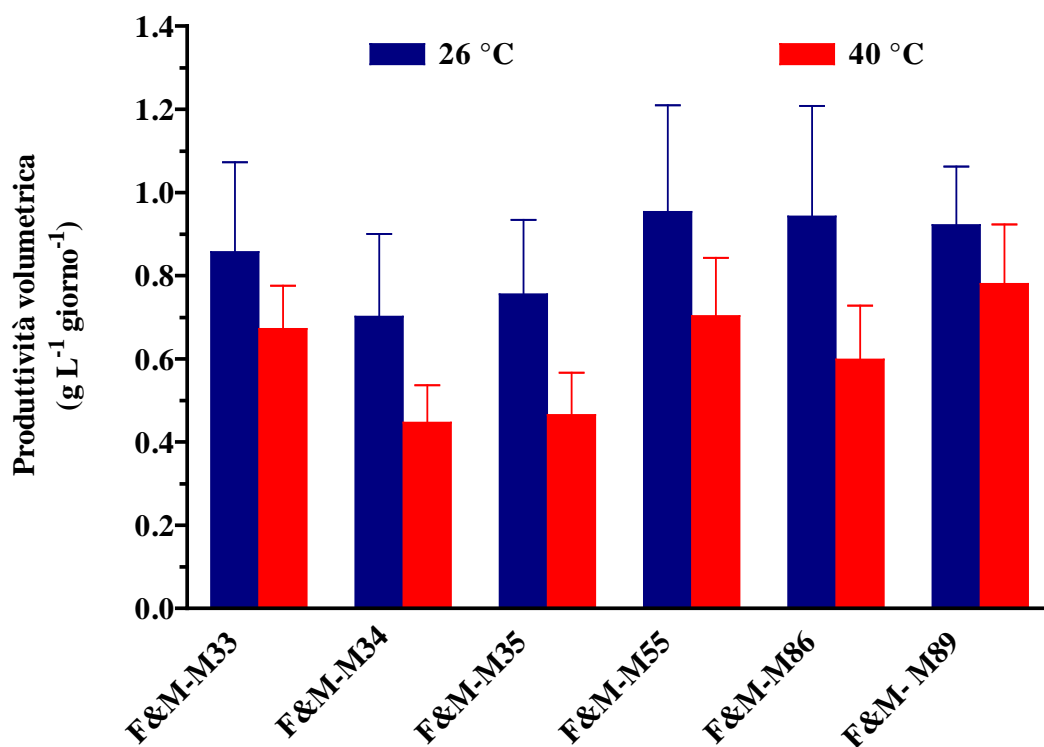


Figure 6.6 – Produttività volumetrica dei differenti ceppi di *Tetraselmis* coltivati all’aperto in “bubble tubes” a due differenti temperature. È mostrato il valore medio (\pm ds; n=6).

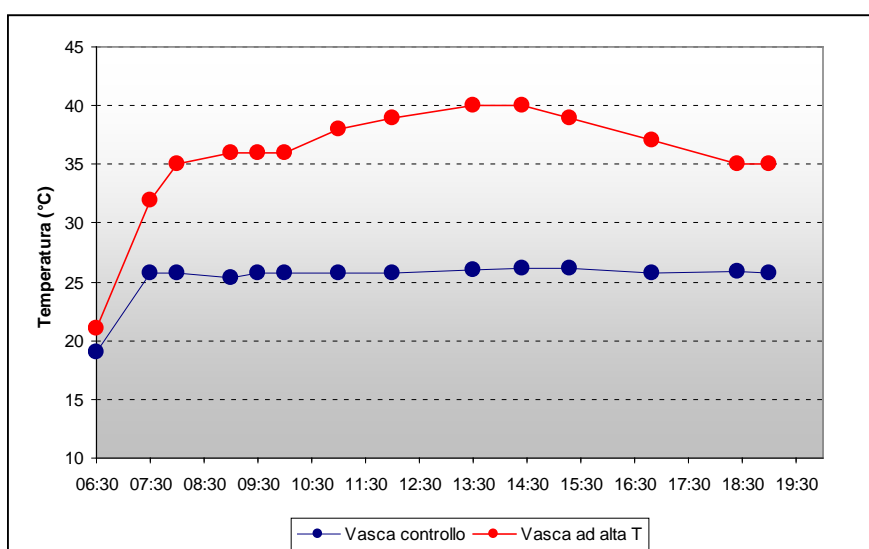


Figura 6.7 Andamento della temperatura in una tipica giornata serena.

6.3.4 Conclusioni

In conclusione questa sperimentazione ha mostrato che a temperatura superiore (35-40°C) rispetto a quella ottimale solo tre ceppi, *T. suecica* F&M-M33, *T. tetrathele* F&M-M55 e soprattutto *Tetraselmis* sp. F&M-M89, hanno mostrato buone produttività, paragonabili o di poco inferiori a quelle ottenute alla temperatura ottimale. Si può quindi prevedere di coltivare questi tre i ceppi di *Tetraselmis* all'aperto anche in zone arido-desertiche innalzando il livello di temperatura "soglia" e quindi riducendo l'energia ed i costi per il cooling.

Dalla combinazione dei risultati ottenuti in questa sperimentazione ed in quella dello screening di laboratorio sulla capacità mixotrofica è stato possibile selezionare un solo ceppo con il quale sono state condotte le successive prove mirate alla produzione di una biomassa di qualità, riducendo i costi di produzione. Il ceppo scelto è stato *T. suecica* F&M-M33 per i seguenti motivi:

- 1) si è mostrato capace di crescere anche su mezzo addizionato di carbonio organico (condizione mixotrofica)
- 2) è un ceppo capace di crescere all'aperto, in quanto tollera le alte temperature (40°C)
- 3) mostra alte produttività in condizioni autotrofiche (1 g L⁻¹ giorno⁻¹)
- 4) ha una buona composizione biochimica, con un alto contenuto proteico (ca. 50%)
- 5) è il ceppo di cui si hanno più informazioni in quanto è stato a lungo utilizzato in coltura massiva all'aperto.

6.4 Formulazione di un'acqua di mare artificiale a basso costo e suo utilizzo per coltivare *T. suecica* F&M – M33

6.4.1 Introduzione

La produzione della biomassa microalgale, richiede l'utilizzo di elettricità, fertilizzanti, acqua e materie prime. La valutazione economica ed energetica della produzione della biomassa delle microalghe ha mostrato chiaramente che le colture algali sono ancora lontane dalla fattibilità industriale mostrando un bilancio energetico e un costo di produzione ancora troppo alto per una produzione su scala commerciale. Infatti ad oggi il costo di produzione della biomassa algale come materia prima per biofuel e feed non è inferiore a 5-7 €kg⁻¹ (Biondi et al., 2012; Chini Zittelli et al., 2013). In particolare il costo di produzione delle microalghe nelle avannotterie per l'allevamento larvale di pesci, molluschi bivalvi e gamberi varia fra i 30 ed i 300 €kg⁻¹ di biomassa secca e rappresenta circa il 30-40% dei costi totali delle aziende (Tredici et al., 2009). Per questo impiego specifico tuttavia potrebbero essere tollerati prezzi di mercato intorno 50-100 €kg⁻¹ in quanto sono richieste particolari specie di microalghe e elevata qualità nutrizionale e microbiologica della biomassa. Ed in effetti su questi valori si aggirano ad oggi i costi di produzione delle poche aziende produttrici che usano soprattutto fotobioreattori. La produzione di biomassa per mangimi o per biocombustibili richiede un significativo decremento di tali costi.

I costi di produzione possono essere suddivisi in due gruppi: costi capitali (installazione/montaggio della strumentazione e superficie occupata) e costi operativi (manodopera, CO₂, acqua con incluso relativi trattamenti, energia elettrica, nutrienti e sostanze chimiche). Tra i costi capitali, l'installazione/montaggio della strumentazione è il costo che pesa maggiormente, in quanto corrisponde al 25% dei costi totali, invece la superficie occupata influisce solo per un 5%. Tra i costi operativi la manodopera è il fattore che pesa maggiormente sui costi (30% dei costi totali), tutti gli altri fattori operativi condizionano ciascuno i costi totali del 10% (Molina Grima et al., 2003; Williams e Laurens, 2010; Richardson et al., 2012). Il costo del mezzo di crescita è variabile e dipende dalla specie microalgale coltivata, la collocazione geografica

dell'impianto, la stagione. Sebbene soggetto ad una certa incertezza nei prezzi degli ingredienti il costo del mezzo può rappresentare il 10-35% dei costi operativi (Molina Grima et al., 2003).

Per la produzione di microalghe marine sarebbe economicamente vantaggioso effettuare la coltivazione in aree costiere dove è possibile utilizzare acqua di mare naturale (AMN). Quest'ultima ha come inconveniente una composizione soggetta a variazioni, ma è disponibile sempre e richiede esclusivamente costi per il pompaggio dal mare al sito di utilizzo. Se la produzione di microalghe marine avviene in regioni lontane dal mare come ad esempio Camporosso, è necessario utilizzare AMA preparata con sali sintetici. Nella nostra esperienza in laboratorio, per le colture all'aperto su piccola scala e produzione di inoculi, l'AMA preparata con il sale marino di sintesi Tropic Marine Zoomix, ha mostrato essere la più idonea. Tuttavia il suo costo proibitivo (ca 2 €kg⁻¹) non ne permette l'impiego su scala commerciale. Da qui la necessità di formulare una ricetta che utilizzi sali sintetici a basso costo facilmente reperibili in commercio per riprodurre la composizione dell'acqua di mare naturale. Inoltre i costi di produzione possono essere ulteriormente abbassati riducendo la salinità del mezzo e quindi il quantitativo dei sali sintetici utilizzati. La microalga marina *T. suecica* ha la capacità non solo di tollerare ampi intervalli di salinità, ma anche di crescere su un mezzo di coltura a salinità tra il 15 – 35‰ (Laing e Utting, 1980; Fabregas et al., 1984; Sen et al., 2005). Un notevole risparmio nella quantità di mezzo di coltura e nei costi per il suo smaltimento potrebbe essere ottenuto utilizzando fotobioreattori chiusi ad elevato rapporto S/V, ciò è sicuramente un vantaggio, anzi l'unico vantaggio reale dei FBR, tuttavia ancora troppo energivori per una produzione massiva a basso costo (Rodolfi et al., 2003; 2009).

In Allegato 1 sono mostrati i principali ioni che costituiscono l'acqua di mare naturale ed i loro quantitativi. La restante parte è formata da altri elementi, che in concentrazione costituiscono meno del 1 x 10⁻¹⁰ mg L⁻¹ (Lyman e Fleming, 1940). Per la formulazione di una AMA non solo simile a quella naturale ma anche in grado di sostenere crescite volumetriche rilevanti (tipiche dei FBR ad elevato rapporto S/V) e non creare carenze nutrizionali nel lungo periodo è necessario considerare quali sono gli ioni principali che costituiscono le cellule microalgali ed il loro contenuto. Nelle cellule microalgali gli elementi minerali con funzioni biologiche o in forma elementare o incorporati in macromolecole, sono il calcio, il fosforo, il magnesio, il sodio, il potassio, il solfato (lo

zolfo) e il cloruro. In Allegato 2 è riportato il contenuto degli elementi minerali presenti nella biomassa delle microalghe in generale e di *T. suecica* in particolare. Da notare che i minerali presenti in maggior concentrazione in *T. suecica* e quindi più importanti per la sua crescita sono potassio, calcio e magnesio (Fabregas e Herrero, 1986). Tuttavia, non deve essere trascurato l'apporto di Fe di cui la AMN è completamente priva. In questa sede non sarà discusso il ruolo dell'N e P per i quali si rimanda al paragrafo 6.4.

Nel presente lavoro è stato condotto uno studio avente come obiettivi: 1) formulazione di una AMA avente composizione minerale simile a quella dell'acqua di mare naturale utilizzando sali a basso costo. Poiché il maggior componente dell'acqua di mare è il NaCl abbiamo reperito e usato un sale naturale proveniente dalle saline siciliane (SOSALT, contenente 99% di NaCl) il cui costo era pari a 0,095 €kg⁻¹; 2) coltura in laboratorio di *T. suecica* su mezzo preparato con tale formulazione e confronto con una coltura di controllo cresciuta sul mezzo tradizionalmente impiegato in laboratorio e costituito da acqua di mare artificiale preparata con Tropic Marine Zoomix il cui costo si aggira intorno a 1,8 €kg⁻¹; 3) valutazione della capacità di crescita a due differenti salinità (15 e 30‰) per entrambe le formulazioni.

6.4.2 Materiali e Metodi

La microalga *T. suecica* F&M-M33 è stata coltivata in laboratorio in tubi di vetro "bubble tubes" di capacità 0,6 L (Figura 6.8).

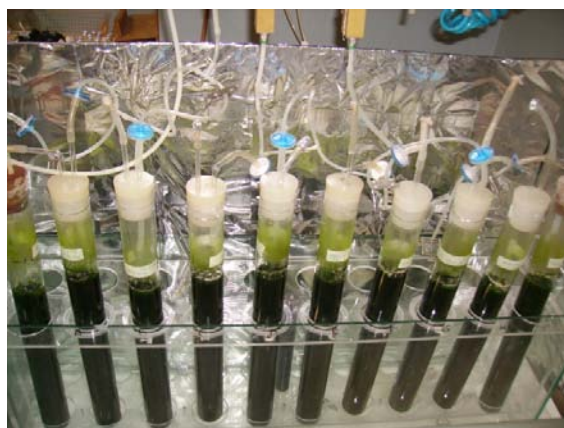


Figura 6.8 - Dispositivi di coltura "bubble tubes" usati in laboratorio per testare la nuova formulazione di AMA.

I “ bubble tubes ” erano esposti ad una luce artificiale media di $140 \mu\text{mol}$ di fotoni $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornita da un dispositivo contenente sei lampade fluorescenti (Osram FQ 39W/865-T5) e mantenuti ad una temperatura di $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Sono state testate due differenti formulazioni di AMA (Tabella 6.5) a cui sono stati poi aggiunti i nutrienti del mezzo *f*:

1) acqua di mare preparata con il sale commerciale Tropic Marine Zoomix (Adriatic Sea Aquarium & Equipment Srl, Rimini, Italia) comunemente utilizzato nel nostro laboratorio;

2) acqua di mare formulata con differenti sali in modo da garantire le proporzioni degli ioni tipiche dell’acqua di mare naturale. In tal caso è stato utilizzato NaCl a basso costo (SOSALT, Saline Sosalt S.p.a, Trapani, Italia), il Tropic Marine Zoomix in un quantitativo pari al 10% di quello utilizzato nella formulazione tradizionale, ma anche i sali contenenti potassio, magnesio e calcio, importantissimi per la microalga (Tabella 6.0). In contemporanea e con le due differenti ricette di acqua di mare sono state testate anche due diverse salinità, 15‰ e 30‰.

Tabella 6.5 - Composizione e contenuto dei sali presenti nelle due tipologie di AMA alle due salinità testate.

Tipologia sale	AMA Tropic Marine Zoomix (g L ⁻¹)		AMA SOSALT (g L ⁻¹)	
	15‰	30‰	15‰	30‰
SOSALT (99% NaCl)	-	-	11,1	22,2
Tropic Marine Zoomix	15	30	1,5	3
MgSO₄ x 7H₂O	-	-	3,75	7,5
KCl	-	-	0,3	0,6
CaCl₂ x 2H₂O	-	-	0,4	0,8

In Tabella 6.6 la composizione in ioni delle due tipologie di acqua di mare artificiale è confrontata con quella dell’acqua di mare naturale (AMN).

Ogni trattamento è stato testato in doppio e la concentrazione iniziale della biomassa era pari a 1 g L⁻¹. L'inoculo per lo start-up proveniva da colture cresciute in "bubble tubes" a luce artificiale su acqua di mare prodotta con il Tropic Marine Zoomix. E' stato adottato un regime di raccolta semicontinuo con un tasso di diluizione del 40% ogni 2/3 giorni. La prova è durata 18 giorni e giornalmente era monitorata la crescita mediante peso secco e conta cellulare e valutato lo stato di salute delle colture mediante osservazioni al microscopio.

Tabella 6.6 - Contenuto dei principali ioni nelle due formulazioni di acqua di mare artificiale testate. Per confronto è anche mostrata la tipica composizione dell'acqua di mare naturale. I dati si riferiscono ad una salinità del 30‰.

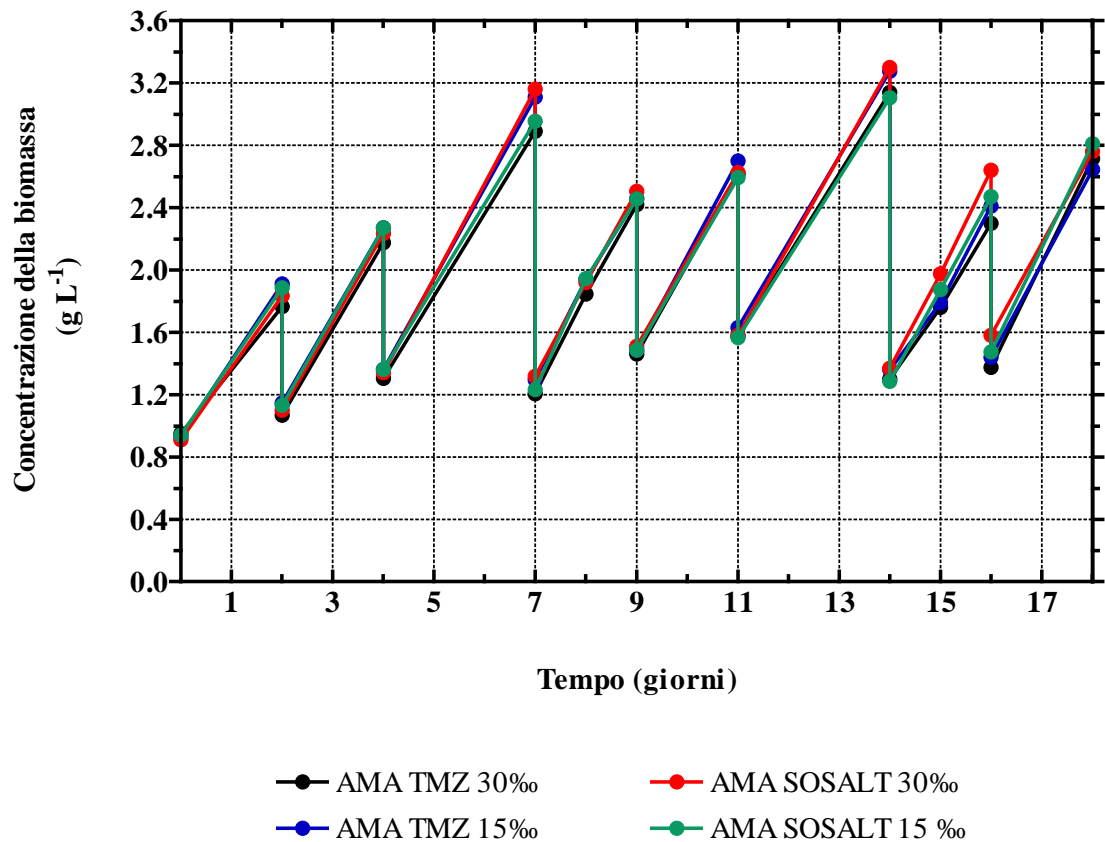
Ioni (g kg ⁻¹)	AMN *	AMA TMZ	AMA SOSALT					Totale
			Sosalt 22.2 g	TMZ 3 g	CaCl ₂ 2H ₂ O 0.8 g	KCl 0.6 g	MgSO ₄ 7 H ₂ O 7.5 g	
Na ⁺	9.22	8.26	8.63	0.83	0	0	0	9.46
K ⁺	0.33	1.2	0.007	0.12	0	0.315	0	0.44
Mg ⁺⁺	1.11	3.6	0	0.36	0	0	0.74	1.10
Ca ⁺⁺	0.353	1.2	0	0.12	0.22	0	0	0.34
Sr ⁺⁺	0.007				0	0	0	
Cl ⁻	16.58	12.74	13.44	1.27	0.39	0.28	0	15.38
SO ₄ ⁻	2.32	3.0			0	0		2.93
S	0.77				0	0	2.93	0.98
HCO ₃ ⁻	0.12							
Br ⁻	0.057							
F ⁻	0.0009							
H ₃ BO ₃	0.022							
Total	30.12	30						30.63

AMN (Acqua di mare naturale); AMA (Acqua di mare artificiale); TMZ (Tropic Marine Zoomix)
*(da Culking F., 1965).

6.4.3 Risultati

In figura 6.9 è mostrato l'andamento della crescita di *T. suecica* coltivata sulle due tipologie di acqua di mare a due differenti salinità. Le curve, che mettono in relazione la

concentrazione in biomassa ed il tempo, coincidono tra loro a dimostrazione che le



culture hanno ottenuto rese paragonabili.

Figura 6.9 - Andamento della crescita delle colture di *T. suecica* F&M-M33 cresciute a luce artificiale su due differenti tipologie di AMA (AMA TMZ e AMA SOSALT) a due differenti salinità (15‰ e 30‰).

Le produttività volumetriche medie delle colture ottenute durante la prova sono state le seguenti: 1) per le colture cresciute su acqua di mare artificiale con Tropic Marine Zoomix $0,55 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$ a salinità 30‰ e $0,57 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$ a salinità 15‰; 2) per le colture cresciute su acqua di mare artificiale formulata con il SOSALT e gli altri sali sintetici $0,58 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$ a salinità 30‰ e $0,55 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$ a salinità 15‰ (Figura 6.10). L'analisi statistica eseguita mediante ANOVA ad una via non ha evidenziato differenze significative ($P < 0,05$) tra i differenti mezzi e salinità testati. Non sono state riscontrate differenze significative neanche tra le medie delle produttività giornaliere espresse come numero di cellule, le quali oscillavano tra 3,8 e

$4,0 \times 10^6$ cell mL⁻¹ giorno⁻¹ (dati non mostrati). Inoltre il peso cellulare era simile in tutte le colture e corrispondeva mediamente a 152 pg cell⁻¹.

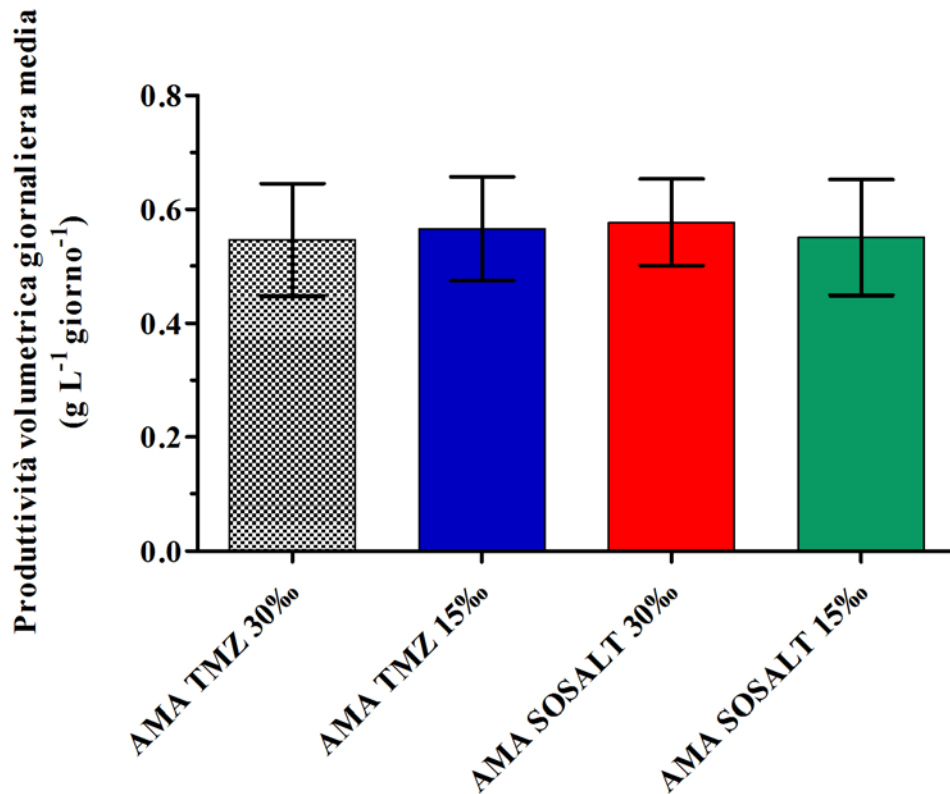


Figura 6.10 - Produttività volumetrica giornaliera media di *T. suecica* F&M-M33 coltivata in “bubble tubes” utilizzando due differenti tipologie di acqua di mare artificiale e due differenti salinità.

E' stata fatta una stima approssimata del costo del mezzo *f* preparato con i differenti sali. I costi considerati si riferiscono a prodotti non purissimi acquistati in quantità rilevanti (da Archimede Ricerche Srl). Il costo del nuovo mezzo di crescita a base di SOSALT è stato stimato essere pari a 12 € m⁻³ cioè ca 5 volte più basso di quello preparato con l'acqua di mare tradizionale. Il costo del TMZ presente nella miscela in quantità pari al 10% rappresenta il 45% del costo complessivo (Tabella 6.7).

Successivamente la ricetta dell'AMA è stata riformulata sostituendo anche il 10% del sale Tropic Marine Zoomix, in modo da ridurre ulteriormente il costo dell'AMA (Tabella 6.8). Questa seconda AMA è stata formulata facendo riferimento alla composizione di quella conforme alla ISO 10253 (vedi paragrafo 6.4.2). Per testare la nuova AMA sono state condotte prove all'aperto nel periodo estivo in sistemi di coltura

Tabella 6.7 – Confronto tra i costi dell'AMA e del mezzo *f* con le tre differenti tipologie di AMA considerando una salinità del 30‰.

Sale	Costo (€kg ⁻¹)	Mezzo <i>f</i> prodotto con AMA TZM		Mezzo <i>f</i> prodotto con AMA SOSALT n°1		Mezzo <i>f</i> prodotto con AMA SOSALT n°2	
		Quantità (kg m ⁻³)	Costo (€m ⁻³)	Quantità (kg m ⁻³)	Costo (€m ⁻³)	Quantità (kg m ⁻³)	Costo (€m ⁻³)
Sali marini							
Tropic Marine	1,8	30	54	3	5,4	-	
SOSALT	0,095	-	-	22,2	2,11	25	2.38
Macronutrienti							
NaNO ₃	0,65	0,60	0,39	0,60	0,39	0,60	0,39
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	1,00	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045	0,045
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,43	-		7,5	3,225	8,5	3,655
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,13					2,5	0,325
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,36			0,8	0,288	1,32	0,475
KCl	0,41			0,6	0,246	0,65	0,267
NaHCO ₃	0,42					0,2	0,084
H ₃ BO ₃	0,42					0,023	0,01
Micronutrienti							
	Costo (€L ⁻¹ ss)	Quantità (kg m ⁻³)	Costo (€m ⁻³)	Quantità (kg m ⁻³)	Costo (€m ⁻³)	Quantità (kg m ⁻³)	Costo (€m ⁻³)
FeCl ₃ x 6H ₂ O+ Na ₂ EDTA	0,16	1	0,16	1	0,16	1	0,16
Microelementi	0,0065	1	0,0065	1	0,0065	1	0,0065
Vitamine	0,15	1	0,15	1	0,15	1	0,15
TOTALE Mezzo <i>f</i>			54,8		12,0		8,0
TOTALE AMA			54		11,3		7,21

Tabella 6.8 - A confronto la composizione delle due AMA utilizzate nella sperimentazione

Tipologia sale (g L ⁻¹)	AMA SOSALT n°1 30‰	AMA SOSALT n°2 30‰
SOSALT (99% NaCl)	22,2	25
Tropic Marine Zoomix	3	-
MgSO ₄ x 7H ₂ O	7,5	8,5
KCl	0,6	0,65
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,8	1,32
NaHCO ₃	-	0,2
MgCl ₂ x 6H ₂ O	-	2,5
H ₃ BO ₃	-	0,023

aperti cioè vasche “raceway”. Durante questa prova la coltura cresciuta sul nuovo mezzo non ha mostrato alterazioni morfologiche, né variazioni nel peso delle singole cellule e nella loro forma rispetto alle colture tradizionali. Si rimanda al capitolo 6.4 per i dettagli di questa sperimentazione.

Come si può osservare in Tabella 6.7 con la seconda formulazione AMA SOSALT il mezzo di crescita ha un costo ca 7 volte inferiore a quello preparato con TMZ e 33% minore rispetto a quello della prima formulazione AMA SOSALT.

6.4.4 Conclusioni

I risultati ottenuti dimostrano che le nuove formulazioni dell’acqua di mare artificiale a base di SOSALT (in particolar modo la seconda formulazione nella quale è completamente assente il TMZ) possono rimpiazzare con successo l’acqua di mare tradizionale preparata con Tropic Marine Zoomix permettendo alla microalga marina *T. suecica* F&M-M33 di crescere in modo ottimale ed ottenere produttività paragonabili.

Il costo del nuovo mezzo di crescita a base di SOSALT e senza Tropic Marine Zoomix è stato stimato essere pari a ca €8 m⁻³ (ca €5 kg⁻¹ biomassa di *T. suecica*). Sebbene tale costo sia ca 1/7 di quello del mezzo preparato con l’acqua di mare tradizionale, esso è ancora troppo elevato. Da non sottovalutare la possibilità di dimezzare la salinità visto che la nostra sperimentazione ha mostrato che una sua riduzione da 30‰ a 15‰ non ha avuto nessun significativo effetto sulla crescita e sulla produttività di *T. suecica* F&M-M33. Tuttavia, qualunque sia la formulazione/salinità adottata per la preparazione dell’AMA, non è pensabile e neppure economicamente fattibile usare AMA e non predisporre un sistema di riciclo del mezzo. Ulteriori sforzi dovranno concentrarsi su questo obiettivo senza il raggiungimento del quale non sarà possibile rendere realistico e competitivo un impianto commerciale di microalghe che usi AMA, qualunque sia l’applicazione della biomassa algale. Nel capitolo successivo sarà affrontato il problema relativo al costo dei principali macronutrienti (N e P) necessari alla crescita delle microalghe, quanto essi incidano sul costo della biomassa e le possibili fonti alternative che potrebbero essere utilizzate.

Composizione in ioni dell'acqua di mare naturale e artificiale. I valori originali erano in g kg^{-1} , sono stati convertiti in g L^{-1} considerando una densità dell'acqua di mare pari a 1025 g m^{-3} .

Ioni	Acqua di mare naturale (g L^{-1}) (1)		Acqua di mare artificiale (g L^{-1}) (2)		Acqua di mare artificiale (g L^{-1}) (3)		Acqua di mare artificiale (g L^{-1}) (4)	
	S=35‰	S=30‰	S=35‰	S=30‰	S=35‰	S=30‰	S=35‰	S=30‰
Cloruro (Cl^-)	19,829	16,996	19,8289	16,9962	19,8289	16,9883	19,8197	16,9962
Sodio (Na^+)	11,025	9,449	11,0287	9,4532	11,0297	9,4611	11,0379	9,4540
Solfato (SO_4^{2-})	2,778	2,381	2,7674	2,3721	2,7777	2,3817	2,7787	2,3809
Magnesio (Mg^{2+})	1,325	1,136	1,3289	1,1391	1,3268	1,1364	1,3258	1,1373
Calcio (Ca^{2+})	0,423	0,362	0,4160	0,3566	0,4242	0,3618	0,4221	0,3636
Potassio (K^+)	0,396	0,339	0,3965	0,3399	0,3965	0,3504	0,4088	0,3399
Bicarbonato (HCO_3^-)	0,145	0,125	1,455	0,1247	0,1455	0,1247	0,1455	0,1247
Bromuro (Br^-)	0,0686	0,0588	0,0676	0,0580	0,0676	0,0588	0,0686	0,0580
Acido borico (H_3BO_3)	0,0266	0,0228	0,1455	0,1247	0,1455	0,1247	0,1455	0,1247
Stronzio (Sr^{2+})	0,0081	0,0070	0,0143	0,0123	0,0082	0,0070	0,0082	0,0070
Fluoro (F^-)	0,001	0,00088	0,0010	0,0009	0,0010	0,0011	0,0013	0,0009

((1) da Culkin, 1965, (2) Lyman e Fleming, 1940, (3) Kester et al., 1967, (4) Barsanti e Gualtieri 2006)

Contenuto in elementi minerali della biomassa microalgale in generale e di quella di *T. suecica* in particolare.

Elementi minerali	Contenuto nelle microalghe ⁽¹⁾ (% p.s)	Contenuto in <i>T. suecica</i> ⁽²⁾ (% p.s)
Fosforo (P)	0,05 – 3,3	0,65
Calcio (Ca ²⁺)	0,00 – 8,0	2,08
Sodio (Na ⁺)	0,04 – 4,7	1,04
Potassio (K ⁺)	0,1 – 7,5	1,20
Cloruro (Cl)	nd	3,72
Magnesio (Mg ²⁺)	0,05 – 7,5	0,78
Ferro (Fe ^{2+/3+})	0,02 – 3,4	0,10
Zinco (Zn)	0,0005 – 0,1	0,15
Manganese (Mn)(ppm)	0,002 – 0,024	47,49
Cobalto (Co)(ppm)	0,00001 – 0,02	5,53
Rame (Cu) (ppm)	0,0006 – 0,003	652,00

((1) Grobbelaar , 2004; (2) Fabregas e Herrero, 1986)

6.5 Coltura all'aperto *T. suecica* F&M – M33 su refluo avicolo (pollina)

6.5.1 Introduzione

La quantità di fertilizzanti utilizzati nel processo di coltivazione delle microalghe ($\text{kg ha}^{-1} \text{ anno}^{-1}$) viene calcolata dalla produttività di biomassa ($\text{t ha}^{-1} \text{ anno}^{-1}$) e considerando per *Tetraselmis* un contenuto medio del 10% per l'azoto, 1% per fosforo e 0,1% per il ferro. Il contributo dei fertilizzanti al costo di produzione della biomassa algale è stato stimato intorno al 7% del costo complessivo. L'uso di reflui industriali, domestici ed agricoli come fonte di nutrienti per la coltura delle microalghe potrebbe da un lato ridurre del 7% il costo di produzione e dall'altro aumentare il NER di tutto il processo di coltivazione del 27% (Biondi et al., 2012). Tuttavia, questo non è ancora sufficiente per rendere economicamente fattibile la produzione commerciale di biomassa algale come materia prima per mangimi e biocombustibili e ulteriori ricerche sono ancora necessarie. I reflui zootecnici contengono molti dei nutrienti richiesti dalle microalghe e potrebbero rappresentare una eccellente fonte alternativa di fertilizzanti per la loro produzione (Bhatnagar et al., 2011; Singh, et al., 2011). Dall'altro lato grossi problemi ambientali sono dovuti all'intensificazione della produzione agro-industriale e al conseguente smaltimento dei reflui solidi e liquidi sul terreno. Alte concentrazioni di animali in piccole aree generano un'enorme quantità di reflui che difficilmente possono essere smaltiti in quanto il suolo ormai è saturo ed esistono reali rischi di inquinamento dei corpi idrici naturali nei quali si formano enormi fioriture algali che minacciano la vita acquatica (Singh et al., 2011; Markus e Georgakakis, 2011). Il regolamento CE 1774/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio dell'Unione europea del 3 ottobre 2002 stabilisce che nei terreni che ricadono nelle zone vulnerabili ai nitrati, le dosi di letame o di liquame da distribuire, sono quelle che determinano un apporto di azoto disponibile al campo non superiore a 170 kg per ettaro e per anno.

Alcuni reflui, come quelli dei suini e del pollame, contengono un alto ammontare di ammonio ma contengono anche molti macro e micro-elementi (Allegato 1).

Con il termine pollina si intende un misto di substrato, deiezioni, piume e residui di mangime ed è identificata dal Decreto ministeriale 5/2/98 come rifiuto. Questa contiene un alto quantitativo di azoto totale (mediamente 46 g kg^{-1} di concime) e un alto quantitativo di azoto ammoniacale (mediamente $14,4 \text{ g kg}^{-1}$ di concime) (Markus e

Georgakakis, 2011; Singh, et al., 2011). Inoltre la pollina possiede significativi quantitativi di fosforo organico ed inorganico. La maggior parte del fosforo nel concime è inorganico (60-90% del fosforo totale) con un piccolo ammontare di quello organico (Markus e Georgakakis, 2011; Fenton e O'hUallachain, 2012).

L'allevamento intensivo di pollame per la produzione di carne e di uova è un'importante attività produttiva nel nostro Paese. In Italia la superficie occupata dagli allevamenti avicoli è di circa 1500 ettari, pari ad una produzione di pollina di 1,5 milioni tonnellate e mediamente la produzione pro-capite di pollina va da 4,5 a 45 kg/anno, a seconda della specie e delle modalità di allevamento. La direttiva nitrati con la creazione delle zone vulnerabili pone dei limiti insostenibili con il limite dei 170 kg di azoto per ettaro e per anno. In pratica dovremmo avere il triplo del terreno attualmente utilizzato per smaltire tutta la pollina prodotta. Da qui la necessità di valorizzare la pollina per poterla smaltire, ad esempio utilizzarla per scopi energetici (Allegato 2).

Al fine di ridurre l'uso di fertilizzanti di sintesi, reflui ricchi di azoto e fosforo come la pollina, possono essere impiegati nella coltivazione delle microalghe. La coltivazione delle microalghe su acque reflue può essere vista come un processo in grado di produrre economicamente una preziosa materia prima utilizzabile come biocombustibile o mangime e la cui produzione non è in competizione con le risorse agricole. I reflui liquidi forniscono nutrienti a costo zero e se usati in sostituzione od ad integrazione del mezzo di crescita sintetico potrebbero contribuire a ridurre gli attuali costi di produzione della biomassa (€-30 kg⁻¹) fino a raggiungere un costo inferiore a €0,25 kg⁻¹, valore richiesto per applicazioni nel settore delle bioenergie ed in quello della mangimistica (Tredici et al. 2009).

Mentre sono numerosi i dati di coltura di microalghe su reflui industriali, domestici e zootecnici (Woetz et al., 2009; Wang et al., 2010), scarsi sono quelli che impiegano la pollina come fonte di nutrienti per le microalghe. I primi lavori sulla crescita delle microalghe su pollina sono stati intrapresi in India ed in Cina con *Scenedesmus acutus*, *Spirulina platensis* e *Chlorella pyrenoidosa* (Venkataraman et al., 1982; Cheung e Wong, 1981). Tali studi hanno mostrato alte produttività algali utilizzando la pollina con un azoto totale approssimativamente al 2% e un contenuto in fosforo disponibile di ca 260 mg L⁻¹ (Fenton e O'hUallachain, 2012). Mahadevaswamy e Venkataraman 1989 hanno utilizzato digestato di pollina diluito come mezzo di crescita per *S. platensis*. Essi hanno mostrato che il refluo diluito del 2% era il più idoneo. La densità cellulare della

coltura su refluo era pari a circa 100 mg L^{-1} in 19 giorni, che era circa il 20% inferiore alla densità cellulare ottenuto nel mezzo di coltura sintetico. Recentemente è stato condotto uno studio per valutare l'effetto del digestato di pollina sulla resa in biomassa e lipidi di *Chlorella vulgaris*. L'impiego del digestato sembra promuovere la crescita della microalga e il raggiungimento di elevate densità cellulari, mentre l'aggiunta in fase stazionaria di una fonte di carbonio come il glucosio può stimolare una resa in lipidi superiore (Iyovo et al., 2010).

La biomassa di microalghe contiene notevoli quantità di proteine e la quantità di azoto (N) richiesto come fertilizzante è stimato a 8-16 tonnellate N / ha, il che significa che la produzione di microalghe comporta enormi quantità di concimi azotati (Markus e Georgakakis, 2011). L'uso di grandi quantità di fertilizzante per la coltivazione di microalghe solleva interrogativi circa il loro impatto ambientale (Sialve et al., 2009). Inoltre, l'uso di fertilizzanti contribuisce al costo di produzione di biomassa algale (ca 7% dei costi totali). Al fine di ridurre l'impiego di fertilizzanti, reflui ricchi di azoto (N) e fosforo (P) possono essere utilizzati come mezzo di coltura, mentre allo stesso tempo le microalghe possono essere utilizzate per ridurre il carico organico e inorganico di tali reflui, fornendo così un metodo di trattamento biologico delle acque reflue (Martin et al., 1985; Mulbry et al, 2008).

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la capacità della microalga marina *T. suecica* F&M-M33 di crescere utilizzando i nutrienti contenuti nella pollina. Visto che l'obiettivo di tutta questa tesi per quanto concerne le microalghe è stato quello di abbattere i costi di produzione, la sperimentazione è stata condotta all'aperto in vasche raceway, utilizzando come mezzo di coltura quello prodotto con AMA SOSALT n° 2 (vedere capitolo 6.3) e come fonte di N e P un estratto di pollina commerciale. L'esperimento è stato condotto su piccola scala per mettere a punto la strategia e validarne fattibilità e idoneità.

6.5.2 Materiali e metodi

L'esperimento di coltivazione di *T. suecica* F&M-M33 su pollina è stato eseguito all'aperto in due vasche "raceway" di piccole dimensioni costruite in Plexiglas. Le vasche erano poste l'una accanto all'altra ed avevano ciascuna una superficie di 0,167 m², un'altezza di 6 cm ed un volume di 10 (Figura 6.11). La superficie laterale delle vaschette era coperta da un foglio di alluminio per evitare che la coltura prendesse luce anche dai lati ed in tal modo ricreare la situazione reale delle vasche di grosse



Figura 6.11 - Vasche tipo "raceway" utilizzate nella sperimentazione.

dimensioni (tipicamente non trasparenti). Il mixing della coltura era ottenuto dal movimento di palette rotanti (24 giri minuto⁻¹). L'inoculo di *T. suecica* proveniva da "bubble tubes" in laboratorio, con esso era allestita una sola vaschetta in cui la coltura fu mantenuta per 5 giorni per la fase di adattamento sia alle nuove condizioni ambientali che al nuovo mezzo *f* preparato con una formulazione più economica di acqua di mare artificiale e cioè AMA SOSALT 2. Per lo start-up della sperimentazione la coltura è stata suddivisa in parti uguali nelle due vaschette, una delle quali rappresentava la coltura di controllo in cui N e P erano forniti mediante fertilizzanti come nei giorni di adattamento, mentre nell'altra vasca i nutrienti sono stati forniti mediante un estratto di pollina collocato in una membrana da dialisi.

In tabella 6.9 è riportata la composizione dell'acqua di mare sintetica preparata secondo il protocollo International Organization for Standardization (ISO) 10253 (1995) e di quella utilizzata nella sperimentazione. Quest'ultima acqua di mare differiva da quella ISO 10253 in quanto parte del MgCl_2 era sostituito da adeguata quantità di MgSO_4 tale da mantenere costante l'apporto dello ione Mg^{2+} . Come mostrato in tabella 6.10 la formulazione AMA utilizzata fornisce tutti i principali minerali in quantità paragonabile -all'acqua di mare naturale. Questa acqua di mare era successivamente reintegrata con tutti i nutrienti del mezzo *f* per la coltura di controllo, mentre per la coltura su refluo erano introdotti microelementi, ferro e vitamine secondo il mezzo *f* ed azoto e fosforo forniti con un l'estratto di pollina.

Tabella 6.9 - Composizione dell'acqua di mare artificiale (AMA) conforme al protocollo ISO 10253 (1995) e di quella utilizzata nella sperimentazione.

Sali (g L⁻¹)	AMA ISO 10253	AMA utilizzata
NaCl (SOSALT)	22	25
KCl	0,65	0,65
Na ₂ SO ₄	3,7	-
NaHCO ₃	0,20	0,2
MgCl ₂ x 6H ₂ O	9,7	2,5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	-	8,5
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,32	1,32
H ₃ BO ₃	0,023	0,023
Totale	31,8	31,3

Tabella 6.10 Composizione ionica dell'acqua di mare artificiale (AMA) utilizzata a confronto con quella naturale (AMN).

Ioni (g L⁻¹)⁽¹⁾	AMN S=30‰	AMA utilizzata S=30‰
Cloruro (Cl⁻)	16,996	16,989
Sodio (Na⁺)	9,449	9,895
Solfato (SO₄²⁻)	2,381	3,31
Magnesio (Mg²⁺)	1,136	1,14
Calcio (Ca²⁺)	0,362	0,36
Potassio (K⁺)	0,339	0,341
Bicarbonato (HCO₃⁻)	0,125	0,145
Bromuro (Br⁻)	0,0588	-
Acido borico (H₃BO₄)	0,0228	0,023
Stronzio (Sr²⁺)	0,0070	-
Fluoro (F⁻)	0,00088	-

⁽¹⁾ modificati per 30‰ da Culkin (1965)

La pollina (AL.FE S.r.l., Mantua, Italia) prima di essere utilizzata era pretrattata. Il trattamento della pollina prevedeva una fase di frantumazione del pellet in polvere con frammenti non superiori ai 2 mm che successivamente era risospesa in acqua distillata sterile (concentrazione 265 g L⁻¹) mediante agitazione magnetica per 4 ore. Dopodichè il tutto veniva mantenuto statico per una notte a 4 °C e al buio. L'estratto della pollina era ottenuto mediante centrifugazione scartando il sedimento (Figura 6.12). Sull'estratto erano fatte le analisi per determinare il contenuto in azoto e fosforo mediante un C99 Multiparameter Bench photometer (Hanna Instruments, Padova, Italia) (Tabella 6.11). Quindi l'estratto di pollina era introdotto in un sacchetto costruito con una manichetta di membrana dialitica permeabile a soluti di peso molecolare 14.000 Daltons (Medical International Ltd, London, UK).

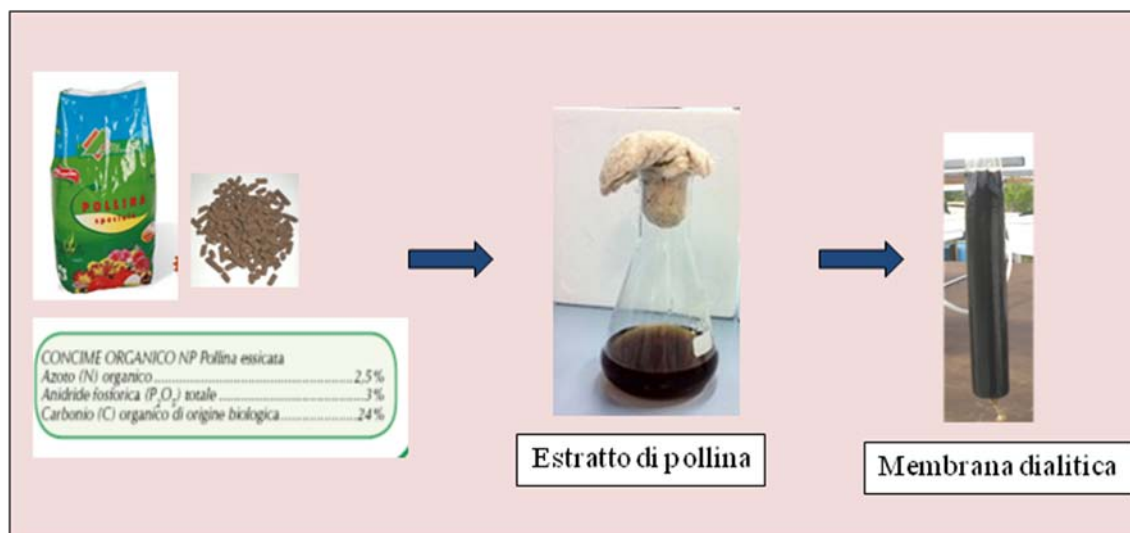


Figura 6.12 Produzione dell'estratto di pollina

Tabella 6.11 - Nutrienti presenti nell'estratto di pollina. Sono riportati i valori medi di 8 campioni analizzati.

Nutriente	Estratto di pollina (mg L ⁻¹)	Nutriente fornito (mg L ⁻¹ coltura giorno ⁻¹)
N-NO ₃	93	3.72
N-NH ₄	872	34.88
N-totale	965	38.6
P-PO ₃	218	8.72
R N/P	4.4	4.4
COD	30100	-
Residuo solido	150	-

La sperimentazione è stata condotta nel periodo estivo (dal 10 al 20 luglio 2012) e le colture erano gestite in semicontinuo con un tasso di diluizione medio pari al 35% in modo da lavorare ad una densità areale iniziale di circa 30 g m⁻² pari ad una concentrazione di 0.5 g L⁻¹. La dose di pollina (400 ml di estratto) era fornita ogni

mattina ed i nutrienti (N e P) nella coltura di controllo erano forniti in modo che non ci fossero carenze per la crescita. (Tabella 6.11).

Il pH era controllato e monitorato mediante apposita strumentazione (mod. 4238-38, Chemitec Srl, Firenze, Italia) che automaticamente immetteva CO₂ pura al superamento del valore di set-point impostato (7.8). La temperatura delle colture non era controllata ma solo monitorata nelle 24 ore. I valori della radiazione solare e della temperatura ambiente sono stati forniti dalla stazione meteo LAMMA-CNR (Sesto Fiorentino, Firenze).

Giornalmente sono state eseguite le seguenti misure:

- Peso secco e conta cellulare con camera Burkner per determinare la concentrazione della coltura e il peso delle cellule
- Osservazioni al microscopio per valutare lo stato della coltura e le dimensioni delle cellule
- Analisi per determinare i quantitativi di N e P presenti nella coltura dopo la crescita (mattino) e sulla pollina residua.

6.5.3 Risultati

Curva di crescita e produttività

Nel periodo 10/07/12 – 20/07/12 due colture hanno operato in parallelo, una di esse rappresentava la coltura di controllo in cui N e P erano forniti mediante fertilizzanti mentre nell'altra vasca i nutrienti sono stati forniti mediante un estratto di pollina collocato in una membrana da dialisi. Le due colture-sono state confrontate in termini di produttività della coltura, aspetto e dimensioni delle cellule, pigmentazione e contaminazione batterica. La temperatura ed i nutrienti delle colture sono stati monitorati quotidianamente così come i principali parametri ambientali (temperatura ambiente e radiazione solare sulla superficie orizzontale).

La Figura 6.13 mostra l'andamento della crescita delle due colture di *T. suecica* F&M-M33 coltivate all'aperto in vasche raceway da 10 L e quello della temperatura ambiente e della radiazione solare durante i 10 giorni di sperimentazione. I picchi verso il basso corrispondono alla densità areale dopo le diluizioni, fatte giornalmente, per un ammontare medio di 3.5 L di coltura asportati sia per il controllo che per la coltura cresciuta su pollina.

In Figura 14 sono riportate le produttività areali giornaliere ottenute dalle due colture insieme alla radiazione globale misurata sulla superficie orizzontale.

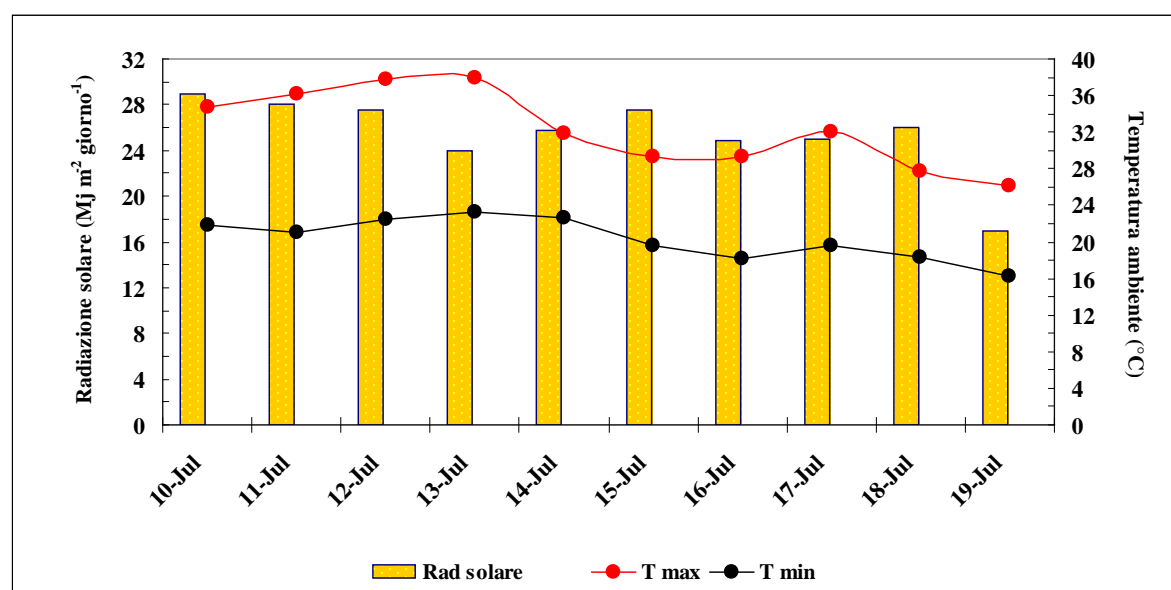
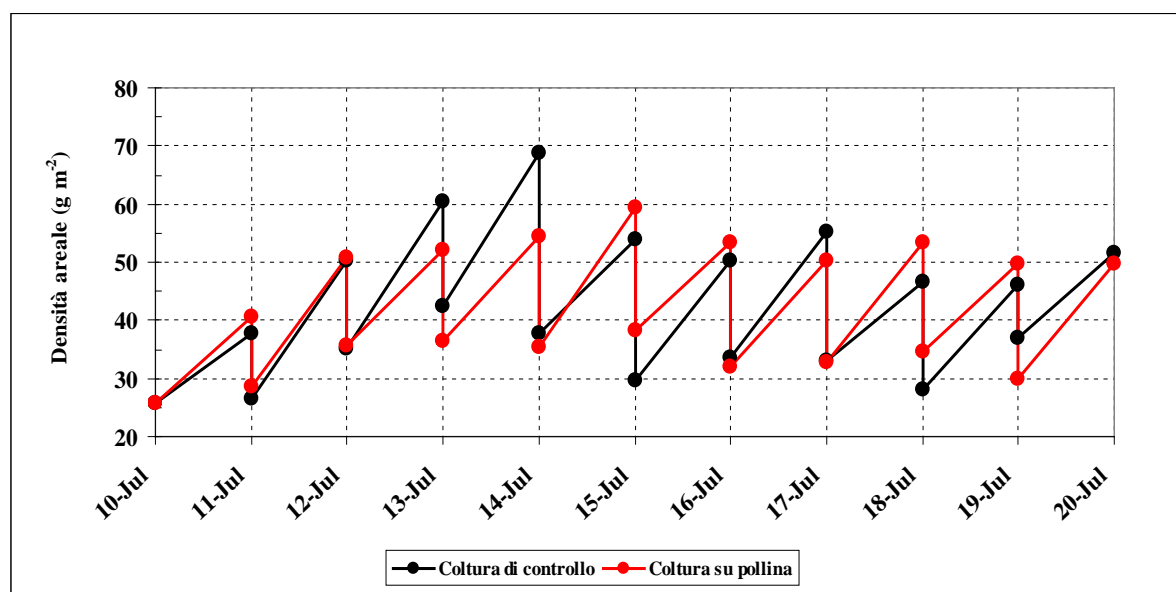


Figura 6.13 - Andamento della crescita (in alto) delle due colture di *T. suecica* F&M-M33 (controllo e coltura su pollina) cresciute all'aperto in vasche "raceway". Per ogni giorno è anche mostrata la radiazione solare giornaliera ricevuta dalla superficie orizzontale e la temperatura ambiente massima e minima

I valori medi della produttività areale ottenuti nel periodo di prova sono stati di $19,4 \pm 4,9 \text{ g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$ e $18,5 \pm 3,2 \text{ g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$, rispettivamente per la coltura di controllo e per la coltura cresciuta su pollina. L'analisi statistica dei dati (t-test) non ha evidenziato differenze significative ($P < 0,05$) fra le rese delle due colture. Durante il periodo della sperimentazione la radiazione solare giornaliera media al quale erano

esposte le colture è stata piuttosto alta ($27,8 \pm 1,23 \text{ MJ m}^{-2}$) così come la temperatura ambiente ($T_{\text{max}} = (32,3 \pm 4,23)$).

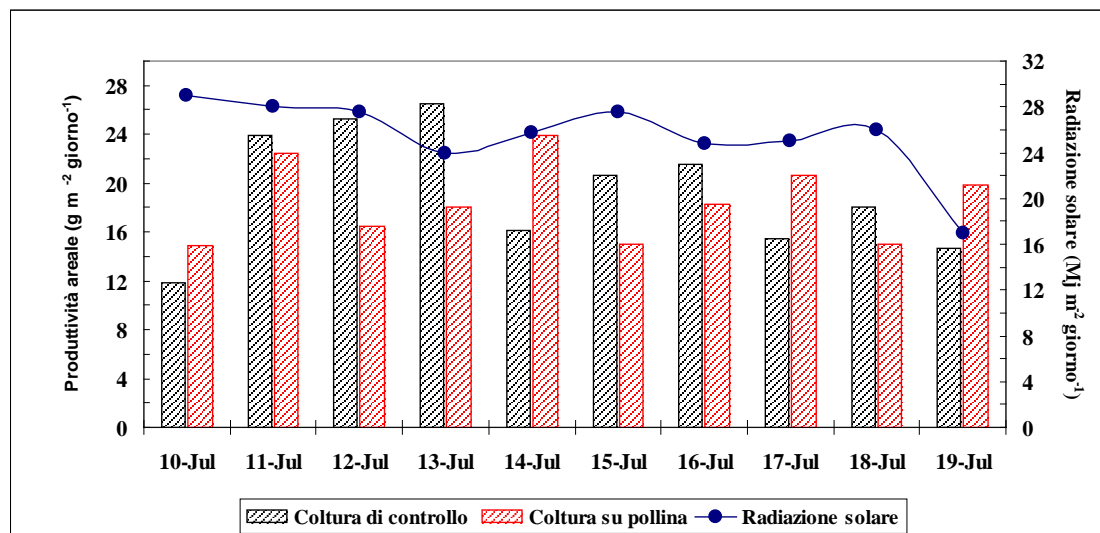


Figura 6.14 - Andamento della produttività areale giornaliera ottenuta dalle colture di *T. suecica* F&M-M33 coltivata all'aperto in vasche "raceway". E' anche mostrata la radiazione solare giornaliera ricevuta dalla superficie orizzontale.

Le rese da noi ottenute sono state di ca 30% inferiori se confrontate con quelle ottenute dallo stesso ceppo coltivato in vasche raceway, nello stesso periodo e con un regime di raccolta semicontinuo (tasso di diluizione 40%) a Monterotondo (Roma) (Pedroni et al., 2004). Da notare tuttavia che nel nostro caso non era previsto ed attuato nessun sistema di cooling per le colture in quanto non è pensabile ridurre i costi di produzione adottando come sistema di coltura le vasche (che si raffreddano mediante evaporazione) e poi spendere energia per il raffreddamento. In effetti come mostrato in figura 6.15 la temperatura delle colture superava i 30°C dalle ore 10:00 alle ore 15:00 (ora solare) e non scendeva mai al di sotto dei 17°C durante la notte.

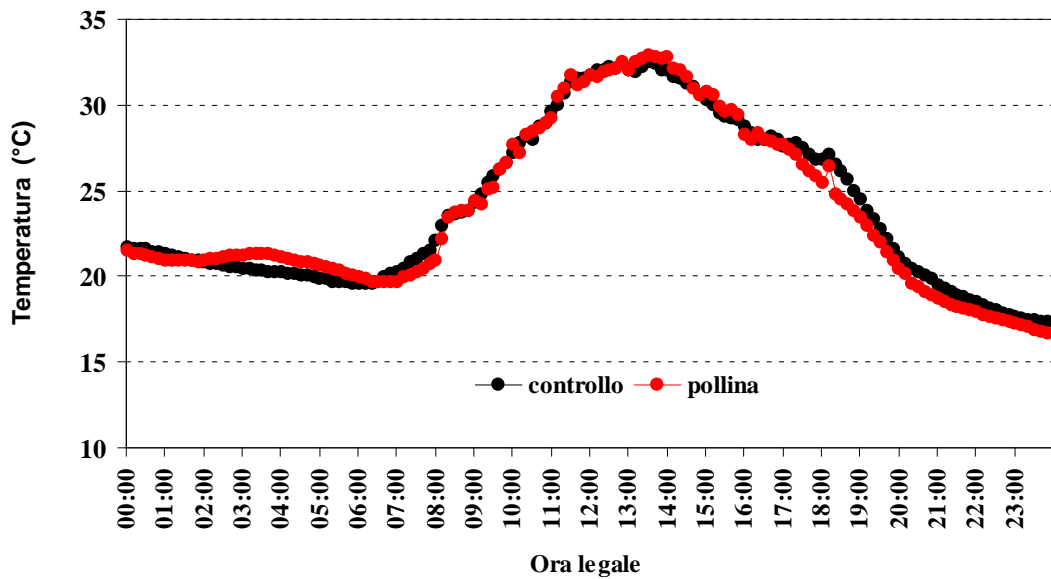


Figura 6.15 - Andamento giornaliero della temperatura della coltura di controllo e di quella su pollina in una tipica giornata estiva di luglio (12 Luglio).

Al microscopio le colture non hanno mostrato variazioni della forma, delle dimensioni e del loro peso ($98,2 \pm 14,1 \text{ pg cell}^{-1}$ nella coltura di controllo e $88,5 \pm 12,2 \text{ pg cell}^{-1}$ nella coltura cresciuta con pollina). Inizialmente entrambe le colture hanno mostrato una leggera depigmentazione, minore nel controllo rispetto alla coltura di prova, probabilmente dovuta alla pesante diluizione iniziale ed elevata esposizione alla luce solare. Alla fine della sperimentazione la coltura con pollina mostrava al microscopio un incremento del numero dei batteri. Tale aumento dei batteri non ha alterato lo stato fisiologico delle cellule e le misure della concentrazione della biomassa. Inoltre è stato osservato macroscopicamente che la coltura cresciuta con pollina, dal secondo giorno di sperimentazione mostrava della schiuma sia la sera che la mattina, molto probabilmente dovuta alla sostanza organica presente nella pollina e fuoriuscita dalla membrana da dialisi.

Efficienza di cattura dell'azoto contenuto nell'estratto di pollina mediante coltura di *T. suecica* F&M-M3

Durante la sperimentazione l'analisi dei nutrienti N e P era regolarmente effettuata sul mezzo di coltura, nell'estratto di pollina residuo (a fine crescita) e su quello nuovamente aggiunto. Considerando l'N totale fornito nell'intero periodo di coltivazione (3704 mg),

quello residuo negli estratti di pollina (complessivamente 511 mg) e nel mezzo di coltura asportato con la diluizione (670 mg), la quantità di N fissato nella biomassa è stato stimato essere ca 68% dell'azoto fornito ed il contenuto in N della biomassa prodotta ca 8 %, pari ad un tenore in proteina grezza del 50%. Quest'ultimo valore non differisce dal contenuto tipicamente osservato in *T. suecica* F&M-M33 e pertanto da un punto di vista nutrizionale la biomassa prodotta su pollina potrebbe essere idonea per impieghi in mangimistica.

6.5.4 Conclusioni

In base ai risultati ottenuti in esperimenti svolti in precedenza (dati non riportati) e confermati con la presente sperimentazione, possiamo affermare che la pollina può essere utilizzata come fonte di azoto e fosforo per la crescita di *T. suecica* ottenendo produttività paragonabili alle colture cresciute con i tradizionali fertilizzanti di sintesi.

I dati presentati in questo studio sulla crescita di *T. suecica*. (un'alga con crescente potenziale applicativo per suo alto contenuto in proteine) su nutrienti provenienti da pollina commerciale sembrano di particolare interesse, anche se ottenuti su scala di laboratorio, per vari motivi fra cui:

- i) la tecnologia consente di riutilizzare rifiuti difficili da smaltire dagli allevatori di pollame;
- ii) i reflui avicoli rappresentano una risorsa di nutrienti a costo zero che comunque devono essere smaltiti/trattati;
- iii) si tratta di un processo che se applicato su larga scala potrebbe contribuire a ridurre l'impatto ambientale legato allo smaltimento di deiezioni zootecniche.

Tuttavia, non bisogna trascurare l'aspetto legislativo a cui anche la pollina, in quanto refluo zootecnico, è soggetta. A seconda dell'utilizzo che ne viene fatto la pollina è soggetta a differenti provvedimenti legislativi. Se viene impiegata come fertilizzante secondo la normativa non può essere definita un "rifiuto" e se avviata ad impianti di produzione di fertilizzanti, questi devono essere autorizzati come "impianti tecnici" ai sensi dell'art. 18 del regolamento Ce 1774/2002 e la pollina deve essere sottoposta ad un trattamento termico ad almeno 70°C per 60 minuti, essere esente da salmonella ed enterobatteri, sottoposta a riduzione della sporulazione e della tossicogenesi, immagazzinata in silos ben chiusi e ben isolati o in imballaggi ben chiusi. Anche se la

pollina è semplicemente essiccata mediante trattamento di disidratazione in tunnel in cui si può arrivare all'80% di sostanza secca, dovrà essere comunque soggetta alle disposizioni del regolamento Ce 1774/2002.

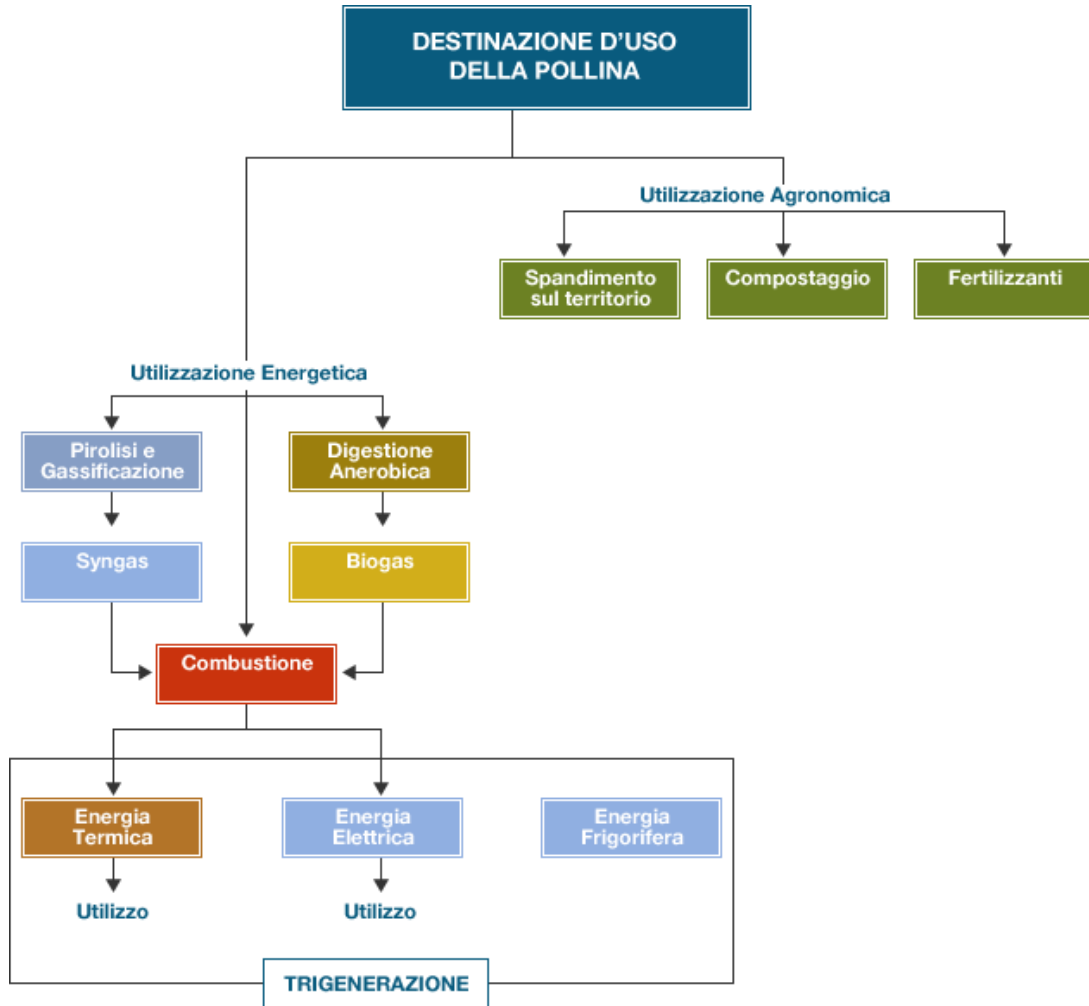
Nonostante i risultati incoraggianti restano da valutare il potenziale e l'affidabilità a lungo termine del processo, nonché sviluppare una strategia adeguata per il trattamento dei reflui avicoli in vista del loro utilizzo su vasta scala. Il vantaggio principale derivante dall'utilizzo della pollina non consiste tanto nella riduzione dei costi di produzione della biomassa, quanto nella valorizzazione di un materiale difficile da smaltire. La tecnologia basata sull'utilizzo del refluo avicolo per produrre microalghe potrebbe rappresentare una soluzione economicamente competitiva se l'impianto produttivo potesse utilizzare il refluo avicolo a costo zero proveniente da un impianto di trattamento ed in cui l'unico costo è quello del processo di sanificazione (ca 0,02 €m⁻³) assai più basso rispetto a quello dei tradizionali fertilizzanti sintetici.

Allegato 1

Composizione in macro e micro-elementi della pollina (Markou e Georgakakis, 2011)

Elemento	Contenuto (mg g⁻¹ di pollina)
N totale	18,2-72
N-NH ₄ ⁺	0,21-29,9
N-NO ₃	0,03-1,5
P-PO ₄ ³⁻	4,3-5,2
P totale	13,5-34
Potassio (K)	12,5-32,5
Sodio (Na)	2-7,4
Calcio (Ca)	36,2-59,6
Magnesio (Mg)	1,8-6,6
Manganese (Mn)	259-378 (µg g ⁻¹)
Rame (Cu)	38-68 (µg g ⁻¹)
Ferro (Fe)	8-560 (µg g ⁻¹)

Allegato 2



6.6 Coltura massiva all'aperto di *T. suecica* F&M – M33 in fotobioreattori a basso costo tipologia GWP

6.6.1 Introduzione

La coltura massiva di *Tetraselmis* è stata ed è effettuata in vasche aperte tipo "raceway" e in diversi tipi di fotobioreattori chiusi. In Hawaii utilizzando canali aventi una superficie di 24 m² Laws e Berning (1991) hanno ottenuto con *Tetraselmis suecica* una produttività di 15-20 g C m⁻² giorno⁻¹ (ca 30-40 g biomassa m⁻² giorno⁻¹) ed una efficienza fotosintetica del 9-10%. In vasche all'aperto allestite in un impianto pilota del Sud Italia, *Tetraselmis tetrathele* ha raggiunto produttività di circa 30 g m⁻² giorno⁻¹ durante l'estate, con un'efficienza fotosintetica (PAR) di circa 5% (Materassi et al., 1983). *T. suecica* è stata coltivata in parallelo in vasche aperte e reattori tubolari NHTR (Tredici et al., 2010) e tale confronto ha mostrato produttività simili per i due sistemi, circa 26 g m⁻² giorno⁻¹ (Pedroni et al., 2004). Attualmente i metodi di coltura per la produzione *Tetraselmis* negli incubatoi utilizzano sacchi di polietilene e cilindri trasparenti in fibra di vetro (fino a 500 L) di solito illuminati con luce artificiale (Fulks e Main, 1991). Numerosi miglioramenti sono stati recentemente apportati al design ed alla tecnologia dei fotobioreattori chiusi (Tredici et al., 2010) con lo scopo di incrementare la produttività delle colture microalgali rispetto ai sistemi tradizionali. Tra i nuovi sistemi ideati e messi a punto le colonne anulari (Chini Zittelli et al., 2006) ed i pannelli verticali tipologia "Green Wall Panel" (Tredici et al., 2010) sono stati e sono attualmente utilizzati in laboratorio e in scala pilota all'aperto. In un esperimento in cui era simulato un impianto full-scale a colonne anulari da 120 L *T. suecica* ha ottenuto in estate e nelle condizioni climatiche dell'Italia centrale, una produttività volumetrica media di ca 0,5 g L⁻¹ giorno⁻¹, una resa areale di 36 g m⁻² giorno⁻¹ ed una efficienza fotosintetica (PAR) superiore al 9% (Chini Zittelli et al., 2006).

6.6.2 Materiali e Metodi

Gestione delle colture microalgali nell'impianto pilota GWP

Per la gestione delle colture algali nei fotobioreattori GWP è stato messo a punto un protocollo in cui sono definite le principali operazioni giornaliere da effettuare e per ciascuna di esse le modalità di esecuzione. Le colture erano gestite in semicontinuo con diluizioni giornaliere del 40%. La biomassa della diluizione era raccolta in serbatoio a fondo conico e lasciata sedimentare naturalmente per gravità. Il concentrato algale ottenuto dopo sedimentazione naturale era raccolto mediante centrifugazione al fine di ottenere una pasta con 75-80% di umidità che era poi congelata od essiccata.

Al fine di valutare e verificare la stabilità e l'affidabilità del processo di coltivazione adottato sono stati necessari periodici controlli delle colture microalgali. I controlli da effettuare ogni giorno sono i seguenti:

- **Valutazione della crescita** mediante determinazione della concentrazione in biomassa (peso secco) e del numero delle cellule (conta cellulare al microscopio).
- **Monitoraggio dei principali parametri colturali** in particolare pH e temperatura. I valori di tali parametri devono essere periodicamente controllati nell'arco della giornata al fine di individuare malfunzionamento della strumentazione di controllo/monitoraggio. I parametri ambientali (temperatura massima e minima ed irradianza) potrebbero essere reperiti da stazioni meteorologiche locali.
- **Verifica funzionamento impianti accessori** in particolare i dispositivi per l'approvvigionamento di aria compressa, CO₂ ed H₂O di raffreddamento.
- **Determinazione della composizione biochimica della biomassa.** Dal raccolto giornaliero con cadenza settimanale o quindicinale erano prelevati campioni di biomassa per le analisi biochimiche (carboidrati, lipidi, proteine, acidi grassi, pigmenti ecc). La coltura (ca 0.5-1 L) era centrifugata in laboratorio, il pellet lavato con soluzione fisiologica (NaCl 9 g L⁻¹) per allontanare sali ed essudati organici residui, quindi congelato a - 20° C. Prima dell'esecuzione delle analisi liofilizzare il campione raccolto, determinarne l'umidità residua ed infine preservarlo (possibilmente sottovuoto) in congelatore.

6.6.3 Risultati

Coltura massiva di *T. suecica* F&M-M33 nel lungo periodo: produttività e composizione biochimica

Durante la sperimentazione, proseguita ininterrottamente da Luglio a Dicembre, è stato testato il pannello GWP tipologia I isolato, orientato N-S ed inclinato di 90° rispetto al terreno e le cui caratteristiche dimensionali sono mostrate in tabella 6.12

Tabella 6.12 - Caratteristiche dimensionali del GWP

	GWP I°
H griglia verde + base acciaio (cm)	105
Materiale	PE 3 mm
H telo vuoto (cm)	135
H coltura – aria (cm)	98,5
H coltura + aria (cm)	103
L reattore (m)	2,42
V – aria (L)	102,5
V + aria (L) = VOLUME COLTURA	108
V aria (L)	5,4
Spessore calcolato (cm)	4,31
Flusso aria unitario reale (L L ⁻¹ min ⁻¹)	0,60
S illuminata (m ²) calcolata con H+ aria	4,98/2,49
R S/V (m ⁻¹)	54,8
Tasso di diluizione giornaliero	40% (41 L)
Dispositivo di insufflazione	n. 24 fori da 1 mm ogni 10 cm
Dispositivo erogazione CO ₂	Candela porosa in legno collocata ad una estremità
Dispositivo termostatazione	n. 2 cannette a calzino Ø 1 cm, spessore 1.0 mm, L 440 cm Sup. di scambio=0,276 m ²

E' stata valutata l'influenza stagionale sulla produttività delle colture e sulla composizione biochimica della biomassa. In tutti i mesi è stato seguito (in tipiche giornate serene) l'andamento della radiazione incidente sulla superficie del fotobioreattore, su una superficie verticale di riferimento e sulla superficie orizzontale, è

stata calcolata la radiazione intercettata e verificato il contributo della radiazione diffusa e di quella riflessa in funzione della stagione.

In tabella 6.13 sono riportati i valori medi della produttività volumetrica, della produttività per superficie illuminata (PSI) e della temperatura delle colture registrata al mattino. L'andamento generale (Tabella 6.13) mostra un progressivo declino della produttività nei mesi. Il picco produttivo ($0,75 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$) è stato ottenuto in luglio con una radiazione globale media di $26 \text{ MJ m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$ ed una temperatura ambiente media di $27,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$. In agosto e settembre il decremento della produttività è stato del 8,5 e del 21,4%, rispettivamente. L'ulteriore calo produttivo osservato in ottobre (28% in meno rispetto a Settembre) sembra maggiormente correlato alla diminuzione della radiazione che a quella della temperatura ambiente. In novembre e dicembre la produttività delle colture è stata simile ($0,26$ e $0,23 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$) ma significativamente più bassa dei mesi autunnali. Le basse temperature notturne e del primo mattino (talvolta minori di 0°C) e la fotoinibizione in presenza di elevate intensità luminose, hanno sicuramente penalizzato la resa delle colture che tuttavia non hanno manifestato segni di sofferenza particolari.

Come possiamo osservare dalla tabella 6.14 la radiazione globale (diretta + diffusa), intercettata dalla SO (superficie orizzontale) in tipiche giornate serene del periodo di sperimentazione (Luglio-Dicembre) diminuisce progressivamente mentre quella intercettata dal GWP non subisce un decremento così significativo. Questo è dovuto al fatto che il sole da Luglio a Dicembre tende ad abbassarsi sull'orizzonte e di conseguenza diminuisce l'angolo di incidenza dei raggi luminosi sull'orizzontale e aumenta quello sulla SV (superficie verticale). In estate quindi la SV riceve, rispetto all'orizzontale, una minore quantità di luce. La differenza si attenua man mano che il sole si abbassa sull'orizzonte ed in autunno e inverno la superficie verticale rivolta a Sud riceve una quantità di radiazione significativamente superiore alla SO (33% in più in ottobre, 137% in più in dicembre).

Tabella 6.13 - Produttività di *T. suecica* coltivata in GWP I nel periodo Luglio-Dicembre 2010. Sono mostrati i valori medi mensili \pm DS

Mese	PV (g L ⁻¹ giorno ⁻¹)	PSI (g m ⁻² giorno ⁻¹)	Irradianza (MJ m ⁻² giorno ⁻¹)	T ambiente * (°C)	T coltura ** (°C)
Luglio	0,75 \pm 0,13	32,5 \pm 5,2	26,2 \pm 3,71	27,3 \pm 1,22	20,8 \pm 3,19
Agosto	0,69 \pm 0,14	29,9 \pm 5,13	20,6 \pm 6,10	24,0 \pm 2,05	16,8 \pm 2,51
Settembre	0,59 \pm 0,15	25,6 \pm 5,78	17,7 \pm 4,62	16,1 \pm 3,55	13,4 \pm 3,62
Ottobre	0,42 \pm 0,20	18,2 \pm 5,26	11,4 \pm 4,53	15,9 \pm 3,19	12,5 \pm 1,68
Novembre	0,26 \pm 0,15	11,3 \pm 3,92	6,6 \pm 3,41	10,1 \pm 2,79	6,5 \pm 3,33
Dicembre	0,23 \pm 0,11	9,76 \pm 2,88	4,9 \pm 2,38	7,4 \pm 1,91	4,1 \pm 2,89

*valore medio della temperatura ambiente

**misurata al mattino (h 8:00)

Da ciò si evince che la significativa diminuzione della produttività osservata nei mesi autunnali è da attribuire principalmente a:

- 1) decremento della temperatura ambiente particolarmente evidente in giornate serene alle nostre latitudini
- 2) minor numero di giornate serene

Il massimo valore di efficienza fotosintetica è stato ottenuto in Luglio. La diminuzione osservata nei mesi successivi è principalmente dovuta al decremento in produttività delle colture (Tabella 6.14).

Tabella 6.14 - Radiazione solare (PAR) intercettata dalla superficie orizzontale e dal GWP in tipiche giornate serene dei mesi di sperimentazione. I dati si riferiscono alle coordinate geografiche di Sesto Fiorentino (FI) (Latitudine = 43°50'7"80 N; Longitudine = 11°11'46"32 E). Sono mostrate inoltre la produttività volumetrica (PV) e l'efficienza fotosintetica (EF) ottenute.

	Mese					
	Luglio	Agosto	Sett	Ott	Nov	Dic
PPFD (moli fotoni m ⁻² giorno ⁻¹)						
SO	53,02	50,62	44,80	29,14	16,34	14,03
GWP nord	20,44	17,87	12,13	8,07	4,89	5,22
GWP sud	36,27	39,15	44,86	44,92	39,46	35,69
TOTALE	28,36	28,51	28,49	26,49	22,18	20,46
PPF (moli fotoni r ⁻¹ giorno ⁻¹)						
GW nord	25,99	22,73	15,42	10,27	6,22	6,64
GW sud	46,14	49,79	57,06	57,14	50,19	45,39
TOTALE	72,13	72,52	72,48	67,41	56,41	52,03
PV GWP						
(g L⁻¹ giorno⁻¹)	0,913	0,872	0,718	0,470	0,23	0,34
EF (%)	7,36	6,99	5,76	4,05	2,37	3,73

SO = superficie orizzontale

SV = superficie verticale

GWP H70 = "Green wall panel" isolato posizionato su un'area di terreno rivestita di materiale bianco riflettente

PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density) = n° di fotoni di lunghezza d'onda 400-700 nm incidenti per unità di tempo su una superficie unitaria.

PPF (Photosynthetic Photon Flux) = n° di fotoni di lunghezza d'onda 400-700 nm incidenti per unità di tempo su una superficie nota

Durante l'intero periodo di coltura all'aperto nel GWP la biomassa di *T. suecica* è stata analizzata per verificare l'influenza della variabilità stagionale sul contenuto dei principali componenti biochimici (carboidrati, proteine, lipidi e pigmenti). Come mostrato in tabella 6.15 le proteine costituiscono il componente principale della biomassa, esse sono particolarmente elevate in estate (54%) e diminuiscono lievemente nel periodo autunno inverno (45-48%). Non si osservano differenze significative nel contenuto in carboidrati (in media 14% della biomassa) e lipidi (in media il 17% della biomassa).

Tabella 6.15 - Composizione biochimica della biomassa di *T. suecica* coltivata all'aperto nel GWP nel periodo Luglio-Dicembre . I componenti sono espressi come % della biomassa secca. I valori riportati per ciascun mese sono la media \pm DS di 2-3 campioni analizzati. I campioni sono stati raccolti in tipiche giornate serene alla fine del periodo di buio.

Componente (% peso secco)	Mese					
	Luglio	Agosto	Settembre	Ottobre	Novembre	Dicembre
Carboidrati	13,74 \pm 0,37	13,56 \pm 0,38	-	15,65 \pm 0,78	13,00 \pm 0,55	15,32 \pm 0,26
Proteine	54,52 \pm 5,25	54,58 \pm 8,30	-	45,61 \pm 1,55	48,0 \pm 1,22	48,21 \pm 1,96
Lipidi	17,22 \pm 0,41	15,79 \pm 2,16	-	16,94 \pm 0,10	17,14 \pm 0,57	17,62 \pm 0,37
Ceneri	14,52	16,07	-	21,80	21,83	18,85
Clorofilla totale	4,16 \pm 0,20	4,15 \pm 0,18	-	-	3,78 \pm 0,06	-

Valutazione delle prestazioni di colture di *T. suecica* F&M-M33 cresciute in un reattore GWP da 320 L nel periodo invernale

Nel periodo Novembre-Dicembre microalga marina *T. suecica* F&M-M33 è stata coltivata all'aperto in un GWP di lunghezza 5 m, superficie illuminata di 9,82 m² e volume utile di coltura pari a 314 L (Tabella 6.16). La sperimentazione si è svolta a Firenze presso l'area esterna dell'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi del CNR e nelle condizioni climatiche tipiche dell'Italia centrale nel periodo autunnale (Figura 6.16). Il reattore era orientato in direzione Est-Ovest (superfici illuminate del pannello rivolte Nord -Sud).

Tabella 6.16 - Caratteristiche dimensionali del GWP-5m.

	GWP - 5 m
Altezza reattore (cm)	103
Altezza livello coltura (cm)*	99
Larghezza reattore (cm)**	486
Volume - aria (L)	314 (65 L/m)
Superficie illuminata (m ²)	4.91 x 2 = 9.82
Spessore della camera di coltura (cm)	6.39
φ aria totale (L min ⁻¹)	63
φ aria unitario (L L ⁻¹ min ⁻¹)	0.20

* a reattore pieno

** reattore pieno esclusi bordi

Sono state eseguite le varie fasi per l'allestimento del bioreattore ed in particolare:

- disinfezione;
- preparazione del mezzo di coltura;
- inoculo dei bioreattori.

E' stato adottato un regime di raccolta semicontinuo con diluizione di ca il 40% ogni 3-4 giorni. Ogni giorno sono stati monitorati i principali parametri di crescita (peso secco, pH e temperatura) ed ad intervalli regolari raccolti campioni di biomassa per analisi biochimiche. Tale strategia è stata scelta per ottimizzare la fase di raccolta (minore volume a maggiore concentrazione) in quanto la sperimentazione si è svolta nel periodo autunnale, caratterizzato da ridotta radiazione luminosa e soprattutto da più basse temperature notturne che sicuramente hanno penalizzato la resa delle colture. I

parametri colturali (pH e T) erano controllati automaticamente e monitorati da un sistema di controllo digitale Biotopus II (Elos Srl,).



L'aria e la CO₂ erano fornite automaticamente nella coltura attraverso una canna e il tutto era regolato attraverso una valvola, la quale permetteva l'introduzione nella coltura della CO₂ in caso di necessità (pH > 7,8). La canna era di PVC e presentava 80 fori distanziati l'uno dall'altro 6 cm e ciascuno aveva un diametro 1 mm. Un sistema di refrigerazione attraverso acqua nebulizzata era predisposto per entrare in funzione qualora la temperatura della coltura avesse raggiunto temperature superiori ai 27 °C. Il sistema di termostatazione aveva una portata di 50L/h e una pressione di 1,5 bar. Non era invece previsto un sistema per il riscaldamento della coltura. I risultati ottenuti devono considerarsi tipici del periodo nelle condizioni climatiche dell'Italia centrale.

La crescita della coltura è stata valutata ogni giorno mediante misura del peso secco, i principali parametri di crescita erano anch'essi controllati ogni giorno, mentre lo scarico e l'archiviazione dei valori di pH e temperatura effettuato con cadenza settimanale.

I risultati ottenuti sono mostrati in figura 6.17 e 6.18. La produttività volumetrica media ottenuta nel periodo considerato è stata pari a $0,13 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$, nonostante le basse temperature notturne e la scarsa radiazione disponibile, dimostrando che la microalga *T. suecica* può essere coltivata in inverno alle nostre latitudini ed è capace di resistere a temperature di poco superiori allo 0.

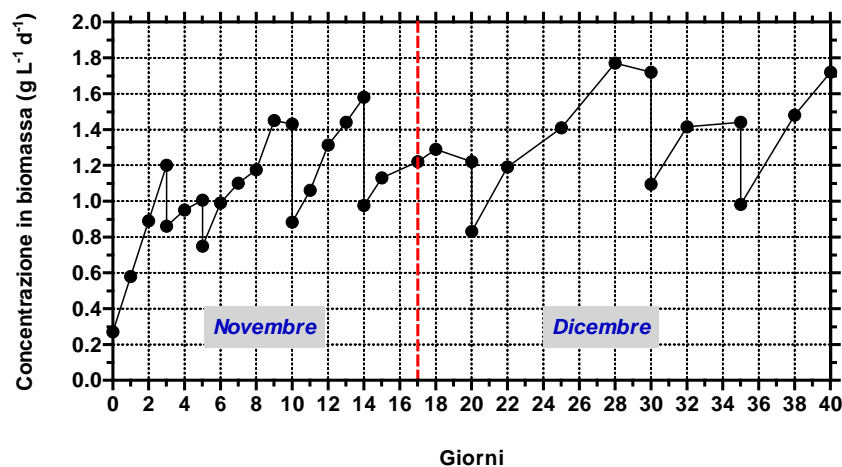


Figura 6.17 - Andamento della crescita di *T. suecica* coltivata nel GWP -5m durante in periodo invernale.

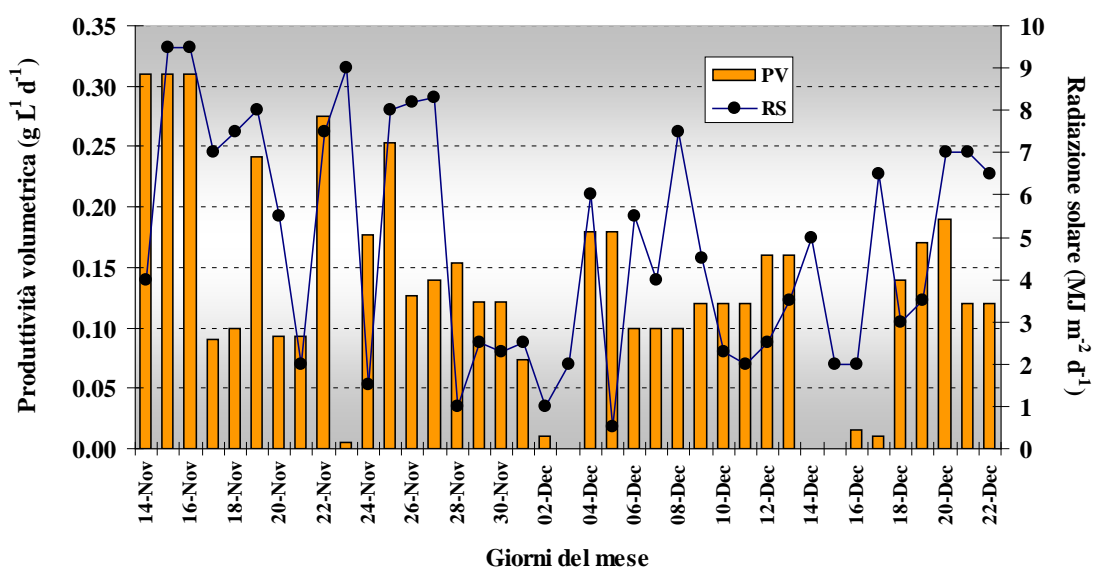


Figura 6.18 - Produttività volumetrica giornaliera e radiazione solare sulla superficie orizzontale.

Produttività volumetrica ($\text{g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$)	0,13
Radiazione solare ($\text{MJ m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$)	4,8
Temperatura minima ambiente ($^{\circ} \text{C}$)	5,33

Trattamento della biomassa algale prodotta nel GWP -5

In questa fase sono state eseguite tutte le operazioni per la raccolta della biomassa di *T. suecica* mediante centrifugazione, stoccaggio della biomassa raccolta e sua conservazione. Per la raccolta della biomassa è stato utilizzato un separatore a camere (Westfalia Separator mod. KDD 605, Germania) che allontana la quasi totalità del liquido extracellulare fornendo un prodotto microalgale (pasta) con umidità pari al 70-80%. La capacità massima di raccolta del dispositivo impiegato è di circa 1 kg di pasta (Figura 6.19).

Durante la sperimentazione sono stati processati complessivamente 1100 L, raccolti 4,32 kg di pasta fresca di *T. suecica* (pari a ca 1,3 kg di biomassa secca). La pasta è stata distribuita in capsule Petri (ca 70 g per ciascuna) ed immediatamente congelata a -20°C. Successivamente la biomassa è stata essiccata mediante liofilizzazione e conservata sotto vuoto in congelatore.



Consumo di CO₂ e sua efficienza d'uso

Le microalghe, in quanto organismi fototrofi, usano la luce e la CO₂ come principale fonte di carbonio inorganico. Poiché circa il 50% della biomassa algale è costituito da carbonio e la quantità di CO₂ presente nell'aria (0,03%) troppo bassa per sostenere crescite ottimali, un adeguato rifornimento della fonte di carbonio è di vitale importanza per il successo della coltivazione. La sperimentazione è stata avviata con una bombola di CO₂ da 20 kg. Essa è stata sostituita perché esaurita dopo 30 giorni di sperimentazione. Nello specifico sono stati necessari 20 kg di CO₂ per la produzione di 1,214 kg di biomassa secca. Ciò ha permesso di calcolare un'efficienza di utilizzo della CO₂ pari al 11,1% (Box 2).

Composizione biochimica

Durante il periodo di coltura all'aperto nel GWP da 5 m la biomassa di *T. suecica* è stata analizzata per il contenuto dei principali componenti biochimici (carboidrati, proteine, lipidi e pigmenti). Come mostrato in tabella 6.17 le proteine costituiscono il componente principale della biomassa (48%). Non si osservano differenze significative

nel contenuto in CH e lipidi. I lipidi costituiscono in media il 17% della biomassa, quindi la P in lipidi è principalmente funzione della P delle colture.

Box 2

- Biomassa prodotta = (biomassa raccolta + $C_{\text{finale}} - C_{\text{iniziale}}$ = $982 \text{ g} + 314 \text{ L} \times (1,01 \text{ g L}^{-1} - 0,27 \text{ g L}^{-1}) = 1214 \text{ g}$
- % di carbonio nella CO_2 = peso atomico del C / peso molecolare $\text{CO}_2 = 12/44 = 27,3\%$
- Carbonio contenuto in 20 kg di $\text{CO}_2 = 20 \text{ kg} \times 0,273 = 5450 \text{ g}$
- Carbonio contenuto in 1214 g di biomassa = % carbonio nella biomassa \times biomassa =
- = $1214 \times 0,5 = 607 \text{ g}$
- Efficienza = carbonio fissato/carbonio consumato = $(607 \text{ g} / 5450 \text{ g}) \times 100 = 11,1 \%$

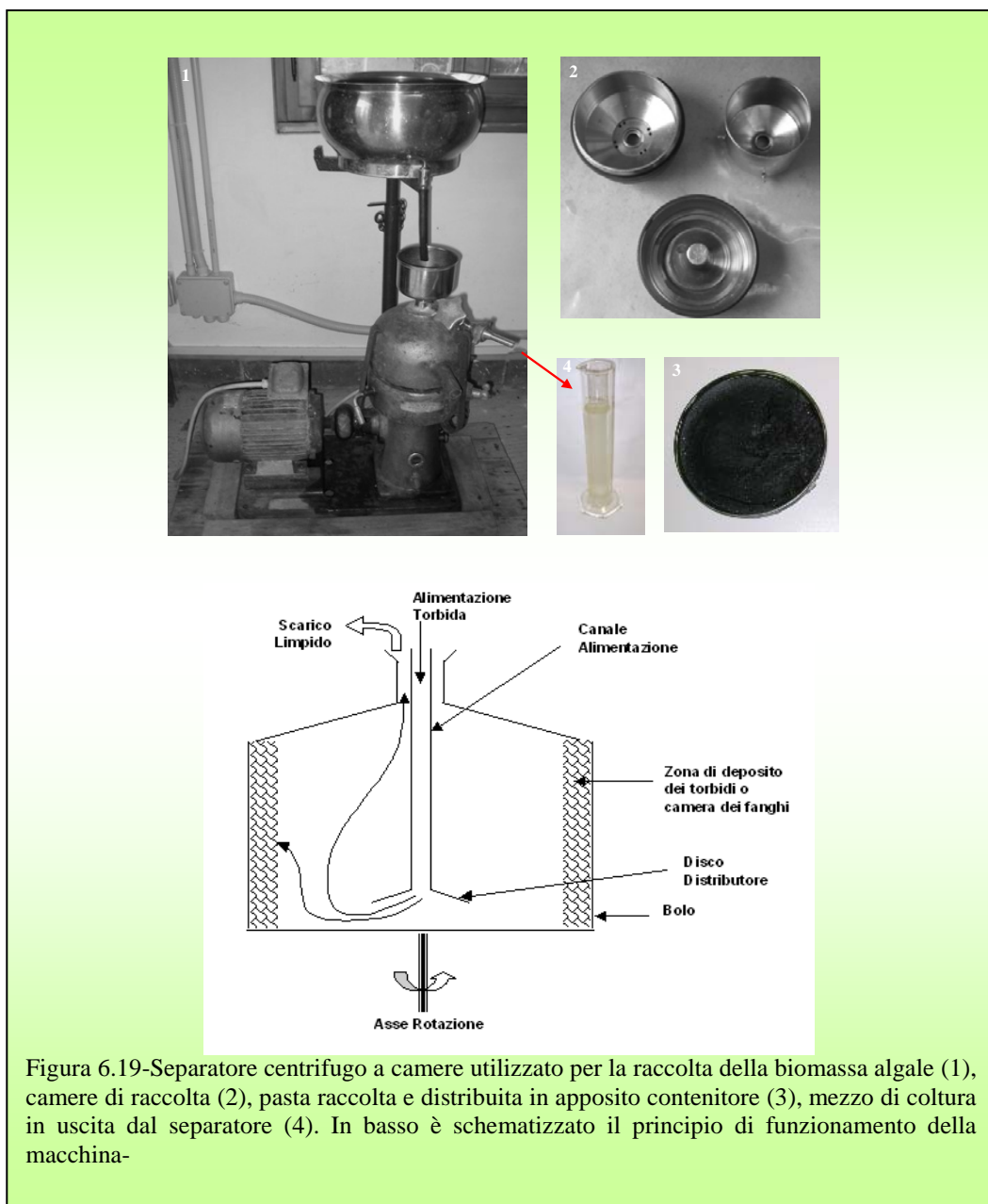


Figura 6.19-Separatore centrifugo a camere utilizzato per la raccolta della biomassa algale (1), camere di raccolta (2), pasta raccolta e distribuita in apposito contenitore (3), mezzo di coltura in uscita dal separatore (4). In basso è schematizzato il principio di funzionamento della macchina-

Tabella 5. Composizione biochimica della biomassa di *T. suecica* coltivata all'aperto nel GWP demo 5 nel periodo Novembre-Dicembre. I componenti sono espressi come % della biomassa secca. I valori riportati sono la media \pm DS di 2 campioni analizzati. I campioni sono stati raccolti in tipiche giornate serene alla fine del periodo di buio.

Componente (% peso secco)	Mese	
	Novembre	Dicembre
Carboidrati	13,0 \pm 0,55	15,3 \pm 0,26
Proteine	48,3 \pm 1,22	48,7 \pm 1,96
Lipidi	17,1 \pm 0,57	17,6 \pm 0,37
Ceneri	17,5	18,9
Fibra	-	3,4
Clorofilla totale	3,8 \pm 0,08	-
Produttività lipidi (g r ⁻¹ giorno ⁻¹)	8,6	5,3
Produttività proteine (g r ⁻¹ giorno ⁻¹)	24,1	14,7

6.6.4 .Conclusioni

- La sperimentazione ha dimostrato che *T. suecica* si presta bene per la coltura massiva in fotobioreattori GWP grazie alla sua elevata competitività, adattabilità climatica, produttività elevata (0,68 g L⁻¹ giorno⁻¹ è la produttività media ottenuta nei mesi estivi), dimensioni piuttosto grandi tanto da poter essere sottoposta a metodologie di raccolta in grado di sfruttare la sedimentazione. Inoltre la coltura all'aperto di *T. suecica* in fotobioreattori GWP è fattibile nei mesi invernali sebbene non sia conveniente alle nostre latitudini invernale in quanto le rese sono piuttosto basse e per ottenere una maggiore produttività, sarebbe necessario aggiungere un sistema di riscaldamento, cosa che comporterebbe un dispendio di energia eccessivo giustificabile nel caso di produzione di chemicals pregiati.
- *Tetraselmis* non accumula lipidi ma per il suo elevato contenuto in proteine di elevato valore biologico, in vitamine e micronutrienti essenziali ed in acidi grassi polinsaturi potrebbe rappresentare un potenziale ingrediente alternativo nella dieta animale. Per rendere fattibile l'utilizzo delle microalghe in

mangimistica (ad es. in acquacoltura) è necessario arrivare ad una produzione industriale da cui risulti un costo della biomassa non superiore a 1-1,5 €/kg. Ciò richiede un processo di coltivazione idoneo diverso da quanto comunemente adottato per altri impieghi e soprattutto uno sfruttamento della biomassa nel suo complesso e non solo per un prodotto/processo specifico. Questa microalga in effetti potrebbe offrire una biomassa pluri-uso, da destinare sia alla produzione di biodiesel che, dopo estrazione dell'olio, come fonte di composti pregiati per altri settori.

- Lo sviluppo delle biotecnologie per la coltura massiva delle microalghe dovrà essere indirizzato alla realizzazione di sistemi di coltura chiusi potenzialmente capaci di produrre biomassa in quantità elevata e a costi relativamente contenuti da soddisfare le necessità del settore mangimistico e/o bioenergetico.

6.7 Considerazioni sul bilancio energetico e costo della biomassa

La principale limitazione allo sviluppo delle biotecnologie per la coltura massiva di microalghe su scala commerciale è associata ai costi di produzione relativamente elevati e al bilancio energetico. Se la biomassa microalgale è prodotta con finalità energetiche (ad esempio per la produzione di biocombustibili) o come materia prima per la produzione di mangimi, diventa di fondamentale importanza che il Net Energy Ratio (NER) cioè il rapporto tra l'output energetico (contenuto calorico della biomassa prodotta) e l'input energetico (rappresentato dal contenuto energetico dei materiali usati per il sistema di coltivazione e l'intero impianto più l'energia necessaria per tutte le fasi del processo di coltivazione) sia maggiore di 1. Sebbene numerose indagini siano state e siano in corso su questo argomento, non c'è ancora chiarezza e i valori riportati sono piuttosto contrastanti, ma in genere non così favorevoli rispetto alla fonte fossile o ad altre risorse rinnovabili. Così come il bilancio energetico anche la valutazione dei costi (i parametri sono ovviamente correlati) dipende dagli scenari considerati fra cui in "primis": 1) tipologia di reattore; 2) specie microalgale coltivata; 3) dimensione dell'impianto; 4) materie prime utilizzate come fertilizzanti o fonte di CO₂; 5) collocazione geografica dell'impianto.

In questa tesi è stata fatta una stima approssimata dei costi di produzione della biomassa di *T. suecica* in un impianto a GWP da 1000 m² costruito con una nuova e molto più economica tipologia di reattore, cioè il GWP di seconda generazione (o GWP-II) recentemente ideato, messo a punto e testato dal gruppo del Prof Tredici del DIBA Università di Firenze (Tredici et al., 2011). Tale reattore è costituito da una pellicola trasparente in LDPE supportata da un telaio in acciaio e legno e rispetto alla tipologia di prima generazione (quella usata in questa tesi) contiene molto meno materiale ed ha un costo di ca 5€ m⁻² cioè 10 volte inferiore (Tredici, 2010). Per il calcolo dei costi abbiamo inoltre considerato: 1) una produttività di 45 t ha⁻¹ anno⁻¹ (4,5 t anno⁻¹ per l'impianto considerato e 300 giorni produttivi); 2) l'Italia meridionale come collocazione geografica; 3) biomassa concentrata per sedimentazione (non per centrifugazione); 4) biomassa non liofilizzata; 5) CO₂ da flue-gas quindi a costo zero; 6) contributo della manodopera uguale in ogni condizione.

La stima è stata fatta nelle diverse condizioni descritte nel cap. 6 per verificare se e quanto ancora siamo lontani dall'obiettivo di 1-2 €/kg e soprattutto per valutare la

significatività della riduzione apportata con le strategie adottate e studiate in questa tesi. I risultati ottenuti sono mostrati in tabella 6.18. La elaborazione condotta ha mostrato che l'utilizzo del Sosalt per la preparazione dell'acqua di mare artificiale riduce del 22% il costo della biomassa rispetto all'impiego del sale tradizionale (TMZ), mentre il refluo avicolo apporta soltanto un decremento del 3%, questo in relazione al fatto che i nutrienti sono uno dei costi che incidono meno sul costo complessivo. Inoltre dalla tabella 6.18 si può osservare che utilizzando l'acqua di mare artificiale preparata con Sosalt e refluo avicolo come fonte di azoto e fosforo, il costo della biomassa è €10,90/kg, paragonabile a quello della biomassa prodotta utilizzando acqua di mare naturale e fertilizzanti sintetici come nutrienti (€10,85/kg). Le voci che incidono significativamente sui costi di energia elettrica sono il mixing (3.780 €anno⁻¹ cioè ca il 75% del costo energetico) e la termostatazione (1.155 €anno⁻¹ cioè ca il 23% del costo energetico). La manodopera è il costo che incide maggiormente sul prezzo della biomassa in quanto rappresenta oltre il 50% dei costi di esercizio.

In conclusione mentre possiamo dire che le strategie adottate contribuiscono a ridurre i costi di produzione, quest'ultimi così come da noi calcolati sono ancora troppo elevati per gli obiettivi prefissati e se considerassimo anche il trattamento di liofilizzazione essi potrebbero ulteriormente incrementare. Da notare, tuttavia, che la stima è stata effettuata su un impianto pilota e che i costi potrebbero diminuire se riferiti ad un impianto di almeno 1 ha operativo in condizioni climatiche favorevoli (che incrementino la resa annuale) ed in particolare se si usano aree semidesertiche ed una tecnologia semplice che si basi sui principi delle colture agricole. Tuttavia al momento non è possibile prevedere di produrre biomassa ad un costo inferiore ai 5 €kg⁻¹ anche se sono in corso studi di strategie combinate che potranno effettivamente permettere di raggiungere nei prossimi anni l'obiettivo prefissato.

Tabella 6.18 - Resoconto della stima dei costi nelle diverse condizioni testate in questa tesi. Per confronto è mostrato anche il calcolo fatto nel caso di utilizzo di acqua di mare naturale.

	COSTO (€anno⁻¹)			
	AMN + N e P	AMA TMZ + N e P	AMA Sosalt + N e P	AMA Sosalt + pollina
MATERIALE				
Energia Elettrica	5.014 (12,69%)	5.014 (12,69%)	5.014 (12,69%)	5.014 (12,69%)
Mezzo di coltura	0	10.960 (20,9%)	1.600 (3,86%)	1.600 (4,02%)
Nutrienti	1.400 (3,54%)	1.400 (2,67%)	1.400 (3,38%)	0
CO₂	0	0	0	0
Sonde pH	240	240	240	240
Telo polietilene	650	650	650	650
Manodopera	25.000 (63,2%)	25.000 (47,8%)	25.000 (60,4%)	25.000 (62,9%)
Sistema di filtrazione	400	400	400	400
Altro	120	120	120	120
SUBTOTALE	32.824	43.784	34.424	33.024
Spese generali, di amministrazione e manutenzione	6.697	8.560	6.969	6.731
TOTALE COSTI ESERCIZIO	39.521	52.344	41.393	39.755
COSTI CAPITALI	9.315	9.315	9.315	9.315
Produttività impianto (kg anno⁻¹) *	4500	4500	4500	4500
COSTO PRODUZIONE 1kg DI BIOMASSA	10,85	13,7	11,27	10,90

AMA= acqua di mare artificiale; AMN= acqua di mare naturale; TMZ= tropic marine zoomix

* Per *Tetraselmis* è stata considerata una produttività media annuale di 15 g m⁻² giorno⁻¹ e 300 giorno produttivi (15 kg per 1000 m² di impianto al giorno cioè in 300 giorni 4500 kg)

CAPITOLO 7

***Isochrysis*: coltura massiva in un impianto pilota a GWP e messa a punto della procedura di gestione**

7.1 Introduzione

Classificazione, morfologia e composizione biochimica di *Isochrysis*

Isochrysis è una microalga marina appartenente al gruppo delle alghe “gialle-brune”, un gruppo eterogeneo di specie unicellulari. La classificazione più recente, proposta nel 1994 da Green e Leadbeater (Tabella 7.1) divide questi flagellati in due divisioni: *Haptophyta* e *Crysophyta*. La divisione delle *Crysophyta* comprende due classi: *Crysophyceae* e *Raphidophyceae*. La divisione delle *Haptophyta* comprende solamente la classe delle *Prymnesiophyceae*, le quali comprendono cellule con scaglie di calcite (coccoliti) sulla superficie cellulare che flagellati nudi o che possiedono scaglie organiche non mineralizzate, costituite da una matrice cellulosa e polisaccaridi peptici. Alla classe delle *Prymnesiophyceae* appartengono quattro ordini: *Isochrysidales*, *Coccosphaerales*, *Prymnesiales* e *Pavlovaes*. L’ordine delle *Isochrysidales* comprende il genere *Isochrysis*.

Isochrysis è una microalga unicellulare di forma ellissoidale (3x5 µm) e con una sottilissima e fragile parete cellulare. È dotata di due flagelli apicali generalmente della stessa lunghezza. Inoltre ha una terza struttura filiforme l’aptonema, la cui funzione non è ben nota, ma sembra abbia un ruolo come organo di ancoraggio (Boussiba et al., 1988; Qiang e Richmond, 1994).

I pigmenti che la caratterizzano sono clorofilla *a* e *c* e fra i carotenoidi la fucoxantina. Ha un buon contenuto in proteine di buona qualità (40-50% del peso secco) e in lipidi (25-30% del peso secco). Mostra un buon profilo aminoacidico, in quanto possiede il 2,6% di metionina e 6,0% di lisina, percentuale riferita agli aminoacidi totali (Brown, 1991). Questa microalga è particolarmente ricca in acidi grassi polinsaturi (PUFA) della serie n-3, in particolare l’acido docosaesaenoico (DHA, 22:6 n-3) il quale può raggiungere il 2% della biomassa secca. È anche un’importante fonte di vitamine

liposolubili (vitamina A e vitamina E o α -tocoferolo) e vitamine idrosolubili come biotina, altre vitamine del gruppo B (ac. folico, ac pantotenico, tiamina, riboflavina etc) (Coutinho et al., 2006) ed acido ascorbico (0,16-0,44 % p.s) (Brown e Miller, 1992; Van Bergeijk et al., 2010).

Tabella 7.1- Schema classificazione tassonomica di *Isochrysis*

Regno	Divisione	Classe	Ordine	Famiglia	Genere	Specie
<i>Eukaryota</i>	<i>Haptophyta</i>	<i>Primnesiophyceae</i>	<i>Coccosphaerales</i>			
			<i>Isochrysidales</i>	<i>Gephyrocapsaceae</i>		
				<i>Isochrysidaceae</i>	<i>Isochrysis</i>	<i>I. galbana</i>
						<i>I. marittima</i>
						<i>I. litorales</i>
						<i>I. aff. galbana</i> (T-ISO)
				<i>Noelaerhabdaceae</i>		
			<i>Prymnesiales</i>			
			<i>Pavlovales</i>			
	<i>Crysophyta</i>	<i>Crysophyceae</i>				
		<i>Raphidophyceae</i>				

La composizione biochimica di *Isochrysis*, come per tutte le microalghe, può variare in risposta ai fattori ambientali come l'intensità luminosa, la concentrazione di nutrienti, la fase di crescita e la temperatura. In generale, esiste una correlazione inversa tra la percentuale di PUFA nei lipidi e la temperatura (Zhu et al., 1997).

Impieghi e modalità di coltivazione

Specie selezionate di microalghe marine in quantità e di qualità adeguata sono da decenni largamente utilizzate nelle avannotterie per l'allevamento larvale di alcune specie di pesci, molluschi bivalvi e crostacei. Per alcuni di questi organismi acquatici le microalghe costituiscono l'alimento direttamente utilizzato da larve, post-larve ed anche adulti (ad es. molluschi bivalvi), mentre nel caso di pesci marini pregiati come l'orata e la spigola il fitoplancton viene impiegato come nutrimento dello zooplancton, a sua

volta usato nell'alimentazione degli stadi larvali. Solo una dozzina di specie sono comunemente utilizzate nella bivalvicoltura ed *Isochrysis* è una delle più importanti per l'alto contenuto di DHA, l'elevato valore nutrizionale, le dimensioni appropriate per essere facilmente ingerita e la parete cellulare digeribile. (Sukenik & Wahnnon, 1991; Brown, 2002; Tredici et al., 2009).

I sistemi di coltivazione tradizionalmente impiegati per la produzione di *Isochrysis* negli impianti di allevamento sono rappresentati da vasche aperte per la coltivazione all'esterno e da fotobioreattori chiusi verticali (sacchi o colonne) per la coltivazione a luce artificiale. I primi sistemi di produzione presentano importanti limitazioni quali il basso rapporto superficie/volume e quindi la bassa produttività volumetrica ($0,05-0,10 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$), la qualità scadente della biomassa algale prodotta a causa della contaminazione da parte di microrganismi indesiderati e dello scarso controllo dei principali parametri colturali, la notevole richiesta di spazio e di mano d'opera con costi di gestione proibitivi (Fulks-Main, 1991; Coutteau e Sorgeloos, 1992; Borowitzka, 1997). Per superare almeno in parte i limiti tecnici e biologici delle vasche aperte, presso gli impianti, sono stati adottati sistemi di coltura intensivi verticali (fotobioreattori chiusi) come i sacchi in polietilene (PE) trasparente saldati a caldo e sospesi ad una estremità e le cilindri verticali in vetro o fibra di vetro. Tali dispositivi hanno un diametro di 30-50 cm, possono contenere un volume di coltura compreso tra 200 e 500 L e vengono di solito illuminati artificialmente mediante lampade fluorescenti. L'insufflazione di aria compressa arricchita in CO_2 alla base del cilindro o sacco permette il rimescolamento della coltura. I sacchi di PE rappresentano il sistema di produzione più economico e ciò a causa del basso costo del materiale e della facilità di costruzione. Tuttavia, essi hanno vita breve a causa dell'adesione di materiale alle pareti (biofouling) che riduce la penetrazione della luce. In alternativa ai sacchi di polietilene si possono utilizzare cilindri rigidi trasparenti, più costosi ma molto più resistenti e riutilizzabili dopo pulitura e disinfezione. Il principale svantaggio di tutti questi sistemi è il basso rapporto S/V e quindi le basse produttività volumetriche ottenibili. Sistemi verticali ad elevato rapporto S/V sono state realizzati dal gruppo di ricerca del Prof. Tredici del Dipartimento Biotecnologie Agrarie (Università degli Studi di Firenze), si tratta di colonne anulari in plexiglass, nelle quali la coltura viene introdotta nell'intercapedine creata tra due cilindri di differente diametro disposti l'uno dentro l'altro ed incollati ad una base. Internamente può essere predisposto un sistema

di illuminazione artificiale (Chini Zittelli et al., 2003; 2006). Questa tipologia di reattore è adottato presso alcune avannotterie italiane (Panittica Pugliese Srl, Maricoltura Rosignano Solvay Srl ecc) ed istituzioni straniere (UPM, Malesia).

In acquacoltura la produzione di biomassa microalgale di alta qualità e in grandi quantità richiede un grande investimento umano ed economico. I costi di produzione della biomassa microalgale vanno dai 30 € ai 300-500 €/kg⁻¹ (p.s.) e rappresentano uno dei più alti fattori di costo (circa il 30-40% dei costi totali) negli impianti di allevamento (Tredici et al., 2009) ciò dipende dalla specie microalgale utilizzata e dal sistema di produzione utilizzato (vasche, fotobioreattori o fermentatori). Per poter ridurre i costi di produzione della biomassa si può intervenire utilizzando sistemi di coltura a basso costo caratterizzati da elevato rapporto S/V, quindi in grado di ottenere alte concentrazioni cellulari e produttività, una biomassa microalgale di buona qualità e riduzione dei tempi di gestione e quindi della manodopera.

Il ceppo utilizzato nella sperimentazione di questa tesi è *Isochrysis* sp. (T-ISO) F&M – M36 (Figura 7.1) ed è stato ottenuto dalla collezione di ceppi microalgali di Fotosintetica & Microbiologica Srl. Nel presente lavoro esso sarà indicato con la sigla T-ISO, dove T indica il luogo di isolamento (Tahiti) e ISO è l'abbreviazione di *Isochrysis*. È stato utilizzato questo ceppo in quanto ben conosciuto ed a lungo sperimentato presso il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università di Firenze, sia in laboratorio che all'aperto. Fra quelli testati esso ha mostrato essere più adatto a resistere alle condizioni di stress tipiche della coltura massiva.

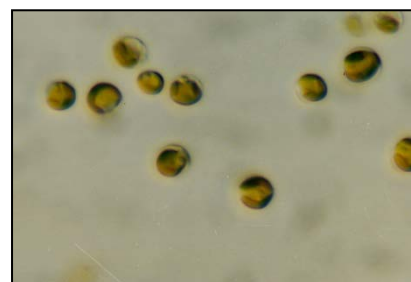


Figura 7.1. Cellule di T-ISO al microscopio (40x)

Nella presente sperimentazione è stata valutata la possibilità di coltivare T-ISO in un impianto pilota costituito da GWP di prima generazione (operativo a Camporosso presso Archimede Ricerche Srl) per produrre biomassa di qualità ed in quantità idonee per prove di alimentazione della spigola. Ciò ha richiesto la messa a punto di una strategia di gestione completamente diversa da quella adottata negli esperimenti su piccola scala che teneva conto delle necessità ed esigenze operative di un impianto industriale e la verifica di tale strategia sia in termini produttivi che per affidabilità nel lungo periodo.

7.2 Descrizione dell'impianto a “ Green Wall Panel”

L'impianto pilota di Archimede Ricerche Srl è situato a Camporosso (Imperia) in una zona collinare di coordinate: latitudine 43°50'7"N, longitudine 7°37'37"E, altezza s.l.m. 59 m (Figura 7.2 A, B). L'impianto è collocato sotto una serra di vetro apribile, avente dimensioni 30.5 m x 31.4 m ed orientata S-SO. Tale struttura impegna una superficie estesa indicativamente 1000 m² e comprende un'area fotosinteticamente attiva pari a ca 700 m² dove sono collocati i fotobioreattori “Green Wall Panel” (GWP) e le aree accessorie su cui sono posizionati serbatoi e quadri di comando/controllo per i restanti 300 m². Come mostrato nello schema di Figura 2 nella serra possono essere collocati n. 4 gruppi di 10 moduli (GWP) aventi ciascuno lunghezza 12.5 m ed altezza 1 m e disposti in file parallele ad una distanza di 1.5 m l'uno dall'altro. I moduli possono essere collegati a due a due mediante air-lift (vedi cap. 5) in modo da creare un unico sistema di volume circa 1000 L. La distanza di 1,5 m tra le file consente di evitare, nella zona geografica di riferimento, ombreggiamenti reciproci dei pannelli durante i mesi più produttivi (Aprile-Settembre). La separazione dei moduli rende possibile la coltivazione contemporanea di diverse specie microalgali con riduzione della contaminazione interspecifica. La superficie illuminata dei 40 moduli ammonta a ca 1000 m² considerando entrambe le superfici verticali dei reattori GWP ed il volume a ca 30 m³. Un settore inoculi costituito da GWP di volume crescente (da 40 a 500 L) è predisposto in ciascun settore produttivo.

Gli impianti accessori necessari al funzionamento dell'impianto (Figura 7.3) sono dislocati in aree specifiche e comprendono:

- sistema di alimentazione del mezzo di coltura;
- sistema di scarico della sospensione algale;
- sistema di agitazione della coltura;
- sistema di erogazione della CO₂,
- sistema di termoregolazione della coltura;
- strumentazione di controllo/monitoraggio dei parametri colturali

Durante la sperimentazione oggetto di questa tesi ca ¼ della serra era allestito a GWP ed il n. di reattori operativi è descritto in dettaglio nel paragrafo 7.4

Per i dettagli delle caratteristiche dei reattori GWP si rimanda al capitolo 5.



Figura. 7.2A - Collocazione geografica e visione del sito (in alto) ed impianto pilota attivo di Archimede srl (in basso).

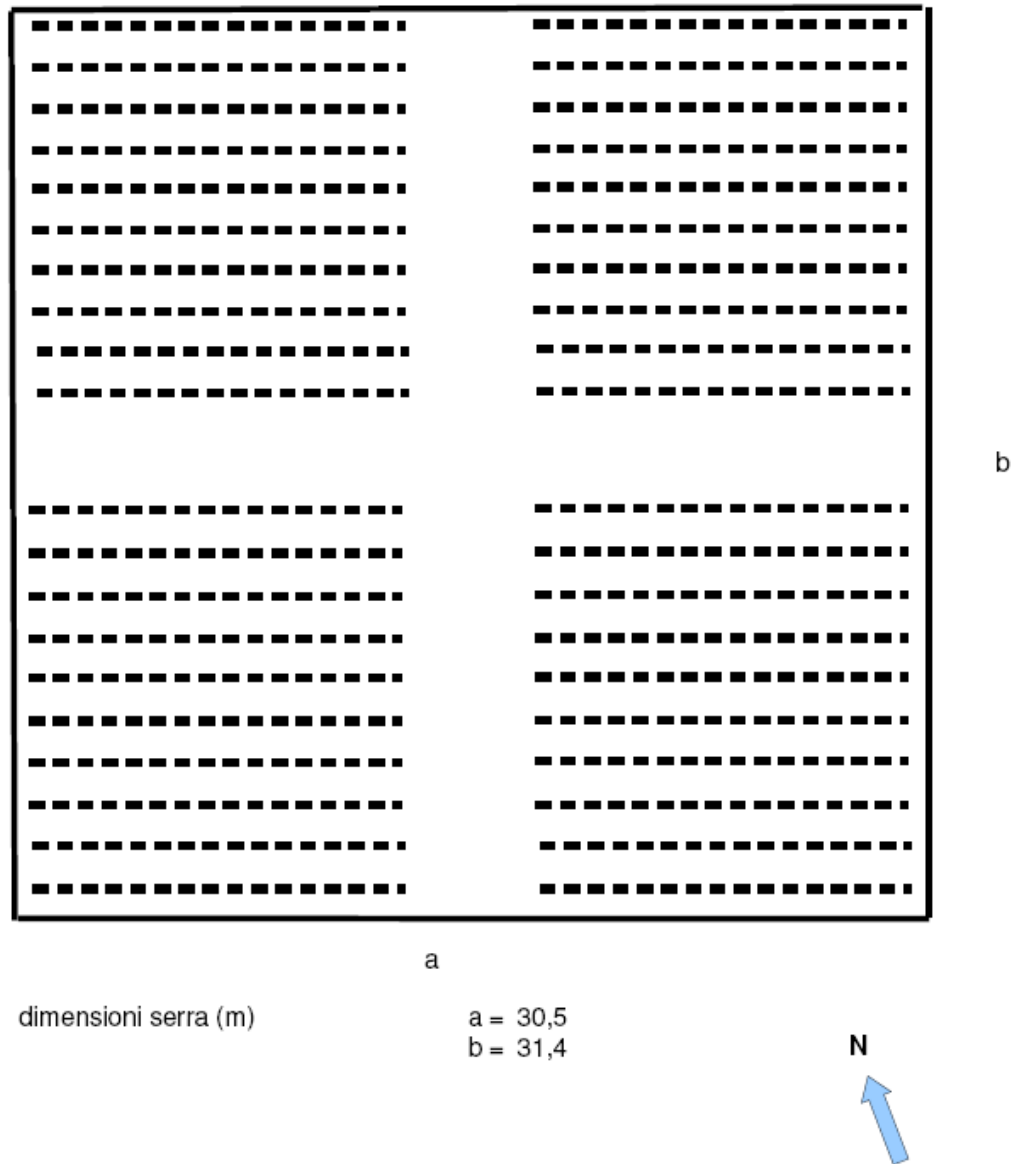


Figura 7.2B. Rappresentazione schematica dell'impianto pilota di Archimede Ricerche Srl mostrando la distribuzione dei moduli a GWP nella serra.



Figura 7.3 - Impianti accessori: A, sistema di preparazione del mezzo di coltura; B, sistema di agitazione della coltura, air-lift; C, sistema di termoregolazione della coltura.

7.3 Procedura di scaling-up e gestione delle colture

Durante tale sperimentazione è stata messa a punto una strategia di coltivazione su acqua di mare artificiale (AMA al 30% di salinità) che ha tenuto conto delle caratteristiche ed esigenze di T-ISO (fragilità e sensibilità agli stress ambientali ed alla contaminazione) e definito un protocollo di coltivazione specifico. In particolare è stata monitorata la crescita delle colture in un processo di scaling-up, da tubi “bubble tubes” con capacità di 0,6 L fino ad arrivare a fotobioreattori GWP produttivi con capacità di 1000 L (Figura 7.4). Tale processo di coltivazione consisteva nel passaggio da un sistema di coltura ad un altro avente capacità maggiore, una volta raggiunta una prestabilita concentrazione in biomassa e facendo in modo che la concentrazione di partenza nel reattore successivo non fosse inferiore a $0,3 \text{ g L}^{-1}$ o superiore a $0,6 \text{ g L}^{-1}$. Inizialmente i sistemi di coltura presenti in tale processo di scaling-up erano: 8 “bubble tubes” in vetro da 0,6 L, 2 “bubble tubes” in plexiglass da 6 L, 2 GWP da 40 L, 3 GWP da 250 L, 1 GWP da 500 L e 3 GWP produttivi da 1000 L.

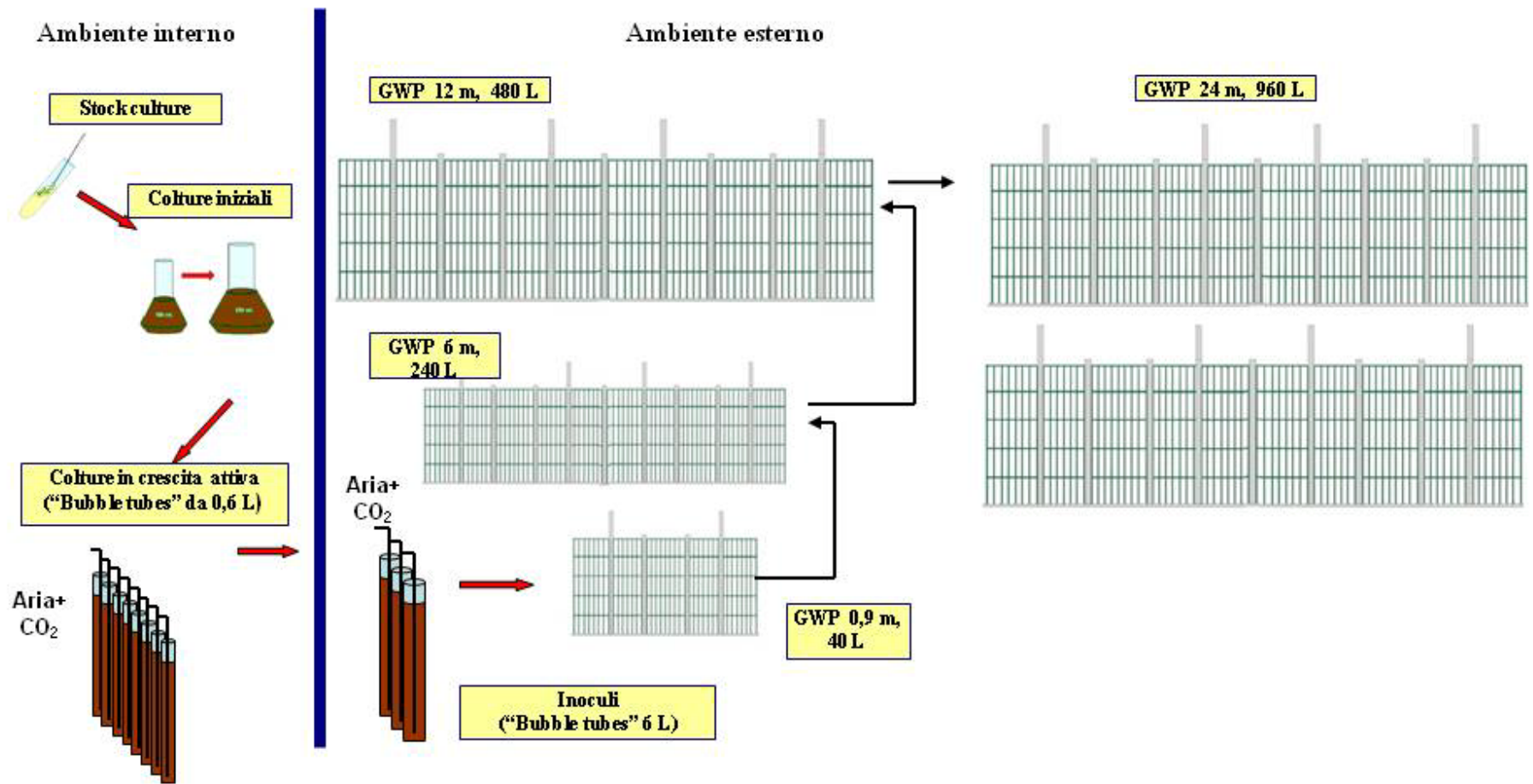


Figura7.4 - Processo di scaling-up utilizzato nell'impianto pilota di Archimede Srl da "Bubble tubes" da 0,6L a GWP 1000.

Successivamente è stata apportata una modifica al processo di produzione eliminando il GWP-500 ed introducendo un ulteriore GWP da 1000 L. Le misure dei diversi sistemi di coltura utilizzati sono mostrate in Tabella 7.2. Le colture nei tubi in plexiglass e nei GWP erano collocate all’aperto sotto serra, invece i “bubble tubes” da 0,6 L erano gestiti in laboratorio a luce artificiale.

Tabella 7.2 - Caratteristiche dimensionali dei Green Wall Panel utilizzati. I valori della superficie illuminata si riferiscono ad entrambe le superfici (S-E/N-O) dei GWP.

GWP	Altezza coltura (+ aria) (m)	Altezza coltura (- aria) (m)	Lunghezza GWP (m)	Volume coltura (L)	Volume unitario coltura ($L m^{-1}$)	Spessore coltura (cm)	Sup. Illuminata (m^2)
GWP 40-2	1,01	0,98	0,98	39	39,8	3,94	1,98
GWP 40-3	0,97	0,95	0,90	39	43,3	4,46	1,75
GWP 250-1	0,99	0,98	6	240	40	4,02	11,9
GWP 250-2	1	0,99	6,03	240	39,8	3,97	12,1
GWP 250-3	1,01	0,99	6,03	240	39,1	3,93	12,23
GWP 500-1	0,91	0,89	12,4	480	38,8	4,41	22,7
GWP 1000-1	0,96	0,95	25	960	38,4	4	48
GWP 1000-2	0,98	0,97	24,7	930	37,7	3,83	48,6
GWP 1000-3	0,96	0,95	25	960	38,4	3,97	48,3
GWP1000-4	1,01	1	25	960	39,4	3,83	50,1

“Bubble tubes” da 0,6 L

L’inoculo era prodotto in laboratorio in 8 “bubble tubes” (Figura 7.5), tubi di vetro di diametro 5 cm, altezza 50 cm e capacità 0,6 L. Questi sistemi di coltura erano diluiti del 50% due volte alla settimana al raggiungimento di una concentrazione di $1,5 g L^{-1}$ e la coltura ottenuta dalla diluizione era utilizzata come inoculo per i tubi da 6 L. Questi “bubble tubes” erano esposti a luce artificiale fornita da 6 lampade al neon (Osram DL58W/865) ad una intensità progressivamente crescente, in quanto subito dopo la diluizione era accesa una sola lampada e poi nei giorni successivi erano accese anche le altre due. In Tabella 7.3 è riportata l’intensità luminosa media alla quale venivano esposte le colture.

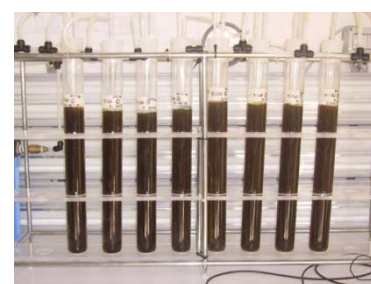


Figura 7.5. “Bubble tubes” utilizzati per produrre l’inoculo.

Tabella 7.3. Intensità luminosa alla quale erano esposti progressivamente i “bubble tubes”. I valori riportati rappresentano la media \pm ds di 3 misure fatte a differenti altezze di ciascun tubo.

Intensità luminosa (PAR) ($\mu\text{moli fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	
1 lampada al neon	71,68 \pm 27,89
2 lampade al neon	160,72 \pm 30,84
3 lampade al neon	246,96 \pm 24,12

Tubi “bubble tubes” da 6 L

I “bubble tubes” con capacità di 6 L e diametro 10 cm erano in plexiglas e collocati sotto serra a luce natural (Figura 7.6). Erano inoculati con 2,4 L di coltura più 2,5 L di AMA (acqua di mare artificiale) e i nutrienti N e P erano reintegrati per una crescita di 2 g L^{-1} per il volume totale. Dopo tre giorni era aggiunto del mezzo fresco e il volume della coltura portato a 6 L. Complessivamente la coltura cresceva per 4-5 giorni, finché non raggiungeva una concentrazione superiore ad 1 g L^{-1} e quindi utilizzata per inoculare il GWP 40.



Figura 7.6 - “Bubble tubes” da

GWP-40

I GWP- 40 avevano una capacità di 39 L, inizialmente venivano inoculati con 6 L di coltura proveniente dai tubi in plexiglass e 10 L di AMA, le reintegrazioni dei nutrienti N e P erano fatte per una crescita di 1 g L^{-1} (Figura 7.7). Quando la coltura raggiungeva una concentrazione di $0,8 - 1 \text{ g L}^{-1}$, veniva portata al volume finale di 39 L. Il primo giorno il fotobioreattore veniva ombreggiato in modo che la troppa luce non danneggiasse la coltura a bassa concentrazione.



Figura 7.7 - GWP-40, nella foto a sinistra quando viene inoculato, in quella a destra quando viene successivamente portato a volume.

GWP-250

I GWP-250 avevano una capacità di 240 L, erano inoculati con 39 L di coltura proveniente dal GWP-40 e 100 L di AMA (Figura 7.8). Le reintegrazioni dei nutrienti erano per 1 g L^{-1} di crescita. Quando la concentrazione arrivava tra $0,7-0,8 \text{ g p.s. L}^{-1}$ veniva aggiunta AMA fino a raggiungere i 240 L e le reintegrazioni dei nutrienti erano per 1 g L^{-1} di crescita considerando tutto il volume. Anche in questo caso i reattori erano ombreggiati per acclimatare la coltura.



Figura 7.8 GWP-240, nella foto a sinistra quando viene inoculato, in quella a destra quando viene successivamente portato a volume.

GWP-500

All'inizio nell'impianto era presente un solo fotobioreattore da 480 L (Figura 7.9), il quale veniva inoculato con una delle colture provenienti dai GWP-250 e portato subito a volume finale. Le reintegrazioni erano fatte per 1 g L^{-1} di crescita. Il primo giorno la coltura veniva ombreggiata. Tale GWP è stato successivamente eliminato in quanto la coltura cresceva solo per un giorno per essere subito utilizzata come inoculo per il GWP-1000.



Figura 7.9. GWP-500 a regime.

GWP-1000

I GWP-1000 avevano una capacità media di 960 L ed erano formati da due GWP-500 collegati mediante sistema air-lift (Figura 7.10) che oltre a permettere il collegamento delle due unità incrementava il mixing della coltura. Inizialmente venivano inoculati con i 480 L di coltura, ad una concentrazione di $1,2 \text{ g L}^{-1}$, provenienti dal GWP-500 e 520 L di AMA e reintegrati con i nutrienti per 1 g L^{-1} di crescita. Una volta che il GWP-500 è stato eliminato il GWP-1000 veniva inoculato con 240 L



Figura 7.10 - GWP-1000 con il collegamento air-lift.

provenienti dai GWP-250 quando in quest'ultimo la concentrazione arrivava a $1,5 \text{ g L}^{-1}$. Il GWP-1000 veniva poi portato a volume con AMA, le reintegrazioni dei nutrienti N e P erano per $1,5 \text{ g L}^{-1}$ di crescita.

7.4 Materiali e metodi

Le colture di T-ISO erano cresciute su acqua di mare artificiale (AMA) arricchita di nutrienti del mezzo *f* (vedi Capitolo 4).

I parametri colturali, temperatura e pH erano controllati e monitorati da sistemi di controllo. Nel caso della temperatura la sonda per misurare la temperatura della coltura si trovava solo in un GWP. Durante il giorno la temperatura impostata era 28°C , se questa veniva superata dell'acqua fredda proveniente da un collettore raffreddava le colture passando all'interno di serpentine in acciaio inossidabile di spessore $1,5 \text{ mm}$ alloggiare nelle colture e disposte in parallelo. Una valvola a tre vie permetteva il passaggio di acqua fredda, controllandone la portata. Il raffreddamento era effettuato con acqua di falda, la cui temperatura era compresa tra 12 e 17°C . La notte la coltura era lasciata raffreddare spontaneamente, oscillando così tra i 17°C e 22°C in funzione della temperatura ambiente

Il pH era mantenuto a $7,85 \pm 0,05$, all'aumentare del pH e al superamento dei $7,90$ veniva insufflata CO_2 attraverso diffusori posti nella coltura in modo da abbassarlo. Ciascun reattore aveva il suo controllo.

Ogni giorno erano effettuate le seguenti misure:

- misura della concentrazione della coltura mediante determinazione del peso secco (vedi Capitolo 4)
- osservazioni al microscopio per controllare lo stato della coltura e la eventuale presenza di contaminazione

Durante il periodo di sperimentazione sono state inoltre eseguite:

- carica batterica della biomassa microalgale;
- misure della concentrazione dell'ossigeno disciolto erano svolte con Ossimetro a microprocessore OXY 323 con elettrodo polarografico Clark-type Cellox 325 (WTW, Germany);
- misure della luce incidente sui GWP-1000 produttivi, usando un sensore Li-Cor modello LI-190 SB connesso ad un quantum/ radiometer/ photometer modello

- LI-185 B (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). Le misure sono state fatte su tre altezze della coltura da terra (23, 60 e 94 cm) ed in tre punti equidistanti lungo il reattore. Le misure erano fatte ogni ora su entrambe le facce del fotobioreattore;
- analisi della composizione biochimica della biomassa (carboidrati, lipidi, proteine e pigmenti).

7.5 Risultati

Di seguito è descritto l'andamento della crescita delle colture di T-ISO durante il processo di scaling-up che è stato seguito in dettaglio nel periodo luglio-agosto 2010. Nello stesso periodo con i dati raccolti giornalmente sono state calcolate le produttività volumetriche medie dei GWP-40, GWP-250 e GWP-1000 e per quest'ultimi anche la produttività per superficie illuminata e quella areale e la efficienza fotosintetica.. La biomassa raccolta periodicamente mediante centrifugazione ed essiccata mediante liofilizzazione è stata analizzata e dalla composizione biochimica valutato il suo valore nutrizionale. I dati raccolti nel corso di tre anni (2010-2012) hanno permesso di valutare la capacità produttiva dell'impianto pilota a GWP nel lungo periodo.

7.5.1 Andamento della crescita durante il processo di scaling-up

In Figura 7.11 è mostrato l'andamento della crescita di T-ISO coltivata nell'impianto pilota a GWP di Camporosso durante il periodo estivo (1 luglio- 6 agosto 2010). Inizialmente veniva utilizzato come penultimo passaggio un GWP-500, poi successivamente al posto del GWP-500 è stato introdotto un quarto GWP-1000. Tale modifica si è resa necessaria in quanto è stato osservato che la coltura cresceva nel reattore da 500 L solo per un giorno e ciò richiedeva molta più manodopera per il trasferimento nel reattore produttivo con maggiore possibilità di contaminazione. La Figura 10 mostra le varie fasi delle curve di crescita ottenute nei due periodi. I punti di ciascuna curva sono ottenuti dalla media di quattro valori di concentrazione, misurati negli stessi reattori durante quattro scaling-up separati e sfalsati temporalmente.

La prima fase (fase A) era condotta in laboratorio a luce artificiale ed aveva lo scopo di produrre, in condizioni strettamente controllate, l'inoculo per lo start-up delle colture all'aperto. Erano utilizzati 8 "bubble tubes" da 0,6 L dove la coltura era fatta crescere in batch per 3 giorni fino a raggiungere una concentrazione in biomassa di circa di 1,5 g L⁻¹

¹, dopodiché i “bubble tubes” venivano diluiti del 50% ed i 2,4 L di coltura ottenuti dalla diluizione utilizzati per inoculare un “bubble tube” da 6 L presente in serra (fase B). Tale reattore aveva un volume iniziale di ca 5 L (inoculo con aggiunta di mezzo di coltura fresco e reintegrato) e una concentrazione di partenza pari a 0,8 g L⁻¹. Nel “bubble tube” la coltura era fatta crescere in batch per 3 giorni, poi era diluita fino a raggiungere il volume finale (6 L) e fatta crescere finché la concentrazione non era superiore ad 1 g L⁻¹ (di solito era sufficiente 1 giorno). I 6 L di coltura del “bubble tube” venivano quindi utilizzati per inoculare il primo GWP cioè il GWP-40 (fase C) a cui erano aggiunti 10 L di mezzo di coltura in modo da ottenere una concentrazione di partenza compresa tra 0,5 - 0,6 g L⁻¹. La coltura era fatta crescere fino ad una concentrazione di 0,8 g L⁻¹, quindi diluita per raggiungere il volume finale di 39 L. La coltura cresceva per altri 3 giorni in batch fino al raggiungimento di una concentrazione di circa 1 g L⁻¹, dopodiché tutto il volume veniva utilizzato per inoculare il GWP-250 (fase D), a cui erano aggiunti 100 L di mezzo per ottenere una concentrazione di partenza di 0,3 g L⁻¹. Raggiunti 0,8 g L⁻¹ la coltura era diluita in modo da raggiungere il volume finale di 240 L. Nella prima sperimentazione al raggiungimento di circa 1 g L⁻¹, tutta la coltura del GWP-250 veniva usata per inoculare il GWP-500 (fase E) nel quale la coltura cresceva per un giorno fino al raggiungimento di 1 g L⁻¹ e poi tutti i 480 L erano utilizzati per inoculare il GWP-1000 (fase F) nel quale la coltura cresceva in batch per 6 giorni fino a raggiungere una concentrazione di ca 1,7 g L⁻¹. Nella seconda sperimentazione la coltura del GWP-250 veniva fatta crescere fino ad una concentrazione maggiore (1,5 g L⁻¹), quindi utilizzata per inoculare direttamente il GWP-1000 (fase F) con una concentrazione di partenza pari a 0,3 g L⁻¹. Anche in questo caso la coltura cresceva per 6 giorni in batch fino a raggiungere una concentrazione di 1,6 g L⁻¹. In entrambe le sperimentazioni alla fine dei 6-7 giorni di crescita in batch tutta la biomassa del GWP-1000 veniva raccolta mediante centrifugazione, il reattore era lavato, disinfettato e preparato per un altro ciclo produttivo.

Ogni ciclo produttivo completo richiedeva 24-25 giorni, tuttavia la tecnica di produzione prevedeva uno sfalsamento temporale di 4 cicli produttivi in modo che ogni settimana era possibile effettuare la raccolta di 3-4 GWP-1000. Durante la sperimentazione le produttività volumetriche ottenute nei fotobioreattori non produttivi, sono state mediamente di $0,22 \pm 0,14$ g L⁻¹giorno⁻¹ nel GWP-40 e di $0,26 \pm 0,12$ g L⁻¹giorno⁻¹ nel reattore GWP-250.

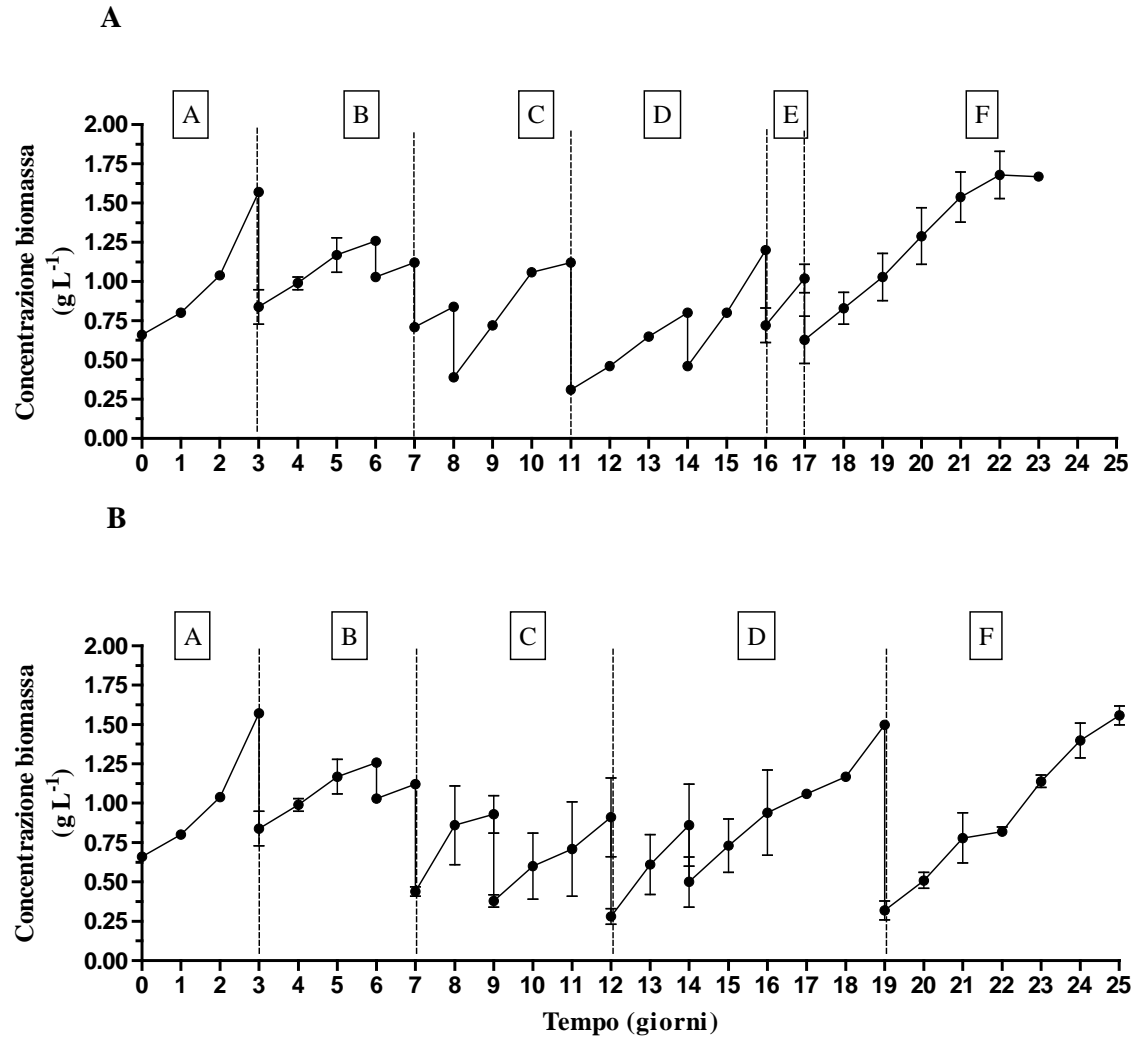


Figura 7.11 Curve di crescita di T-ISO da “bubble tubes” a GWP-1000 ottenute nel periodo estivo: **(A)** utilizzando come penultimo passaggio il GWP-500, **(B)** senza GWP-500. Ciascuna punto sulla curva di crescita è la media \pm ds di quattro valori di concentrazione misurati negli stessi reattori durante quattro scaling- up separati sfalsati temporalmente. Le lettere indicano i differenti sistemi di coltura utilizzati con il rispettivo settore di curva di crescita sottostante. A: “Bubble tubes” da 0,6 L; B: “Bubble tubes” da 6 L; C: GWP- 40; D: GWP-250; E: GWP-500; F: GWP-1000.

Le produttività volumetriche e le produttività areali ottenute nei fotobioreattori produttivi GWP-1000 durante le due sperimentazioni, non hanno mostrato differenze significative ($P < 0,05$) ed i valori medi sono stati in entrambi i casi $0,21 \text{ g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$ e $5,3 \text{ g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$, rispettivamente. I valori medi della concentrazione in biomassa alla raccolta e delle produttività ottenute dai GWP-1000 in tutto il periodo di sperimentazione sono riportati in Tabella 7.4. La produttività areale per unità di superficie di impianto è stata di poco superiore ai $5 \text{ g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$, piuttosto bassa rispetto a quella ottenuta nello stesso reattore con altre microalghe in diversa collocazione geografica (Tredici et al., 2010). Considerando che nel periodo luglio-agosto a Camporosso (sede impianto) la radiazione globale media sulla superficie orizzontale è pari a $22 \text{ MJ m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$ (fonte PVGIS: Photovoltaic Geographical Information System) e che la serra la riduce del 15%, ogni m^2 di superficie fotosintetica riceve $18,7 \text{ MJ giorno}^{-1}$ pari a circa $8,4 \text{ MJ}$ giornalieri di radiazione fotosinteticamente attiva (PAR). Ne risulta una efficienza di conversione molto bassa (1.45%)

Tabella 7.4 - Parametri di crescita delle colture di T-ISO cresciute nel GWP-1000. Sono mostrati i valori medi \pm ds con (n=6) per la concentrazione e densità areale alla raccolta e (n=11) per produttività volumetrica, produttività per superficie illuminata e areale.

Parametro	GWP-1000
Concentrazione alla raccolta (g L^{-1})	$1,64 \pm 0,15$
Densità areale alla raccolta ^{a)} (g m^{-2})	$63,08 \pm 5,82$
Produttività volumetrica (PV) ($\text{g L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$)	$0,208 \pm 0,077$
Produttività per superficie illuminata di reattore ^{b)} (PSI) ($\text{g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$)	$8,02 \pm 2,96$
Produttività areale ^{c)} (PA) ($\text{g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$)	$5,35 \pm 1,98$
Efficienza fotosintetica (EF) (% nel PAR)	1,45

^{a)} calcolata per m^2 di superficie di reattore illuminata dalla radiazione solare diretta

^{b)} riferita esclusivamente alla superficie illuminata dalla radiazione solare diretta

^{c)} calcolata per m² di impianto (OAP)

La radiazione incidente sulla superficie del GWP-1000 è stata misurata il 13 luglio 2010 in una tipica giornata serena (Figura 7.12).

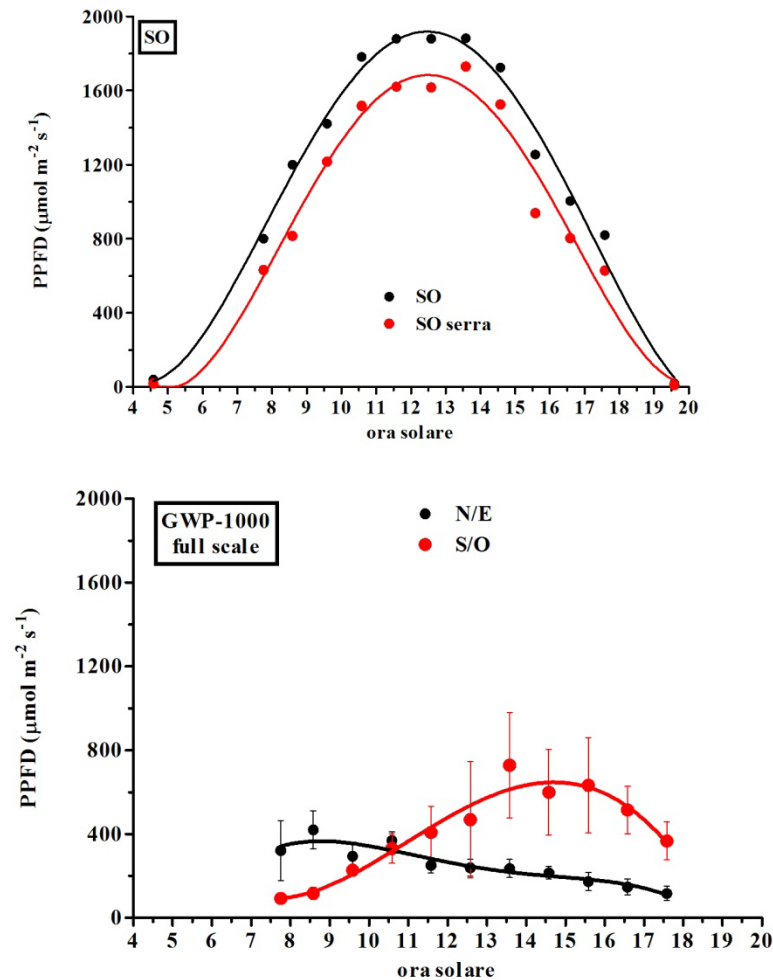


Figura 7.12 - Andamento della radiazione solare (PAR) misurata sulle superfici del GWP-1000 in una tipica giornata serena di luglio (13 luglio). Per confronto è mostrata anche radiazione solare incidente sulla superficie orizzontale fuori e dentro la serra. Lo schema di misura della radiazione sul GWP è stato descritto nel paragrafo 7.4.

E' noto che in estate la superficie verticale riceve, rispetto all'orizzontale, una minore quantità di luce (circa il 40-50%). La differenza si attenua man mano che il sole si abbassa sull'orizzonte ed in autunno e inverno la superficie verticale rivolta a sud riceve una quantità di radiazione significativamente superiore a quella della superficie orizzontale (SO). Nel nostro caso i GWP non erano perfettamente orientati a sud, si

trovavano sotto serra e ricevevano per m² di superficie di pannello una quantità di luce pari al 27% di quella ricevuta dalla SO (Tabella 7.5).

Tabella 7.5 - Radiazione solare (PAR) intercettata dalla superficie orizzontale (fuori ed all'interno della serra) e dalle superfici del GWP-1000 il 13 luglio 2010. I dati si riferiscono alle coordinate geografiche di Camporosso (sede impianto). Sono anche mostrate la PV e l'EF (PAR) ottenute il 13.luglio 2010 considerando sia la radiazione intercettata dal GWP (EF1) che quella sulla SO (EF2).

	PPFD ($\mu\text{moli m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$)	PPF (moli giorno ⁻¹)
SO	52.8	-
SO in serra	44.2	-
GWP-1000 full-scale		
N/E	8.99	224,8
S/O	15.25	396,3
TOTALE	12.12	621,1 (=135 MJ)
PV GWP-1000 (g L ⁻¹ giorno ⁻¹)		
	0,26	-
EF1 (%) del reattore	4,3	
EF2 (%) dell'impianto	1,6	

SO = superficie orizzontale

SV = superficie verticale

GWP-1000= "Green wall panel" full-scale

PPFD (Photosynthetic Photon Flux Density) = n° di fotoni di lunghezza d'onda 400-700 nm incidenti per unità di tempo su una superficie unitaria.

PPF (Photosynthetic Photon Flux) = n° di fotoni di lunghezza d'onda 400-700 nm incidenti per unità di tempo su una superficie nota

La differenza nei valori di efficienza fotosintetica calcolata con la radiazione intercettata dal GWP (EF1, efficienza relativa ai fotobioreattori) e con quella ricevuta dalla SO della serra (EF2, efficienza relativa alla serra) potrebbe essere dovuta al fatto il GWP intercetta una quantità di luce inferiore a quella che incide sulla SO, parte di quest'ultima colpisce il suolo non occupato dai reattori ai quali, tuttavia, arriva parte di quella riflessa. Importante è sottolineare che i GWP non si ombreggiavano mai tra di loro in quanto erano distanziati l'uno dall'altro di 1,5 m, tuttavia erano soggetti a ombre

della struttura portante della serra come mostrato in figura 7.13 e ad un minor contributo della radiazione riflessa a causa del suolo (bianco) ombreggiato.



Figura 7.13. Faccia S/O di un GWP-1000 sul quale si vede l'ombra della struttura della serra alle h 14:30 (ora solare).

Da notare che in piena estate le colture nei GWP-1000 produttivi hanno lavorato durante il batch ad una densità areale compresa fra $12\text{-}24\text{ g m}^{-2}$ (start) e 60 g m^{-2} (alla raccolta), corrispondenti ad una concentrazione volumetrica di $0,3\text{-}0,6\text{ g L}^{-1}$ e $1,6\text{ g L}^{-1}$. Come mostrato in Figura 7.14 non esiste una correlazione lineare fra resa in biomassa e densità areale. Tuttavia, colture cresciute densità areali elevate ($50\text{-}60\text{ g m}^{-2}$) sono state meno produttive.

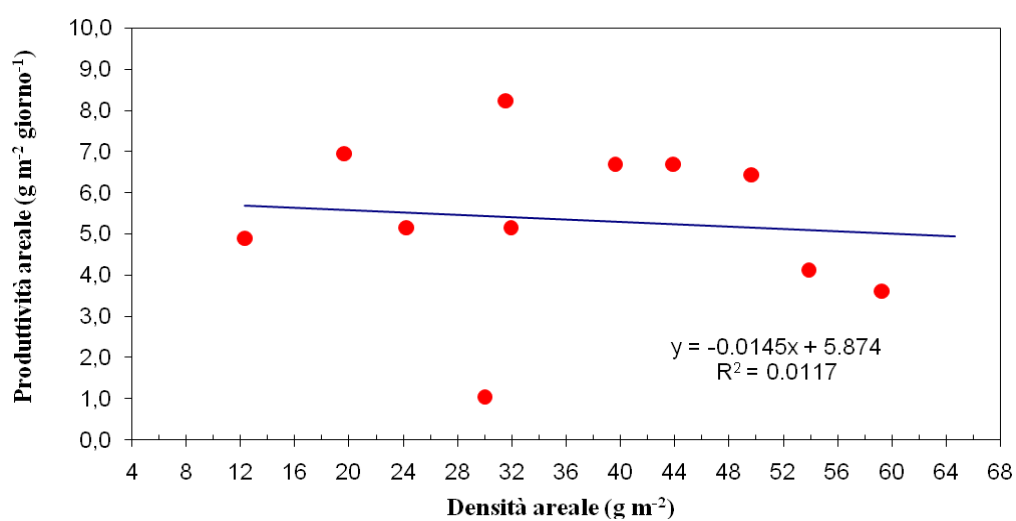


Figura 7.14 - Correlazione fra resa in biomassa in funzione della densità areale.

7.5.2 Andamento dei parametri colturali durante la produzione della biomassa di *Isochrysis* sp. (T-ISO) F&M-M36

Durante la coltivazione di questa microalga sono stati misurati e monitorati alcuni dei parametri colturali: pH, temperatura e ossigeno disciolto. In figura 7.15 è mostrato l'andamento del pH e della temperatura di una coltura cresciuta in un GWP-1000 durante una tipica giornata serena (13 luglio 2010). Per quanto riguarda il pH, i picchi verso il basso (indicanti oscillazioni fra 7.8 e 7.4) corrispondevano all'insufflazione della CO₂ necessaria per la correzione del pH. Tali picchi erano più concentrati nelle ore di luce e precisamente tra le ore 8 e le 19 (orario solare). La temperatura della coltura aumentava al mattino parallelamente all'incremento della radiazione luminosa fino a raggiungere valori di 22-24 °C, tali valori erano mantenuti costanti fino alle h 18:00 dal sistema di termostatazione. Di notte la temperatura raggiungeva i 17-20 °C e non era attuato nessun controllo.

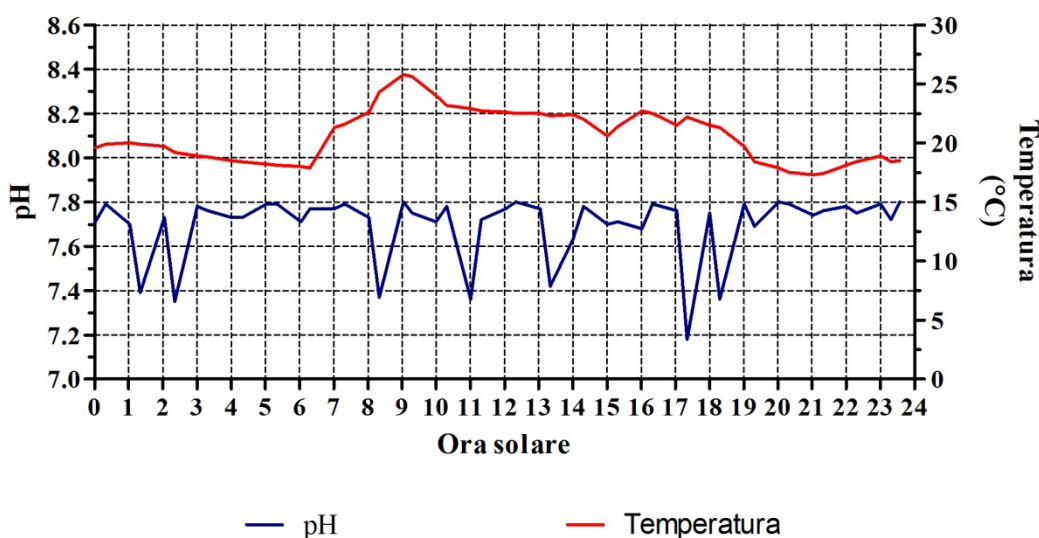


Figura 7.15 - Andamento del pH e della temperatura nella coltura di T-ISO cresciuta in un GWP-1000. il 13 Luglio 2010.

L'andamento dell'ossigeno disciolto nella coltura di T-ISO (Figura 7.16) è stato misurato in un GWP-1000 produttivo il 21 luglio 2010, tipica giornata serena estiva. I valori erano in genere piuttosto bassi (mai superiori ai 13 mg L⁻¹) nell'arco di tutta la giornata a conferma del fatto che il reattore GWP garantisce un buon mass transfer per l'O₂, anche in dispositivi di dimensioni considerevoli, grazie al suo sistema di mixing combinato "Bubble Column" + "Air-lift". Il grafico mostra inoltre un netto (quanto

inspiegabile) decremento della concentrazione di ossigeno (da 11 mg L^{-1} a ca 8 mg L^{-1}) tra le 10:00 e le 12:00 (orario solare) periodo in cui la radiazione incidente sul reattore incrementa gradualmente pur non raggiungendo il suo valore massimo.

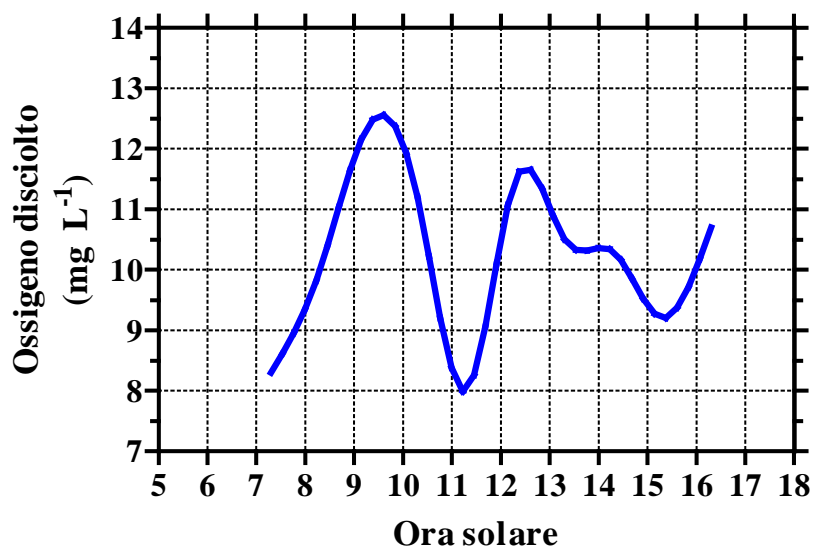


Figura 7.16. Andamento dell'ossigeno disciolto nella coltura di T-ISO cresciuta nel GWP-1000. Le misure sono state effettuate il 21 luglio 2010.

7.5.3 Raccolta ed essiccazione della biomassa di *Isochrysis* sp. (T-ISO) F&M-M36

La biomassa di T-ISO prodotta nei GWP-1000 era raccolta 3-4 volte a settimana dopo 6/7 giorni di crescita in batch. La biomassa era raccolta mediante un separatore centrifugo a camere (Westfalia Separator mod. KA6) all'interno delle quali si accumulava la biomassa microalgale sotto forma di pasta (massima capacità di raccolta 5 kg). Il processo di raccolta ed imballaggio della biomassa richiedeva un tempo di circa 2-3 ore. La coltura era pompata dal reattore alla centrifuga dove la biomassa umida si accumulava concentrata nelle camere di raccolta mentre il mezzo di coltura fuoriusciva dalla centrifuga.. La pasta così ottenuta presentava una consistenza gelatinosa (tipica di questa microalga) ed un contenuto in biomassa secca pari a 200-250 g/kg (umidità 75-80%); essa veniva recuperata dalle camere, suddivisa in contenitori di alluminio, congelata a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e successivamente liofilizzata (Figura 7.17).

Durante il periodo della sperimentazione sono stati prodotti 82 kg di biomassa fresca, pari a 20 kg di biomassa liofilizzata.

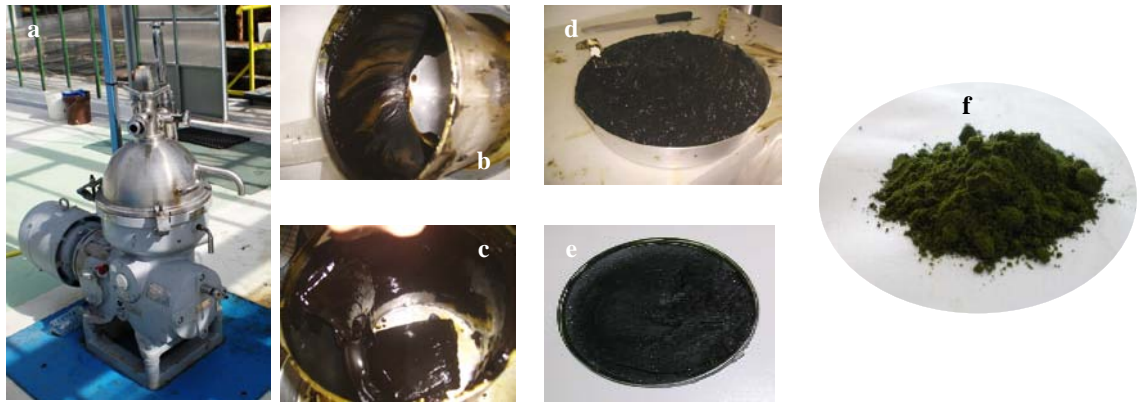


Figura 7.17 - Processo di raccolta e conservazione della biomassa di T-ISO. a) separatore centrifugo utilizzato; b) e c) pasta di T-ISO presente nelle camere della centrifuga; d) biomassa fresca raccolta; e) biomassa congelata; f) biomassa liofilizzata.

La pasta raccolta e la biomassa liofilizzata erano regolarmente osservate al microscopio per verificare lo stato delle cellule, la presenza di aggregati e batteri (Figura 7.18). Dopo la raccolta le cellule di T-ISO non erano più mobili, apparivano in gran parte deformate ma con contenuto intracellulare regolare e si presentavano in aggregati cellulari di dimensioni considerevoli. Dopo il congelamento e la liofilizzazione le cellule apparivano maggiormente danneggiate ed i grumi erano ancora più grossi. Sebbene sia risaputo ed appurato che la centrifugazione ed il congelamento danneggino le fragili cellule di T-ISO il prodotto finale era discreto in termini di integrità cellulare, pigmentazione/colore ed odore. La sua qualità nutrizionale sarà discussa nel successivo paragrafo.

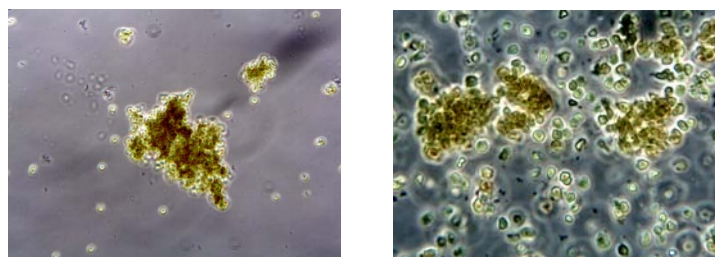


Figura 7.18 - Foto al microscopio della pasta di T-ISO dopo la centrifugazione (a sinistra, 10x) e della biomassa liofilizzata (a destra, 40x).

7.5.4 Composizione biochimica e qualità microbiologica della biomassa di *Isochrysis* sp. (T-ISO) F&M-M36

La composizione biochimica (composizione centesimale, contenuto e profilo degli acidi grassi e tenore in pigmenti) della biomassa di T-ISO prodotta nel periodo estivo in GWP-1000 e processata come precedentemente descritto, è mostrata in tabella 7.6. Le proteine costituivano il componente principale della biomassa (circa 50%) seguite dai lipidi (35%) e carboidrati (12%). Gli acidi grassi totali (AGT) erano pari circa al 9% e tra i PUFAs a lunga catena il più abbondante era l'acido docosaesaenoico (DHA, C22:6 n-3) con un contenuto mediamente superiore all'1% della biomassa. Analisi specifiche condotte sulla biomassa di T-ISO hanno mostrato assenza di fibra grezza, un contenuto in fosforo pari a 0.35% ed un tenore in Vitamina E di circa 0.3%. Ulteriori dettagli sulla composizione biochimica della biomassa di T-ISO saranno mostrati nel capitolo 8 relativo alle prove di alimentazione.

La contaminazione batterica delle colture di T-ISO non ha mai costituito un problema durante la coltivazione, probabilmente per le spinte diluizioni applicate nei vari trasferimenti, la breve durata dei batch, le buone condizioni delle cellule algali durante la crescita e per l'adozione di appropriate procedure di disinfezione che hanno limitato la proliferazione dei batteri ed di altri contaminanti (ad es. protozoi).

In Tabella 7.7 è riportata la carica batterica totale delle colture algali prima della raccolta e dopo liofilizzazione.

La procedura di raccolta/liofilizzazione ha determinato un significativo decremento della carica batterica (circa 6 volte). Nella biomassa liofilizzata, è stata rilevata bassa presenza di microrganismi di origine fecale (coliformi totali, fecali ed enterococchi) ed assenza di patogeni per i pesci (*Vibrio*).

Tabella 7.66. Composizione biochimica della biomassa di T-ISO prodotta in GWP-1000 nel periodo estivo. I componenti sono espressi come % della biomassa secca. Sono mostrati i valori medi \pm ds (n=4) non corretti per l'umidità delle polveri analizzate.

Componente	Quantità (g/100g)
Umidità	2,78 \pm 0,26
Composizione centesimale	
Proteine	49,6 \pm 4,02
Carboidrati	11,6 \pm 0,80
Lipidi	34,5 \pm 2,03
Pigmenti	
Clorofilla totale	3,84 \pm 0,14
Clorofilla-a	2,39 \pm 0,06
Clorofilla-c	1,45 \pm 0,10
Carotenoidi totali	1,11 \pm 0,01
Acidi grassi	
14:0 Acido miristico	1,43 \pm 0,07
16:0 Acido palmitico	1,21 \pm 0,07
16:1n-7 Acido palmitoleico	0,55 \pm 0,08
16:2n-4 Acido esadecadienoico	0,05
18:1n-9 Acido oleico	1,12 \pm 0,16
18:1n-7 Acido vaccenico	0,14 \pm 0,0
18:2n-6 Acid Linoleico	0,94 \pm 0,07
18:3n-3 Acido α -linolenico	1,18 \pm 0,04
18:4n-3 Acido stearidonico	0,95 \pm 0,06
20:5n-3 Acido eicosapentaenoico (EPA)	0,19 \pm 0,01
22:6n-3 Acido docosaesaenoico (DHA)	1,09 \pm 0,03
Altro	0,39 \pm 0,09
AGT	9,24 \pm 0,09

Tabella 7.7 - Carica batterica aerobia della sospensione colturale al momento della raccolta e della biomassa liofilizzata di *Isochrysis* (T-ISO).

Campione biomassa	Carica batterica totale	
	(UFC mL ⁻¹ coltura)	(UFC g ⁻¹ p.s.)
Coltura alla raccolta	2800	2.800.000
<i>Isochrysis</i> (T-ISO) liofilizzata	-	440.000

7.5.5 Capacità produttiva dell'impianto pilota a GWP di Archimede Ricerche S.r.l

La sperimentazione oggetto di questo lavoro è stata condotta con il duplice scopo di mettere a punto una strategia di coltivazione della microalga T-ISO che fosse affidabile ed idonea per impianti commerciali e produrre i quantitativi di biomassa necessari per le prove di alimentazione della spigola. Per la sperimentazione è stato scelto il periodo estivo al fine di ottenere più elevate rese in biomassa grazie alla maggiore radiazione luminosa disponibile. Un impianto commerciale deve però essere attivo (produttivo) per tutto o per la maggior parte dell'anno e garantire sempre la disponibilità del prodotto. L'impianto di Archimede Ricerche Srl in effetti ha operato per due anni consecutivi (ed opera a tutt'oggi) in tutte le stagioni e ciò ha permesso di ottenere dati reali sulla sua capacità produttiva riferita alla microalga T-ISO.

La produzione dell'impianto è stata valutata sommando il quantitativo di biomassa (liofilizzata) raccolta nei vari periodi dell'anno, considerando la frazione di impianto attivo ed estrapolando tale dato all'intero impianto. Nel calcolo sono stati considerati anche i tempi morti (non produttivi) per il lavaggio dei reattori (ca 1/7) e gli spazi occupati dagli impianti accessori. La radiazione globale media mensilmente ricevuta sulla superficie orizzontale esterna alla serra è stata fornita da PVGIS: PhotoVoltaic Geographical Information System (<http://re.jrc.ec.europa.eu/pvgis/apps4/pvest.php>; <http://re.jrc.ec.europa.eu/pvgis/apps/radmonth.php?lang=en&map=europe>), quest'ultima è stata corretta per l'assorbimento della struttura (circa 15%) in modo da ottenere la irradianza effettivamente intercettata per unità di superficie occupata all'interno della serra (Figura 7.19). Misure effettuate all'interno della serra hanno

ottenuto risultati molto simili quando il sensore era posizionato su un piano orizzontale non soggetto ad ombreggiamento della struttura portante. In realtà quest'ultima esiste specialmente sui GWP ed è responsabile di un ombreggiamento difficilmente quantizzabile.

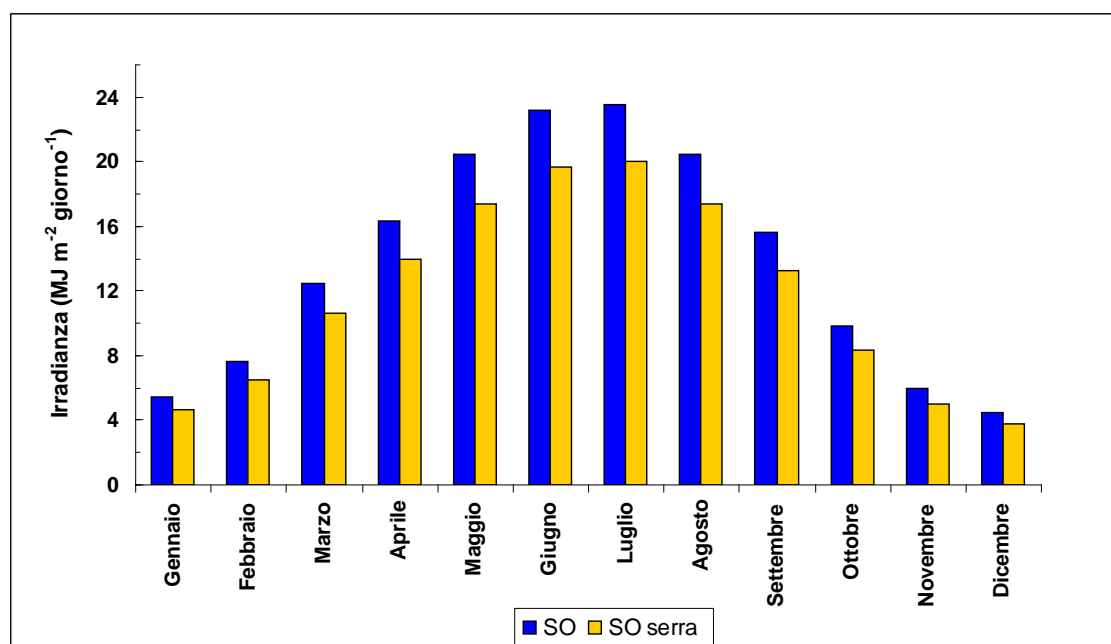


Figura7.19 - Radiazione globale ricevuta giornalmente sulla superficie orizzontale fuori ed all'interno della serra presso il sito di Camporosso (IM) sede dell'impianto. Sono mostrati i valori medi mensili.

La produzione annuale media è stata 810 kg di biomassa secca pari a circa 8 t ha⁻¹ anno⁻¹. Da ciò risulta una produttività volumetrica media di circa 0.1 g L⁻¹ giorno⁻¹. Nella Figura 7.20 è mostrata la produzione suddivisa per stagione e la corrispondente radiazione intercettata giornalmente. Il periodo meno produttivo sembra essere quello autunnale nonostante che la radiazione disponibile sia superiore a quella invernale. La resa estiva e quella primaverile non differiscono significativamente, essendo il 28 ed il 29% del totale, rispettivamente. Da notare che in inverno la biomassa prodotta è stata solo del 15% inferiore rispetto al periodo estivo, tuttavia, come era da aspettarsi, il "quantum yield" (ovvero la biomassa prodotta (g) per unità di radiazione ricevuta (MJ)) è risultato ca 3 volte superiore a conferma che il processo produttivo e quindi la utilizzazione della luce è stata di gran lunga più efficiente alle basse irradianze. Non va

trascurato il fatto che in queste condizioni i sistemi verticali sono avvantaggiati e, rispetto a quelli orizzontali, intercettano una maggiore quantità di luce.

7.6 Conclusioni

La coltura all'aperto di T-ISO in fotobioreattori GWP-1000 posizionati sotto serra è fattibile tutto l'anno. La sperimentazione ha permesso di valutare le prestazioni del reattore nella realtà di un impianto pilota, di evidenziare i limiti tecnici, biologici ed economici di tutto il processo produttivo e le possibilità di miglioramento. Per la microalga T-ISO è stato definito un protocollo di coltivazione basato su trasferimenti successivi della coltura in volumi crescenti al fine di ottenere inoculi in fase attiva di crescita e in quantità sufficiente per lo start-up dei GWP produttivi. In quest'ultimi le colture possono essere gestite in batch per non più di una settimana. Adottando questa strategia sono state conseguite produttività volumetriche di 0.2 g L⁻¹ giorno⁻¹ nel periodo estivo con una media annuale pari a circa 0,1 g L⁻¹ giorno⁻¹, inoltre i fotobioreattori sperimentati hanno dimostrato flessibilità ed affidabilità su scala pilota. Nell'impianto di Archimede Ricerche Srl possono essere mediamente prodotti 3 kg di biomassa secca al giorno pari ad una produzione annuale media di circa 8 t ha⁻¹ anno⁻¹. Si tratta di una resa piuttosto bassa (forse dovuta alla collocazione geografica del sito) che però può essere garantita nel lungo periodo. Per ottenere rese in biomassa più elevate è necessario lavorare a concentrazioni ottimali per evitare fenomeni di estrema fotolimitazione durante il batch. E' pertanto opportuno, nei diversi periodi dell'anno, ottimizzare la concentrazione di lavoro.

La biomassa prodotta nei GWP-1000 può essere raccolta mediante centrifugazione, congelata e liofilizzata mantenendo buona qualità nutrizionale e microbiologica. Per l'elevato contenuto in proteine ricche di aminoacidi essenziali e l'abbondanza di PUFA n-3, principalmente DHA, la biomassa di T-ISO risulta idonea come ingrediente di mangimi per acquacoltura, potendo sostituire parzialmente la farina di pesce e l'olio di pesce grazie al tenore proteico e contenuto di PUFA.

Nelle condizioni attuali di impianto il costo della biomassa di T-ISO si aggira intorno ai 100-150 €/kg. Su tale costo le voci che incidono maggiormente sono: 1) manodopera (35%); 2) consumabili (15%) e 3) liofilizzazione (11%) (informazioni gentilmente

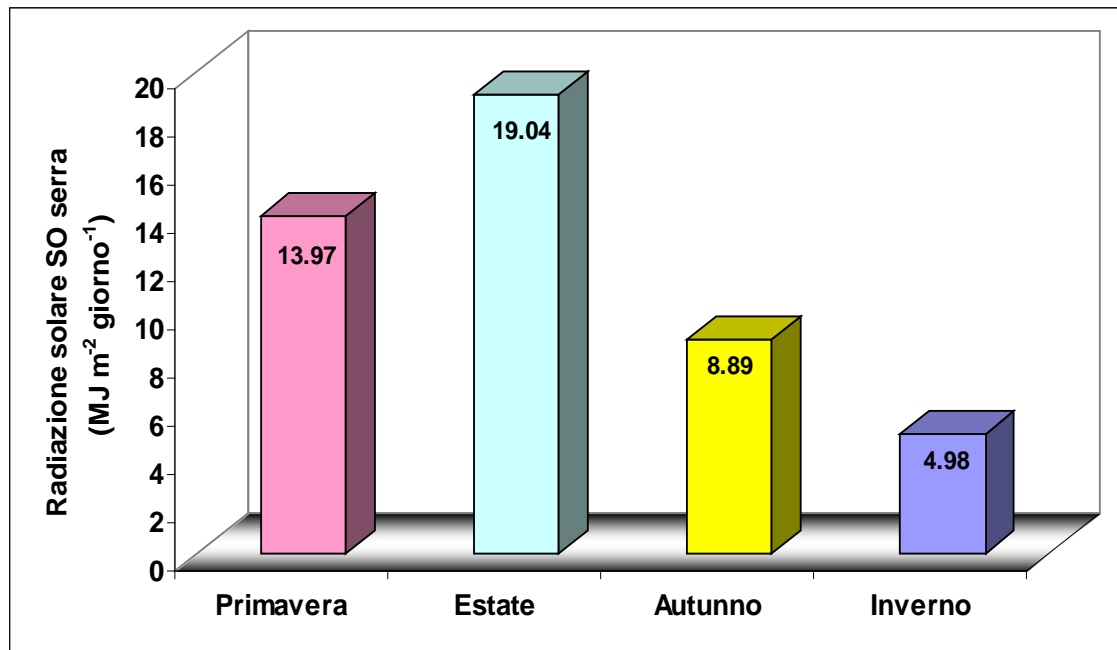
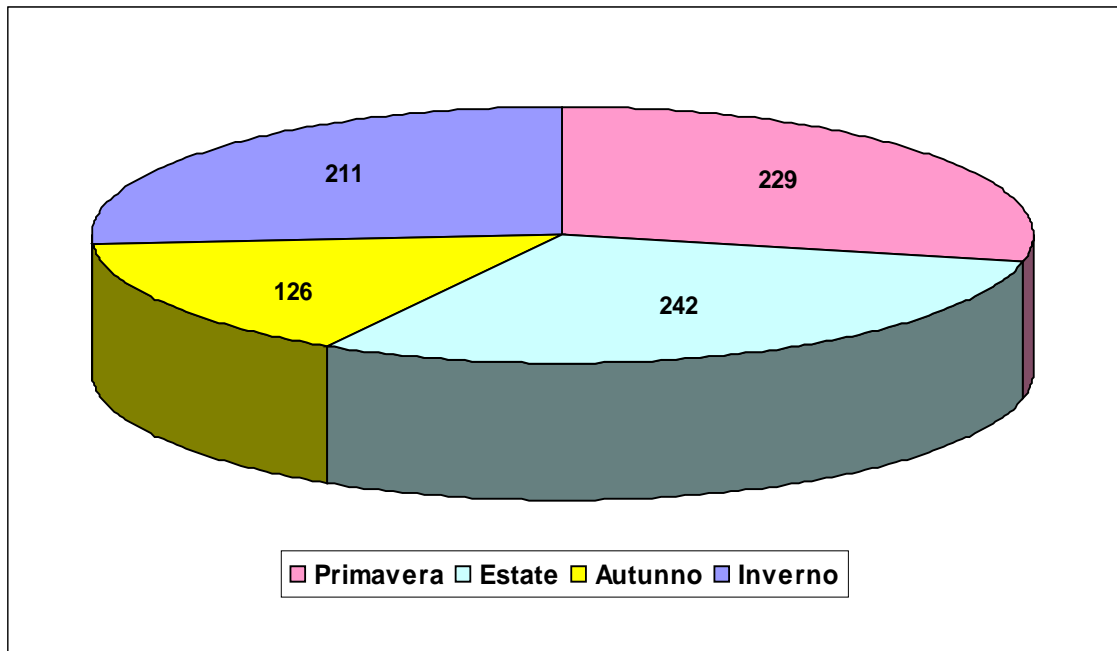


Figura 7.20. Produzione annuale di T-ISO ottenuta nell'impianto di Archimede Srl suddivisa per periodo stagionale. E' riportata anche la radiazione intercettata dalla superficie di suolo-serra.

concesse dal Dr. Mangini di Archimede Ricerche S.r.l). Ovviamente si tratta di costi proibitivi per applicazioni in mangimistica che richiedono grandi quantità di biomassa a costi almeno 10-20 volte inferiori. Una cospicua riduzione è pensabile rendendo tutto il processo produttivo meno energivoro ed sviluppando un sistema di coltura scalabile in cui sia possibile aumentare la produzione senza incrementare la manodopera. Nei

paragrafi successivi saranno indicate alcune delle possibili strategie da adottare per ridurre i costi della biomassa algale e ne sarà valutata la fattibilità in tempi reali.

CAPITOLO 8

***Dicentrarchus labrax*: prove di alimentazione con mangimi a base di microalghe**

8.1 Introduzione

La spigola o branzino (*Dicentrarchus labrax*) (Figura 8.1), della famiglia dei Moronidi, ha una corporatura allungata, di colore grigio-verdastro sul dorso, con qualche possibile punteggiatura nera in fase giovanile e ventre argenteo.

E' provvista di due pinne dorsali ben definite, opercolo con due spine e preopercolo spinoso lungo il bordo inferiore. Mostra squame cicloidi tra gli occhi e denti aguzzi e sottili. In natura vive nelle acque temperate del Mediterraneo, Mar Nero e Atlantico (dalle Canarie alla Norvegia), generalmente in acque costiere ed eccezionalmente fino ad un centinaio di metri in profondità.



Fig 8.1 – *Dicentrarchus Labrax*

Specie ad elevata eurialinit , dal mare penetra all'interno degli ambienti salmastri e dei fiumi, adattandosi anche ad acque a bassissima salinit .

A sessi separati in natura si riproduce nei mesi invernali e a pieno sviluppo pu  raggiungere fino a 12 kg di peso. Le uova sono pelagiche con diametro poco superiore ad un millimetro (1,14-1,16 mm) e vengono prodotte in quantit  totale di circa il 12% del peso corporeo della femmina.

La velocit  di accrescimento dei giovanili di spigola varia a secondo della disponibilit  naturale di cibo o dalla quota di integrazione, della latitudine dell'allevamento e della densit  di semina: generalmente in impianti che utilizzano regimi termici naturali un ciclo di allevamento   caratterizzato dal raggiungimento di una taglia di circa 350 g in 30 mesi nelle valli venete e 24 mesi in Sicilia, con produzioni di 10-20 kg/ha/anno. La

disponibilità di acque riscaldate tra l'autunno e la primavera, permette di accelerare la crescita e di anticipare il raggiungimento della taglia commerciale. I giovanili di spigola fanno infatti registrare un buon accrescimento se allevati in condizioni di temperatura favorevole: in intensivo tra 18 e 24°C possono raggiungere 350-500 g nell'arco di 13-17 mesi. La specie tollera anche ampio range di temperature (4°C-32 °C), ma a temperature estreme riduce drasticamente le sue performance di crescita (Mazzola e Marino, 2001).

La spigola è tradizionalmente una delle specie di pesci preferite dal consumatore italiano, rappresenta la metà del prodotto della piscicoltura in Italia ed un terzo è fornito dagli allevamenti toscani (Poli et al., 2001).

È, insieme all'orata, la prima tra le specie pregiate eurialine che è stata riprodotta in condizioni controllate ed allevata in sistemi intensivi. Le carni di spigola sono molto apprezzate grazie alle sue caratteristiche organolettiche. Se alimentate correttamente inoltre presentano un buon contenuto in acidi grassi polinsaturi delle serie n-3, acido eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3) e l'acido docosaesaenoico (DHA, C22:6n-3) in particolare.

La spigola viene allevata in tutta Europa ed in particolare nel bacino del Mediterraneo con metodi esclusivamente intensivi, praticati in vasche a terra o in gabbie a mare. In Italia, oltre all'allevamento intensivo, si continua a praticare l'allevamento estensivo o semi estensivo, nelle valli venete, in alcune lagune del Centro Italia, in alcuni stagni sardi e nelle vasche di "fredda" delle saline della Puglia e della Sicilia occidentale (Mazzola e Marino, 2001).

La spigola è una specie carnivora e veniva allevata con l'uso di mangimi ad elevata quantità di proteine (45% di proteine) proveniente prevalentemente da farina di pesce (Mazzola e Marino, 2001; Francis-Floyd, 2002).

Attualmente esiste la problematica che il pesante sfruttamento delle risorse ittiche del pianeta ha portato ad un lento ma inesorabile impoverimento delle acque e la costante richiesta di farina di pesce ha determinato un rapido aumento dei costi legati all'acquacoltura e quindi un incremento del prezzo di mercato del pesce. La dipendenza del settore dalle farine e dagli oli di pesce come ingredienti principali dei mangimi può quindi far sorgere dubbi circa la loro sostenibilità economica e ambientale. Da qui la necessità di reperire risorse alimentari alternative alla farina ed all'olio di pesce di pari qualità nutrizionale e che riducano i costi dell'acquacoltura. La sorgente vegetale di

alcune specie di microalghe che contengano anche quote significative di acidi grassi a lunga catena della serie n-3, EPA e DHA in particolare, può rappresentare una interessante alternativa all'uso di sorgenti vegetali più tradizionali che ne sono prive e che portano ad alterazioni del benefico quadro acidico dell'alimento pesce. Da prove che hanno previsto la parziale sostituzione della farina di pesce con la microalga *I. galbana* (T-ISO) nell'alimentazione di orata è risultato che la microalga era molto digeribile, che le orate presentavano addirittura una migliore crescita rispetto a quelle alimentate con la normale dieta di controllo e che la composizione del filetto di pesce era analoga al controllo alimentato con farina di pesce (Palmegiano et al., 2009).

Allo scopo di testare la potenzialità delle biomasse di *Tetraselmis suecica* e *Isochrysis* (T-ISO) prodotte in fotobioreattore durante la prima fase della sperimentazione nell'alimentazione di specie ittiche pregiate di acquacoltura, quote di esse sono state utilizzate in prove di alimentazione sulla spigola, come ingredienti dei mangimi in sostituzione di parte di farina di pesce e, nel caso della T ISO, ricca di lipidi, anche di parte dell'olio di pesce.

8.2 Materiali e metodi

Le prove di alimentazione della spigola con l'utilizzo di *T.suecica* F&M-M33 o di *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) F&M-M36 come ingredienti della dieta, si sono svolte presso il Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università degli Studi di Udine. Le sperimentazioni si sono svolte in vasche contenenti 250 L di acqua di mare (Figura 8.2) e il ricircolo dell'acqua permetteva di rinnovarne ogni giorno circa il 5% dell'acqua di mare totale (volume totale 9 m³). Inoltre il tutto era controllato da un sistema di controllo termostatico, che regolava la temperatura dell'acqua e permetteva la sua depurazione attraverso l'utilizzo di filtri biologici, a sabbia e un sistema di lampade UV. Tale sistema assicurava la qualità dell'acqua pressoché costante e ottimale per le spigole (Tabella 8.1). I pesci erano esposti ad un fotoperiodo 12:12=L:D ed ad



Figura 8.2 – Vasche di allevamento utilizzate nelle sperimentazioni

una intensità luminosa di 200 lx.

Nella sperimentazione con *T. suecica* sono stati testati 9 gruppi di pesci, ciascuno costituito da 21 spigole aventi un peso medio iniziale di 72 g in una prova della durata di 63 giorni. Nella seconda sperimentazione, quella con *Isochrysis* (T-ISO) sono stati testati 12 gruppi, ciascuno costituito da 12 spigole di peso medio 142 g ed è durata 121 giorni.

In entrambi i casi sono state testate 3 diete isoproteiche ed isolipidiche, costituite da ingredienti biologici. In ciascuna prova la dieta di controllo era priva di microalghe, mentre nelle altre due diete era introdotta come ingrediente la biomassa liofilizzata di una delle due microalghe in proporzione crescente. Nella prova svolta con *T. suecica*, la microalga era introdotta nelle diete sostituendo rispettivamente il 10% (TETRA 10) e il 20% (TETRA 20) del contenuto proteico fornito principalmente dalla farina di pesce (Tabella 8.2). Nella sperimentazione con *Isochrysis* (T-ISO), la microalga sostituiva il 10% (T-ISO 10) e il 20% (T-ISO 20) del contenuto in proteine e il 15% (T-ISO 10) e il 30% (T-ISO 20) del contenuto in lipidi, forniti rispettivamente dalla farina e dall'olio di pesce (Tabella 8.3).

Tabella 8.1 – Parametri di allevamento di entrambe le sperimentazioni di alimentazione della spigola

Parametri di allevamento	Sperimentazione con <i>T.suecica</i>	Sperimentazione con <i>Isochrysis</i> (T-ISO)
Temperatura (°C)	20,4 ± 1,61	22,8 ± 0,90
Salinità (‰)	28 ± 3,3	25 ± 1
pH	7,32 ± 0,29	8,2 ± 0,20
Ossigeno disciolto (mg L ⁻¹)	6,14 ± 0,5	7,00 ± 0,29
N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	< 0,19	< 0,25
N-NO ₂ (mg L ⁻¹)	< 0,10	< 0,10

Tabella 8.2 – Le tre diete testate nella sperimentazione con le spigole, utilizzando la microalga *T. suecica*

Composizione diete (g kg ⁻¹)	ORG	TETRA 10	TETRA 20
Farina di pesce	548	493	439
Glutine di grano	100	100	100
Farina di soia	90	90	90
Polvere <i>T. suecica</i>	0	80	160
Farina di grano	120	93	66
Olio di pesce	104	106	107
Celite	15	15	15
Mix di Minerali e Vitamine	20	20	20

Carbossimetilcellulosa	3	3	3
-------------------------------	---	---	---

Tabella 8.3 – Le tre diete testate nella sperimentazione con le spigole, utilizzando la microalga *Isochrysis* (T-ISO)

Composizione diete (g kg⁻¹)	ORG	T-ISO 10	T-ISO 20
Farina di pesce	550	500	450
Farina di glutine	120	120	120
Farina di soia	80	80	80
Polvere di <i>Isochrysis</i> (T-ISO)	0	70	140
Farina di grano	100	85	70
Olio di pesce	100	70	40
Olio di palma	0	25	50
Celite	15	15	15
Mix di Minerali e Vitamine	20	20	20
Carbossimetilcellulosa	15	15	15

Le due tipologie di diete non possono essere confrontate tra di loro, in quanto hanno ingredienti in parte differenti. Infatti nelle diete della prova di alimentazione con *Isochrysis* (T-ISO) a differenza di quelle della prima sperimentazione, è presente l'olio di palma. L'introduzione dell'olio di palma, in sostituzione di parte del contenuto dell'olio di pesce è stata fatta perché tra tutti gli oli vegetali apporta molti acidi grassi monoinsaturi (ca 40%) ben utilizzati a fini energetici, ma soprattutto perché fornisce poco acido linoleico (C18:2) e acidi grassi n-6 in particolare, impedendo un eccessivo abbassamento del rapporto n-3/n-6 all'interno della dieta come si verifica con altri oli vegetali. Nelle tabelle 8.4 e 8.5 è riportata la composizione delle diete fornite nelle due sperimentazioni. Non ci sono molte differenze tra la dieta di controllo (ORG) e le diete con la microalga eccetto il contenuto in carotene che è maggiore nelle diete con la microalga che ne è ricca. Nelle diete della seconda sperimentazione si può osservare che il contenuto in 20:5 n-3 (EPA), 22:6 n-3 (DHA) e quindi PUFA n-3 è minore nelle diete contenenti la microalga *Isochrysis* (T-ISO) rispetto alla dieta di controllo. Comunque i quantitativi complessivi erano tenuti al di sopra del requisito minimo per alimentare la spigola (ad esempio 10g/kg dieta secca, Coutteau et al., 1996). Tutti gli ingredienti sono stati macinati attraverso un setaccio 0,5 mm prima del mixing finale e della formazione del pellet. Le diete sono state conservate a -3 ° C fino al momento dell'utilizzo. Entrambe le tipologie di dieta contengono la celite, che è stata utilizzata come marker per determinare i coefficienti di digeribilità apparente (ADCI) delle diete. Le misurazioni di digeribilità di ciascuna dieta sono state effettuate in triplicato,

utilizzando una struttura a serbatoio e procedure già descritte da Tibaldi et al. (2006). I coefficienti di digeribilità apparente della sostanza organica, di proteine grezze e di lipidi grezzi delle diete sono state calcolate secondo Maynard e Loosly (Cho, 1992):

$$\text{ADCI (\%)} = \left\{ \left[\left(\frac{\% \text{ nutrienti nella dieta}}{\% \text{ marcatore la dieta}} \right) - \left(\frac{\% \text{ nutrienti nelle feci}}{\% \text{ marcatori nelle feci}} \right) \right] / \left(\frac{\% \text{ in nutrienti testato nella dieta}}{\% \text{ marcatore in dieta}} \right) \right\} \times 100$$

Dopo la stoccaggio, i pesci sono stati alimentati con la dieta di controllo per circa 2 settimane in modo che si adattassero alle condizioni sperimentali. Alla fine di questo periodo preliminare, due pesci per vasca sono stati campionati casualmente per essere analizzati nella composizione. I pesci erano alimentati con due pasti al giorno (ore 8:00 e ore 16:30).

Tabella 8.4 – Confronto tra le composizioni delle diete fornite alla spigola nella prima sperimentazione con *T. suecica*

Composizione g/100g	ORG	TETRA 10	TETRA 20
Sostanza secca	93,5	93,9	94,5
Proteina grezza	51,3	49,9	49,9
Lipidi neutri	14,73	15,55	15,60
Lipidi polari	2,14	2,73	3,24
Fibra grezza	1,4	1,0	1,0
Fibra ND	3,6	4,8	3,5
Fibra AD	3,3	2,4	2,0
Ceneri	15,9	16,2	16,4
Carotene mg/kg	tr.	83	175
Acidi grassi (%AGT)¹			
14:0	5,4	5,5	5,3
16:0	16,3	17,1	17,3
16:1 n-7	4,5	4,5	4,3
18:0	2,7	2,3	2,3
18:1 n-9	16,0	16,1	16,6
18:1 n-7	2,4	2,2	2,2
18:2 n-6	11,9	10,6	10,9
18:3 n-3	2,4	4,0	4,5
18:4 n-3	2,2	2,5	2,6
20:1 n-9	6,7	6,6	6,4
20:2 n-6	0,2	0,3	0,3
20:4 n-6	0,5	0,5	0,5
22:1 n-11	8,3	8,5	8,2
20:5n-3	5,8	5,8	5,8
22:5 n-3	1,2	1,0	1,0
22:6n-3	9,9	9,2	8,6
SFA	25,4	25,8	26
MUFA	39,5	39,4	39,1

n-3 PUFA	21,5	22,5	22,6
n-6 PUFA	12,9	11,6	11,7
n-3/n-6	1,73	1,95	1,93

1) Gli acidi grassi 12:0, 13:0, 14:1n-5, 15:0, 16:2n-4, 16:3n-4, 17:1, 16:4n-1, 18:2n-4, 18:3n-6, 18:3n-4, 18:4n-1, 20:1n-7, 20:3n-6, 20:3n-3, 20:4n-3, 21:5n-3, 22:4n-6, e 22:5n-6 non sono riportati in tabella

Tabella 8.5 – Confronto tra le composizioni delle diete fornite alla spigola nella seconda sperimentazione con *Isochrysis* (T-ISO)

g/100g	ORG	T-ISO 10	T-ISO 20
Sostanza secca	94,35	94,7	94,45
Proteine grezze	47,95	47,75	47,07
Lipidi totali	17,2	17,8	18,2
Fibra ND	3,60	2,25	3,70
Fibra AD	2,15	1,98	1,65
Ceneri	15,5	15,25	14,75
Carotene mg/Kg	10	69	130
Selenio mg/kg	1,2	1,1	0,9
Acidi grassi			
18:2n-6	1,9	1,9	1,8
20:5n-3	1,0	0,8	0,6
22:6n-3	2,2	1,9	1,4
SFA	3,1	3,7	4,0
MUFA	6,2	5,7	5,0
n-3 PUFA	4,5	3,9	3,2
n-6 PUFA	2,1	2,1	2,0
Aminoacidi			
arginina	2,49	2,67	2,55
cistina	0,49	0,44	0,45
istidina	0,86	0,92	0,87
isoleucina	1,24	1,57	1,55
leucina	2,85	3,23	3,00
lisina	2,33	2,56	2,38
metionina	0,75	0,67	0,69
fenilalanina	1,69	1,96	1,80
treonina	1,78	2,04	2,06
triptofano	0,29	0,28	0,25
valina	1,75	2,01	1,87
alanina	2,71	2,78	2,67
acido aspartico	3,49	3,71	3,50
acido glutammico	7,66	7,97	7,33
glicina	3,78	3,80	3,50
prolina	3,46	3,61	3,48
serina	2,15	2,22	2,10
tirosina	1,21	1,17	1,17

Alla fine della sperimentazione, tutti i pesci di ciascuna vasca sono stati pesati e uccisi mediante immersione in un bagno di acqua ghiacciata. Di questi, 2 pesci per gruppo sono stati campionati casualmente ed utilizzati come campioni finali per le successive analisi.

I seguenti parametri sono stati misurati per ciascun gruppo dopo 121 giorni:

- ingestione alimentare: g / pesce / giorno
- tasso di crescita specifico (TAS): $100 \times \{(\ln \text{ peso corporeo finale} - \ln \text{ peso corporeo iniziale}) / \text{giorni}\}$
- rapporto di conversione di alimentazione: mangime ingerito / aumento di peso
- rapporto di efficienza proteica: aumento di peso / assunzione di proteine.

I pesci rimanenti di ciascun gruppo sono stati sottoposti a studi colorimetrici della livrea e del filetto e misurazioni biometriche prima di essere sezionati per valutare il peso degli organi principali e resa in macellazione ed in filetti.

Oltre alla lunghezza totale e peso corporeo totale, le seguenti variabili erano individualmente misurate e calcolate post-mortem:

Resa in carcassa(%): $(\text{peso degli eviscerati} / \text{peso corporeo}) * 100$

Resa in filetto (%): $(\text{peso del filetto con la pelle} / \text{peso corporeo}) * 100$

Indice viscerosomatico (%): $(\text{peso dei visceri} / \text{peso corporeo}) * 100$

Indice epatosomatico (%): $\text{peso del fegato} / \text{peso corporeo} * 100$

8.3 Risultati: prove di alimentazione della spigola (*Dicentrarchus labrax*) utilizzando la microalga *Tetraselmis suecica* F&M – M33 come ingrediente della dieta

Durante i due mesi di sperimentazione non è stata osservata mortalità dei pesci.

In tabella 8.6 sono riportati i parametri misurati sui pesci *post-mortem*. I pesci in 63 giorni hanno incrementato il loro peso del 68,9 % rispetto all'inizio. Non ci sono state grandi differenze tra i pesci alimentati con le tre differenti diete, eccetto per l'indice epatosomatico, significativamente differente tra le spigole ORG e le spigole TETRA 20 ($P < 0,05$). Tale differenza non ha influenzato la crescita dei pesci, i quali a fine prova hanno mostrato tutti un peso medio di 117 g .

L'inclusione nelle diete della biomassa microalgale liofilizzata per il 20% ha influenzato i coefficienti di digeribilità apparente, significativamente più bassi rispetto ai pesci di controllo (ORG), per proteine (93,3% vs. 95,3%; $P < 0,05$), lipidi (79,7% vs. 99,3%; $P < 0,05$) e per la sostanza organica (87,4 % vs. 89,1%; $P < 0,05$).

Tabella 8.6 – Performance di crescita, ingestione dell'alimento, efficienza di conversione dell'alimento, resa in filetto ed indici somatici delle spigole giovanili alimentate con le tre diete durante 63 giorni. Lettere differenti sulla medesima riga indicano differenze significative ($P < 0,05$) (Test Duncan).

	ORG	TETRA 10	TETRA 20	MSE
Peso iniziale (g/ind)	69,5	69,5	69,5	0,049 ¹
Peso finale (g/ind)	117,7	118,3	116,1	7,518 ¹
TAS (tasso di accrescimento specifico) (%)	0,84	0,84	0,81	0,002 ¹
Ingestione dell'alimento (g/pesce/giorno)	1,04	1,07	1,05	0,005 ¹
Tasso di conversione dell'alimento	1,35	1,41	1,43	0,002 ¹
Resa in carcassa (%)	88,96	88,27	88,04	1,760 ²
Resa in filetto (%)	44,68	44,68	44,35	25,988 ²
Indice viscerosomatico (%)	10,09	11,10	11,20	1,538 ²
Indice epatosomatico (%)	1,84 ^a	1,52 ^{ab}	1,39 ^b	0,132 ²

¹MSE n=6 ²MSE n= 24

La resa in filetto è stata mediamente 44,5 % in tutti e tre i gruppi di pesci alimentati con le tre diete. Per quanto riguarda la composizione del filetto (Tabella 8.7), in tutti e tre i casi i contenuti medi sono stati: 64,7% acqua, 24% proteine e 7% lipidi.

Anche nella composizione in acidi grassi non ci sono grandi differenze, eccetto per quanto riguarda il contenuto in ac. α -linolenico e ac. stearidonico che sono stati statisticamente minori nei pesci alimentati con la dieta di controllo. L'acido α -linolenico è inferiore anche nel filetto dei pesci alimentati con la dieta TETRA-10 rispetto a quelli alimentati con la dieta TETRA-20.

Differenza si riscontra nel rapporto PUFA n-3/n-6, differente statisticamente tra i pesci di controllo e quelli alimentati con la dieta TETRA-10 (1,75 vs. 1,64; $P < 0,05$), mentre i pesci alimentati con TETRA 20 mostrano un valore intermedio.

Ulteriore differenza tra i pesci alimentati con le tre diete consiste nella diversa pigmentazione della livrea (Figura 8.3).

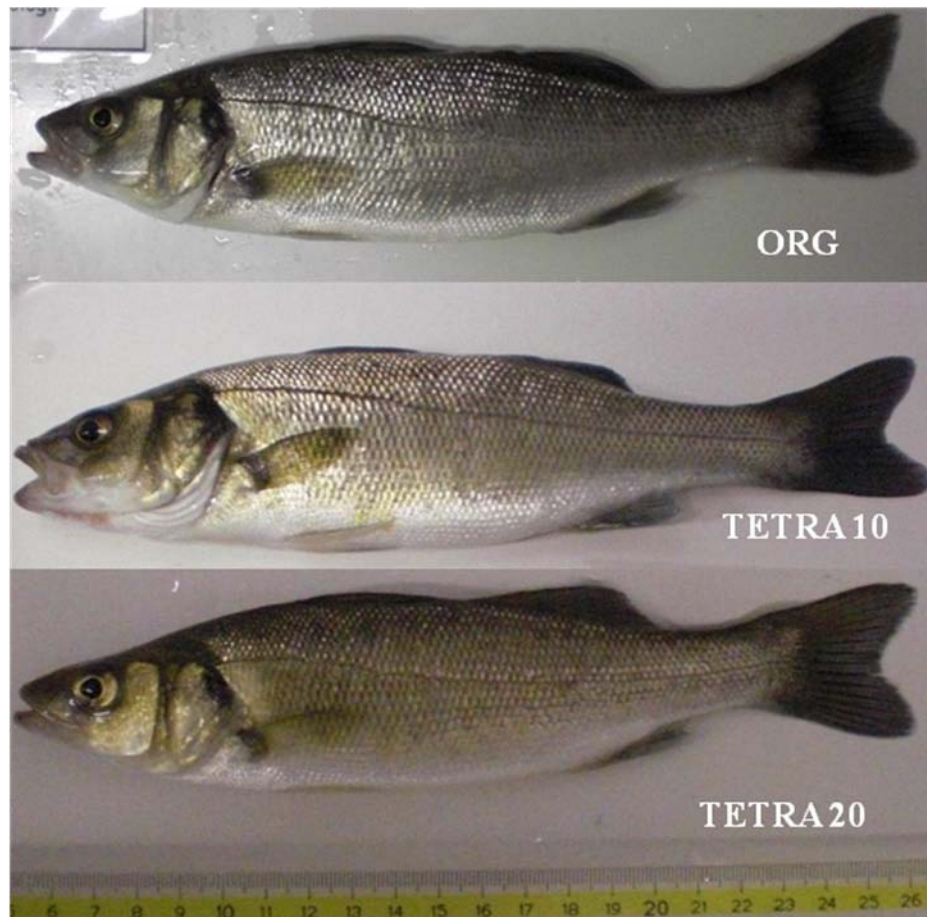
I pesci nutriti con le diete a base di microalghe hanno mostrato una colorazione con sfumature sul verde, soprattutto nel caso dei pesci TETRA 20, rispetto a quelli alimentati con la dieta di controllo (ORG).

Tabella 8.7 – Composizione dei filetti delle spigole alimentate con le tre diete. Differenti lettere sulla stessa riga corrispondono differenze significative (MSE n=24, P<0,05) (Test Duncan).

g/100g s.u.	ORG	TETRA 10	TETRA 20
Acqua	64,6	64,6	64,8
Proteina grezza	24,1	24,1	24,4
Lipidi totali	7,26	7,16	7,26
Acidi grassi (% AGT)¹			
14:0	4,3	4,3	4,2
16:0	18,3	18,3	18,2
16:1 n-7	5,0	5,0	4,9
18:0	3,6	3,6	3,6
18:1 n-9	19,8	20,1	19,9
18:1 n-7	2,5	2,5	2,5
18:2n-6	12	12,5	12,4
18:3 n-3	1,9 ^b	2,2 ^b	2,5 ^a
18:4 n-3	1,2 ^b	1,4 ^a	1,4 ^a
20:1 n-9	3,8	3,8	3,6
20:2 n-6	0,5	0,6	0,5
20:4 n-6	0,5	0,5	0,5
22:1 n-11	4,2	4,0	3,8
20:5n-3	7,7	7,8	7,7
22:5 n-3	1,4	1,3	1,3
22:6n-3	10,8	9,7	10,1
Saturi	27,01	27,01	26,92
Moninsaturi	36,06	36,08	35,58
PUFA n-3	22,95	22,39	23,09
PUFA n-6	13,16	13,68	13,59
n-3/n-6	1,75 ^a	1,64 ^b	1,70 ^{ab}

¹Gli acidi grassi 12:0, 13:0, 14:1n-5, 15:0, 16:2n-4, 16:3n-4, 17:1, 16:4n-1, 18:2n-4, 18:3n-6, 18:3n-4, 18:4n-1, 20:1n-7, 20:3n-6, 20:3n-3, 20:4n-3, 21:5n-3, 22:4n-6, e C22:5n-6 erano considerate nelle frazioni ma non sono riportati in tabella

Figura 8.3 – Le spigole alimentate con le tre diete



8.4 Risultati: prove di alimentazione della spigola (*Dicentrarchus labrax*) utilizzando la microalga *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) F&M-M36 come ingrediente della dieta

Nei quattro mesi di sperimentazione non è stata osservata mortalità dei pesci. In tabella 8.8 sono riportati tutti i parametri misurati *post-mortem* sui pesci alimentati con le tre diete. Le spigole in 121 giorni hanno raddoppiato il loro peso. Come risulta dall'esame della tabella non sono emerse differenze significative tra i pesci alimentati con le tre diete. Mediamente la resa in filetto è stata del 48,6% e la sua composizione è riportata in tabella 8.9.

Tabella 8.8 – Performance di crescita, ingestione dell'alimento, efficienza di conversione dell'alimento, resa in filetto ed indici somatici delle spigole giovanili alimentate con le tre diete durante i 121 giorni. Valori medi (\pm ds) (n=4) Non ci sono differenze significative ($P < 0,05$) (Test Duncan).

	ORG	T-ISO 10	T-ISO 20	MSE
Lunghezza totale (cm)	29,50	29,75	29,79	0,18
Peso finale (g/ind)	289,72	296,31	296,19	4,70
Resa in carcassa (%)	92,65	92,10	92,29	0,15
Resa in filetto (%)	45,26	46,00	46,27	0,34
Indice viscerosomatico (%)	7,4	7,9	7,7	0,82
Indice epatosomatico (%)	1,71	1,55	1,56	0,05
Grasso mesenterico (%)	3,13	3,60	3,37	0,12

La composizione centesimale dei filetti dei pesci di tutte e tre le diete è stata: 69% acqua, 20% proteine e 8% lipidi. Sono presenti alcune differenze significative nella composizione in acidi grassi. Infatti i pesci alimentati con le diete di controllo mostrano un maggior contenuto in ac. eicosapentanoico e docosaesanoico rispetto a quelli alimentati con entrambe le diete a base di microalga riflettendo la composizione delle diete con *Isochrysis* (T-ISO) che avevano mostrato un minor quantitativo di questi due acidi grassi polinsaturi n-3, rispetto alla dieta di controllo.

Per quanto riguarda la digeribilità delle diete con *Isochrysis* (T-ISO), non sono emerse differenze significative né per le proteine né per la materia organica (dati non riportati per brevità).

Tabella 8.9 – Composizione dei filetti delle spigole alimentate con le tre diete. Differenti lettere sulla stessa riga corrispondono differenze significative (MSE n=24, P<0,05) (Test Duncan).

g/100g s.u.	ORG	T-ISO 10	T-ISO 20	MSE
Acqua	69.89	69.08	69.26	0.39
Proteina grezza	19.9	20.09	19.26	0.19
Lipidi totali	7.65	8.04	8.21	0.47
Acidi grassi(g/100g carne)				
14:0	0.255	0.251	0.222	0.170
16:0	1.048 ^b	1.176 ^{ab}	1.272 ^a	0.065
16:1n-7	0.312 ^a	0.254 ^b	0.234 ^b	0.017
18:0	0.204	0.203	0.21	0.012
18:1n-9	1.433	1.579	1.433	0.097
18:1n-7	0.154 ^a	0.142 ^{ab}	0.111 ^b	0.014
18:2n-6	1.02	1.08	1.09	0.077
18:3n-3	0.182	0.208	0.217	0.013
18:4n-3	0.09	0.208	0.217	0.008
20:1n-9	0.262 ^a	0.233 ^b	0.193 ^c	0.018
20:2n-6	0.048 ^b	0.052 ^{ab}	0.063 ^a	0.05
20:4n-6	0.045 ^a	0.037 ^b	0.036 ^b	0.002
20:5n-3	0.53 ^a	0.37 ^b	0.34 ^b	0.026
22:1n-11	0.228 ^a	0.229 ^a	0.173 ^b	0.016
22:5n-3	0.101 ^a	0.085 ^b	0.071 ^c	0.005
22:6n-3	0.97 ^a	0.83 ^b	0.82 ^b	0.038
Saturi	1.56	1.69	1.76	0.097
Monoinstauri	2.5	2.51	2.46	0.156
n-3 PUFA	1.95 ^a	1.69 ^b	1.66 ^b	0.09
n-6 PUFA	1.15	1.21	1.24	0.084
n3/n6	1.73 ^a	1.43 ^b	1.36 ^b	0.084
EPA+DHA (g/100g)	1.505 ^a	1.207 ^b	1.156 ^b	0.081

†Gli acidi grassi 12:0, 13:0, 14:1n-5, 15:0, 16:2n-4, 16:3n-4, 17:1, 16:4n-1, 18:2n-4, 18:3n-6, 18:3n-4, 18:4n-1, 20:1n-7, 20:3n-6, 20:3n-3, 20:4n-3, 21:5n-3, 22:4n-6, e C22:5n-6 erano considerate nelle frazioni ma non sono riportati in tabella

Anche in questo caso, le spigole alimentate con le diete di T-ISO 10 e T-ISO 20, hanno mostrato differenze nella pigmentazione della livrea, come è possibile verificare dall'osservazione macroscopica (Figura 8.4).

Figura 8.4 – Le spigole alimentate con le tre diete



8.5 Conclusioni

In conclusione, entrambi i ceppi microalgali hanno mostrato di essere validi ingredienti alternativi per la dieta della spigola, sostituendo fino al 20% del contenuto proteico fornito dalla farina di pesce. Nel caso delle prove di alimentazione con *Isochrysis* (T-ISO), questa si è mostrata anche una valida alternativa per la sostituzione, fino al 30% dei lipidi forniti dall'olio di pesce. Infatti i pesci testati sia con *T. suecica* che con *Isochrysis* (T-ISO) ad entrambe le percentuali di sostituzione, a fine sperimentazione non hanno presentato differenze significative nella crescita e una resa in filetto paragonabile sia tra i pesci alimentati con le tre diete ma anche tra le due prove. Anche se ci sono differenze significative nella composizione acidica del filetto con le diete a base di *Isochrysis* (T-ISO), questo non va ad interferire troppo su quella che è

l'assunzione minima consigliata di PUFA n-3 umana (3,5 g alla settimana), in quanto in tal caso il quantitativo di filetto da mangiare è circa 209 g anziché 180g come nel caso delle spigole di controllo.

CAPITOLO 9

Discussione

Produrre biomassa algale è ancora molto costoso ed energeticamente dispendioso e ciò impedisce di utilizzare le microalghe nel settore delle bioenergie ed in quello dell'acquacoltura come "feed". Perché questo possa diventare realtà sarà necessario:

- Realizzare sistemi di coltura chiusi potenzialmente capaci di produrre biomassa in quantità elevata e a costi relativamente contenuti da soddisfare le necessità del settore mangimistico e/o bioenergetico.
- Ottimizzare la filiera produttiva intervenendo principalmente su quelle fasi che attualmente incidono in maniera preponderante sui costi di produzione (raccolta e liofilizzazione della biomassa).
- Isolare ceppi microalgali che abbiano elevate produttività in biomassa, buona composizione biochimica, alta efficienza fotosintetica, che siano competitivi e resistenti a stress meccanici ed ambientali, vista la grande biodiversità esistente tra le microalghe.

9.1 Valutazione del GWP: vantaggi e svantaggi

Il fotobioreattore GWP-I usato per la coltura all'aperto sia della microalga *T. suecica* che di *Isochrysis* (T-ISO) è stato sviluppato e brevettato presso il Dipartimento di Biotecnologie Agrarie dell'Università degli Studi di Firenze (Tredici e Rodolfi, 2004).

Il GWP-I è stato utilizzato per la coltivazione all'aperto di molte specie microalgali (Rodolfi et al. 2006). Con *T. suecica* coltivata nel mese di settembre, in pannelli disposti in parallelo ad una distanza di 0,8 m è stata ottenuta una produttività areale maggiore del 35% nei reattori orientati Nord-Sud, in quanto questi intercettavano il 22% in più di radiazione solare, rispetto ai pannelli orientati Est-Ovest (Rodolfi et al. 2008; Bassi et al. 2010).

In una simulazione full-scale con *T. suecica*, è stata ottenuta una produttività areale di $27 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Rodolfi et al., 2008), maggiore della produttività ottenuta con la stessa microalga in vasche raceway ($26 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) (Pedroni et al., 2004). Rodolfi et al. (2009) hanno studiato approfonditamente la capacità della microlaga marina *Nannochloropsis*

sp. come fonte di olio rinnovabile, in reattori GWP-I. Esperimenti eseguiti in simulazioni “full-scale” nel clima del Mediterraneo, hanno mostrato che *Nannochloropsis* sp. è in grado di produrre annuale 20 t ha⁻¹ di lipidi (Rodolfi et al. 2009).

Dalla sperimentazione effettuata sono emersi vantaggi e svantaggi del GWP che possono essere così riassunti:

Vantaggi

- ◆ Il GWP è un sistema facile da assemblare e consente lo *scaling-up* del sistema, fino ad impianti industriali con moduli lunghi 25-50 m; esso attualmente è commercializzato da Fotosintetica & Microbiologica Srl (spin-off dell’Università di Firenze). Reattori GWP-I in scala pilota sono attualmente operativi presso ENI SpA (Gela, Italia) e ENEL Ingegneria e Innovazione SpA (Brindisi, Italia) per la biofissazione della CO₂. Il GWP-I è anche utilizzato per la produzione commerciale di biomassa algale presso Archimede Ricerche Srl (Imperia, Italia). Grazie alla collaborazione con Fotosintetica & Microbiologica Srl e l’Università di Firenze, Archimede Ricerche Srl (Camporosso, Imperia, Italia) ha sviluppato il primo impianto industriale per la produzione di biomassa microalgale di alta qualità, da utilizzare nel settore cosmetico, farmaceutico, alimentare e dell’acquacoltura.
- ◆ Fra i fotobioreattori ad oggi in commercio il GWP-I è uno di quelli a più basso costo (€50 m⁻²) e recentemente è già stato sviluppato il GWP di seconda generazione (GWP-II) (Tredici et al., 2011) molto più economico e semplice, che ha permesso una riduzione del costo di ca 10 volte (5 €m⁻²).
- ◆ La struttura di supporto si è dimostrata affidabile ed in grado di sostenere i GWP disposti in file anche in condizioni climatiche sfavorevoli (ad es. forte vento).
- ◆ La camera di coltura *disposable* del GWP evita le operazioni di pulizia con risparmio di tempo e manodopera. Durante la sperimentazione non c’è stata significativa adesione di materiale sulla superficie interna della camera di coltura (biofouling) anche se è stato necessario pulirla/disinfettarla ad intervalli di ca 2 mesi.
- ◆ In quanto dotato di una camera di coltura quasi completamente chiusa (ad eccezione delle zone di ingresso per le sonde ecc) è ridotto il pericolo di contaminanti ambientali ed inquinanti. Dalle osservazioni al microscopio le

colture di *Tetraselmis* erano sempre in buono stato con scarsa quantità di batteri e solo occasionalmente è stata notata la presenza di qualche protozoo flagellato. Le colture di *Isochrysis* invece talvolta hanno mostrato cospicua contaminazione batterica e presenza di ciliati.

- ◆ Il GWP come tutti i FBR chiusi permette un elevato grado di controllo delle condizioni colturali consentendo così di ridurre i fenomeni di contaminazione delle colture e rendere possibile la coltivazione di un maggior numero di specie microalgali. Ciò risulta di fondamentale importanza sia quando la biomassa è destinata a mercati che richiedono espressamente un prodotto con il minor livello di contaminazione possibile ed alta qualità nutrizionale (acquacoltura, integratori alimentari, farmaceutica e cosmesi) (Tredici et al., 2009). Il fotobioreattore è risultato facilmente controllabile, pH e temperatura si sono mantenuti entro i limiti impostati sul sistema di controllo, nonostante le grandi variazioni di luminosità e di temperatura esterna che si sono verificate nell'arco di tempo in cui si è svolto il lavoro.
- ◆ Il sistema di raffreddamento, mediante nebulizzazione di acqua di pozzo sulle superfici della camera di coltura, o mediante serpentine di acciaio inossidabile è risultato efficiente sebbene dispendioso. In un'ottica di applicazione su grande scala è previsto il recupero e riciclo di tale acqua o comunque l'uso di acqua di mare per la termostatazione.
- ◆ L'agitazione mediante insufflazione di aria assicura un buon mixing della coltura e buone capacità di mass transfer.
- ◆ Il design del fotobioreattore assicura un più alto rapporto superficie/volume rispetto a quello delle vasche raceway. Questo rappresenta, da un punto di vista operativo, un importante vantaggio economico perché permette di ridurre i volumi del mezzo di coltura e abbreviare i tempi per la raccolta della biomassa.

Svantaggi

Quando la biomassa microalgale è prodotta come materia prima per biocombustibile e per mangimi, diventa di fondamentale importanza che il Net Energy Ratio (NER) cioè il rapporto tra l'output energetico (contenuto calorico della biomassa prodotta) e l'input energetico (rappresentato dal contenuto energetico dei materiali usati per il sistema di coltivazione e l'intero impianto più l'energia necessaria per tutte le fasi del processo di coltivazione) sia >1 . Ad oggi solo le vasche hanno un NER >1 , in quanto rispetto ai

fotobioreattori i costi energetici di costruzione e l'energia necessaria per il mixing sono notevolmente inferiori (Tredici, 2007).

Nonostante il basso costo di costruzione, il GWP richiede elevata quantità di energia per il rimescolamento della coltura e per il cooling, energia che sommata a quella intrinseca nei materiali (embolie energy) può superare l'energia contenuta nella biomassa (NER<1) (Chini Zittelli et al., 2013).

9.2 Coltura massiva di *T. suecica* e *Isochrysis* (T-ISO) in GWP-I

Le microalghe studiate, *T. suecica* e *Isochrysis* (T-ISO) mostrano peculiarità diverse sia dal punto di vista della crescita e tolleranza agli stress ambientali che nella composizione. Entrambe sono state coltivate in sistemi di coltura chiusi (GWP) i quali permettono la crescita in condizioni controllate per ottimizzare il tasso di crescita e la composizione biochimica.

Tetraselmis è stata coltivata in fotobioreattori (GWP) da luglio ad agosto in quanto è una microalga capace di tollerare un'ampia gamma di temperature (da 2 a 34 °C) (Regan, 1988), nonché un ampio range di salinità e pH.

In Chini Zittelli et al. (2006) è riportato che *T. suecica* ha mostrato, in colonne anulari in full scale durante il periodo estivo, produttività volumetriche medie di 0,44 g L⁻¹ giorno⁻¹.

Rodolfi et al. (2008) riferisce che la microalga *T.suecica* coltivata in GWP in “full-scale” durante il periodo estivo ha mostrato produttività areali di 27 g m⁻² giorno⁻¹ -

Durante le nostre sperimentazioni svolte con *T. suecica* in GWP-I, è stata ottenuta una produttività estiva media pari a 0,68 g L⁻¹ giorno⁻¹, con la maggior resa in biomassa nel mese di luglio (0,75 g L⁻¹giorno⁻¹). Data l'elevata adattabilità della microalga è stato possibile coltivarla anche nei mesi invernali sebbene la produttività ottenuta sia stata inferiore (tra 0,13-0,25 g L⁻¹ giorno⁻¹) a causa sia della minore radiazione intercettata che soprattutto della più bassa temperatura.

La microalga *Isochrysis* (T-ISO) coltivata negli stessi fotobioreattori, ma in un impianto pilota ha mostrato una produttività estiva di 0,21 g L⁻¹ giorno⁻¹ pari a 5,35 g m⁻² giorno⁻¹). Tale bassa produttività è dovuta al fatto che *Isochrysis* è stata coltivata sotto serra in reattori disposti in file parallele (full-scale) distanti 1,5 m ed in una diversa zona

geografica, è una microalga fragile e sensibile agli stress ambientali ed alla contaminazione ed ha un tasso di crescita inferiore.

Entrambe le microalghe mostrano un contenuto elevato di proteine (mediamente il 49-50% della biomassa secca), ciò è in accordo con quanto riportato da Fabregas e Herrero (1985), i quali riportano che il contenuto in proteine delle microalghe marine utilizzate in acquacoltura è compreso tra il 39-54% della biomassa secca. La qualità delle proteine presenti nella biomassa microalgale è alta, in quanto hanno un buon profilo aminoacidico (Brown, 1997; Becker 2007). La specie *T. suecica* è frequentemente utilizzata in acquacoltura perché è ricca in steroli (Patterson et al., 1993) e vitamina E (Carballo-Cárdenas et al., 2003). Ha un buon contenuto in lipidi che varia dal 12 fino al 28-30% del peso secco (Otero e Fàbregas, 1997). Alcune microalghe possono mostrare una alta percentuale di PUFA n-3 (EPA e DHA). La microalga da noi coltivata, *T. suecica* F&M-M33 ha mostrato di avere un alto contenuto in proteine (54-45% ps) e un buon contenuto in lipidi (15-17,5%).

Le Primmnesiofite (*Pavlova* spp. e *Isochrysis* sp. (T-ISO) sono ricche in DHA, e il loro contenuto può variare tra 0,2-11% della biomassa secca. Nelle nostra sperimentazione *Isochrysis* (T-ISO) ha mostrato di avere un contenuto in DHA pari all' 1% della biomassa. Inoltre il suo contenuto in proteine costituiva il componente principale della biomassa (circa 50%) seguite dai lipidi (35%)

Confrontando la composizione biochimica delle due microalghe con quelle che sono le richieste nutrizionali da parte della spigola, possiamo osservare che la composizione biochimica delle biomasse microalgali rispecchia quelle che sono le esigenze in proteine, aminoacidi, lipidi e acidi grassi dei pesci. Inoltre entrambe le microalghe utilizzate nella sperimentazione sono ricche in vitamine.

9.3 Valutazione dei costi di produzione della biomassa

La valutazione economica ed energetica della produzione della biomassa microalgale ha mostrato chiaramente che le colture algali sono ancora lontane dalla fattibilità industriale mostrando un bilancio energetico e un costo di produzione ancora troppo alto per una produzione su scala commerciale. La produzione di biomassa per mangimi o per biocombustibili richiede un significativo decremento di tali costi.

Per produrre la biomassa microalgale si richiede l'utilizzo di elettricità, fertilizzanti, acqua e materie prime. Ad oggi il costo di produzione della biomassa algale come materia prima per biofuel e feed non è inferiore a 5-7 €kg⁻¹ (Biondi et al., 2012; Chini Zittelli et al., 2013).

I costi di produzione possono essere suddivisi in due gruppi: costi capitali (installazione/montaggio della strumentazione e superficie occupata) e costi operativi (manodopera, CO₂, acqua con incluso relativi trattamenti, energia elettrica, nutrienti e sostanze chimiche) (Molina Grima et al., 2003; Williams e Laurens, 2010; Richardson et al., 2012).

La stima dei costi è effettuata nelle diverse condizioni descritte nel cap. 6.6 per verificare se e quanto ancora siamo lontani dall'obiettivo di 1-2 €kg e soprattutto per valutare la significatività della riduzione apportata con le strategie adottate e studiate in questa tesi. La elaborazione condotta ha mostrato che l'utilizzo del Sosalt per la preparazione dell'acqua di mare artificiale riduce del 22% il costo della biomassa rispetto all'impiego del sale tradizionale (TMZ), mentre il refluo avicolo apporta soltanto un decremento del 3%, questo in relazione al fatto che i nutrienti sono uno dei costi che incidono meno sul costo complessivo. Inoltre utilizzando l'acqua di mare artificiale preparata con Sosalt e refluo avicolo come fonte di azoto e fosforo, il costo della biomassa è 10,90 €kg⁻¹, paragonabile a quello della biomassa prodotta utilizzando acqua di mare naturale e fertilizzanti sintetici come nutrienti (10,85 €kg⁻¹). Le voci che incidono significativamente sui costi di energia elettrica sono il mixing (3.780 €anno⁻¹ cioè ca il 75% del costo energetico) e la termostatazione (1.155 €anno⁻¹ cioè ca il 23% del costo energetico). La manodopera è il costo che incide maggiormente sul prezzo della biomassa in quanto rappresenta oltre il 50% dei costi di esercizio.

In conclusione mentre possiamo dire che le strategie adottate contribuiscono a ridurre i costi di produzione, quest'ultimi così come da noi calcolati sono ancora troppo elevati per gli obiettivi prefissati e se considerassimo anche il trattamento di liofilizzazione essi potrebbero ulteriormente incrementare. Da notare, tuttavia, che la stima è stata effettuata su un impianto pilota e che i costi potrebbero diminuire se riferiti ad un impianto di almeno 1 ha operativo in condizioni climatiche favorevoli (che incrementino la resa annuale) ed in particolare se si usano aree semidesertiche ed una tecnologia semplice che si basi sui principi delle colture agricole. Tuttavia al momento non è possibile prevedere di produrre biomassa ad un costo inferiore ai 5 €kg⁻¹ anche se sono in corso

studi di strategie che potranno effettivamente permettere di raggiungere nei prossimi anni l'obiettivo prefissato. Fra le strategie proposte:

- ◆ Usare ceppi selezionati, molto produttivi a temperature di 40 °C per ridurre i costi del cooling.
- ◆ Coltura di tali ceppi in aree non coltivabili utilizzando acqua di mare anche per l'eventuale raffreddamento in modo da non competere con le colture agrarie per il suolo e l'acqua dolce
- ◆ Ridurre significativamente gli input energetici per il mixing nei reattori GWP-II al fine di avvicinarsi sempre di più ai consumi energetici delle vasche aperte
- ◆ Utilizzare un sistema che unisca FBR GWP per la produzione di inoculi e vasche aperte per la fase produttiva
- ◆ Recuperare l'energia solare non utilizzata per la fotosintesi trasformarla ed utilizzarla per i consumi operativi.
- ◆ Sviluppare sistemi di processo per le colture che evitino l'uso della centrifugazione e liofilizzazione.

9.4 La qualità del prodotto ittico alimentato con le microalghe

La qualità del prodotto ittico è definita da differenti fattori. Questi includono: l'aspetto interiore ed esteriore, la forma, le dimensioni, il valore nutrizionale, la deposizione del grasso, le caratteristiche organolettiche (odore, sapore e consistenza), la freschezza del prodotto e la produttività in filetto. Spesso è difficile delineare la qualità del prodotto ittico in quanto questa è influenzata da differenti fattori endogeni ed esogeni simultaneamente. I fattori endogeni includono: le dimensioni, il sesso, il ciclo vitale e fattori genetici. I fattori esogeni comprendono: l'alimentazione, la densità di popolazione, la temperatura, la salinità, l'attività fisica svolta dal pesce e le fonti di stress esterno (Grigorakis, 2011).

Un'analisi multifattoriale comprendente i parametri ambientali e nutrizionali ha mostrato chiaramente che l'effetto dell'alimentazione sulla qualità del pesce è fortemente dipendente dalle condizioni ambientali e l'interazione tra alimentazione e condizioni ambientali determina il risultato finale (Gardeur et al., 2007).

La parte edibile del pesce è il filetto. Pertanto, la sua composizione è quella che definisce la qualità del pesce. La distribuzione dei depositi di grasso dipende dalle specie ittiche. Le tre forme di grasso (muscolo, periviscerale, peritoneale) sono importanti in termini di qualità del pesce. Nel caso nostro non ci sono state differenze né nella resa in filetto (45%) né nella composizione del filetto tra le spigole alimentate con le due microalghe (*T. suecica* e *Isochrysis* (T-ISO)) e quelle alimentate con la dieta di controllo. Il filetto delle spigole ha mostrato un contenuto in proteine tra il 20-24% e un contenuto in lipidi tra il 7-8%, in entrambe le sperimentazioni svolte. Risultati paragonabili è possibile osservarli nella sperimentazione di Palmegiano et al. (2009) dove la biomassa microalgale di *Isochrysis* (T-ISO) è stata introdotta sostituendo parzialmente la farina di pesce nella dieta delle orate (*Sparus aurata*). In tale sperimentazione *Isochrysis* (T-ISO) si è dimostrata molto digeribile e le orate alimentate con diete a base della microalga, presentavano addirittura una migliore crescita rispetto a quelle alimentate con la normale dieta di controllo e analisi della composizione del filetto di pesce non hanno mostrato differenze significative.

Inoltre la colorazione della livrea e della carne è chiaramente legata alla alimentazione fornita. Infatti la presenza di carotenoidi influenza la colorazione del filetto (Shahidi et al., 1998).

Sebbene le relazioni tra alimentazione e qualità sono complicate a causa dell'influenza dei fattori estrinseci, modificando l'alimentazione e le procedure di manipolazione del prodotto ittico si può intervenire su quella che è la qualità finale del pesce. Ad esempio la deposizione del grasso o la colorazione della livrea e del filetto possono essere regolati con il quantitativo di lipidi e carotenoidi rispettivamente, nella dieta. La qualità del pesce è fortemente influenzata anche dallo stress che esso riceve durante l'abbattimento (Grigorakis, 2011).

Sebbene dalle sperimentazioni di alimentazione della spigola, si siano ottenuti prodotti ittici di qualità anche con diete a base di microalghe, sussiste il problema della digeribilità di questi microrganismi. Le diete a base di *T. suecica* hanno mostrato una minore digeribilità rispetto alla dieta di controllo. Tale problema non è stato riscontrato con *Isochrysis* (T-ISO) né nelle nostre prove né in quelle di Palmegiano et al (2009), in quanto questa microalga possiede una parete estremamente sottile e fragile. Il problema della digeribilità non deve essere trascurato e metodiche per rompere la parete o

processi di coltivazione che rendano questa più fragile e sottile dovranno essere studiati in futuro, in modo da utilizzare microalghe, come *T. suecica*, nell'alimentazione dei pesci.

9.5 Microalghe per l'acquacoltura: pro e contro attuali e prospettive future

Ad oggi, le microalghe possono essere utilizzate in numerose applicazioni commerciali, tra le quali l'acquacoltura. Per poter essere utilizzate in acquacoltura, un ceppo algale deve soddisfare alcuni criteri, tra i quali: facilmente coltivabile e non tossico, della giusta dimensione e forma per essere facilmente ingerito quando destinato alle fasi larvali, avere una elevata qualità nutrizionale con un alto contenuto in proteine e un buon profilo aminoacidico e avere una parete cellulare digeribile per rendere i nutrienti disponibili (Becker, 2004; Patil et al., 2007; Tredici et al., 2009). Infatti le microalghe già utilizzate in tale settore mostrano un contenuto in proteine che oscilla tra 30-52% del peso secco, possiedono un adeguato contenuto in vitamine (A, C, E) ed alcune sono una buona fonte di acidi grassi polinsaturi (EPA e DHA) (Gouveia et al., 2008).

Il principale punto a sfavore nella produzione della biomassa microalgale per l'acquacoltura è il costo. Studi hanno mostrato che il 30-40% dei costi nelle avannotterrie sono dovuti alla produzione delle microalghe.

Il costo di produzione delle microalghe è così alto per diversi motivi, tra i quali:

- la maggior parte delle microalghe utilizzate nelle avannotterrie non crescono in ambienti selettivi e spesso sono prodotti in sistemi di coltura chiusi più costosi
- il clima dove si coltivano le microalghe non è sempre ottimale e quindi spesso si coltivano a luce artificiale e necessitano del controllo della temperatura attraverso sistemi di termostatazione che incidono sul costo di produzione
- I sistemi di coltura normalmente utilizzati (sacchi di polietilene e vasche) hanno un basso rapporto superficie/volume e quindi basse produttività (Borowitzka, 1997).

In futuro si prevede un incremento della richiesta di biomassa microalgale, sia in termini di quantità che diversità. Lo sfruttamento delle risorse ittiche naturali, ha determinato un incremento dell'interesse nella produzione di prodotti ittici mediante il settore

dell'acquacoltura, e quindi ciò determinerà una maggior richiesta di biomassa microalgale. Nuovi ceppi capaci di produrre determinate molecole biologiche importanti saranno isolati e coltivati.

Per ridurre significativamente il costo della biomassa microalgale, ci sono due vie.

La prima via prevede lo studio della coltivazione di ceppi microalgali nuovi o già isolati, in modo da massimizzare le rese in produttività della biomassa o di determinate componenti biologiche. Un grande vantaggio potrebbe derivare da ceppi resistenti alle alte temperature, in grado di ridurre i costi di produzione della biomassa in fotobioreattori, eliminando i costi di termostatazione e inoltre riducendo il potenziale di contaminazione. La seconda via da intraprendere per la riduzione dei costi prevede l'impiego di fotobioreattori economici come il GWP-II, il cui costo è simile alle vasche, per la produzione degli inoculi da utilizzare per lo start-up di vasche produttive, in altre parole utilizzare un sistema combinato FBR-vasche. (Tredici et al., 2009).

Inoltre, per un ulteriore abbassamento del costo di produzione della biomassa, si deve intervenire su alcuni costi operativi (acqua di mare, nutrienti, CO₂..etc).

Perché la biomassa microalgale possa essere utilizzata come ingrediente alimentare nella dieta dei pesci, il suo costo deve arrivare ad 1-1,5 € kg⁻¹. Oggi giorno, siamo ancora lontani da tale prospettiva e perché questo possa essere possibile si deve utilizzare un processo di coltivazione diverso da quanto comunemente adottato per altri impieghi in cui il NER sia molto > di 1 e soprattutto è necessario uno sfruttamento della biomassa nel suo complesso e non solo per ottenere un prodotto/processo specifico.

BIBLIOGRAFIA

- **A.O.A.C.** (1995). Fish and other marine products. Official methods of analysis. *Association of Official Analytical Chemists, Arlington VA Vol. 2, Ch. 35*
- **Abdulquader G., Barsanti L., Tredici M.R.** (2000) – Harvest of *Arthospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. *J. Appl. Phycol.*, 12: 493-498
- **Alasalvar C., Taylor K.D.A., Zubcov E., Shahidi F., Alexis M.** (2002) – Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chem.*, 79: 145–150
- **Annovazzi G., Trincarato A.** (2005) – Profilo del consumatore di pesce fresco. *Acquacoltura API informa*. Anno XX, numero V. pp. 1-2
- **Austin B.** (1992) – Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *J. Fish Diseases*, 15: 55-61
- **Austin B., Day J.G.** (1990) – Inhibition of prawn pathogenic *Vibrio* spp. by a commercial spray-dried preparation of *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture*, 90: 389-292
- **Barsanti L., Gualtieri P.** (2005) – Algae Anatomy, Biochemistry and Biotechnology. (ed. Barsanti e Gualtieri) Taylor & Francis, London, pp. 1-34
- **Barsanti L., Gualtieri P.** (2006).– Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology, (ed. Taylor, Francis Group) CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 215–235
- **Bassi N., Rodolfi L., Chini Zittelli G., Sampietro G., Del Bimbo L., Tredici M.R.** (2010) - The “Green Wall Panel”: potential and limitations of a low-cost disposable photobioreactor. 4th Annual Algae Biomass Summit September 28-30th 2010, Phoenix, AZ, USA
- **Becker E.W.** (1994) – Microalgae Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- **Becker W.** (2004) – Microalgae in Human and Animal Nutrition. In: *Handbook of Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology* (ed. Richmond A.), Blackwell Science Ltd., pp.312-322
- **Bhatnagar A., Chinnasamy S., Singh M., Das K.C.** (2011) – Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Appl. Energy*, 88: 3425-3431

- **Bimbo A. P.** (2012) – Fish meal and oil. In: *The Seafood Industry: Species, Products, Processing, and Safety* (ed. Granata L. A., Flick G. J. e Martin R. E.), Blackwell Publishing Ltd pp. 348-373
- **Biondi N., Bassi N. Chini Zitteli G., de Faveri D., Giovannini A., Rodolfi L, Allevi C., Macrì C., Tredici M.R.** (2012) – *Nannochloropsis* sp. F&M-M24: Oil production, effect of mixing on productivity and growth in an industrial wastewater. *Environ. Prog. Sustainable Energy*. DOI 10.1002/ep.11681
- **Bligh E.G., Dyer W.J.** (1959) - A Rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917
- **Borowitzka M.A.** (1988) - Fats, oils and hydrocarbons. In: *Micro-Algal Biotechnology* (ed. Borowitzka M.A. and Borowitzka L.J.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 257-287
- **Borowitzka M.A.** (1997) – Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *J Appl Phycol.*, 9 (5): 393–401
- **Bosworth B.G.** (2012) – Aquaculture. In: *The Seafood Industry: Species, Products, Processing, and Safety* (ed. Granata L. A., Flick G. J. e Martin R. E.), pp. 318-326 Blackwell Publishing Ltd
- **Bousfield I.J., Smith G.L., Dando T.R., Hobbs G.** (1983). Numerical analysis of total fatty acid profiles in the identification of coryneform, nocardioform and some other bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 375–394
- **Boussiba S., Sandbank E., Shelef G., Cohen Z., Vonshak A., Ben-Amotz A., Arad S., Richmond A.** (1988) - Outdoor cultivation of marine microalgae *Isochrysis galbana* in open reactors. *Aquaculture*, 72: 477-492
- **Brown M. R.** (1991) - The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 145: 79-99
- **Brown M. R.** (2002) - Nutritional Value and Use of Microalgae in Aquaculture. In: Cruz-Suàrez L.E., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M.G., Simoes N. (Eds). *Avances and Nutrición Acuicola VI*. Memorias del VI Simposium internacionatoniol de Nutrición Acuicola. Cancùn, Quintana Roo, Mèxico. pp. 281-292
- **Brown M. R., Jeffrey S. W., Volkman J. K., Dunstan G. A.** (1997) - Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151: 315-331
- **Brown M. R., Miller K. A.** (1992) - The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture. *J. Appl Phycol.*, 4: 205-215

- **Bunthawin S., Ritchie R.J., Wanichapichart P.** (2011) – Dielectrophoresis of *Tetraselmis* sp., a unicellular green alga, in travelling electric fields analyzed using the RC model for a spheroid. *J. Sci. Technol.*, 33(5): 585-597
- **Carballo-Càrdenas C.E., Tuan P.M., Janssen M., Wijffels R.H.** (2003) – Vitamin E (α -tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomol Eng.*, 20:,139-147
- **Cheung Y.H., Wong M.H.** (1981) - Properties of animal manures and sewage sludges and their utilisation for algal growth. *Agr. Waste*, 3: 109–122
- **Chini Zittelli G., Rodolfi L., Tredici M.R.** (2003) - Mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. in annular reactors. *J. Appl. Phycol.*, 15: 107–114
- **Chini Zittelli G., La vista F., Bastianini A., Rodolfi L., Vincenzini M., Tredici M.R.** (1999) – Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. Cultures in outdoor tubular reactors. *J. Biotechnol.*, 70: 299-312
- **Chini Zittelli G., Rodolfi L., Bassi N., Tredici M.R.** (2013) – Photobioreactors for microalgae biofuel production. In: *Algae for Biofuels and Energy* (Borowitzka M. e Moheimani N.ed). Springer, Vol.7
- **Chini Zittelli G., Rodolfi L., Biondi N., Tredici M.R.** (2006) – Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture*, 261: 932-943
- **Chini Zittelli G., Rodolfi L., Tredici M.R.** (2003) - Mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. in annular reactors. *J. Appl. Phycol.* 15: 107-114
- **Cid A., Abolle J., Herrero C.** (1992) – Hight yield mixotrophic cultures of the marine microalga *T. suecica* (Kylin) Butcher (*Prasinophyceae*). *J. Appl. Phycol.*, 4: 31-37
- **Corraze G., Kaushik S.** (2009) – Alimentation lipidique et remplacement des huil de poisson par des végétales en pisciculture. *Cah Agric.*, 18:112-118
- **Coutinho P., Rema P., Otero A., Pereira O., Fàbregas J.** (2006) - Use of biomass of the marine microalga *Isochrysis galbana* in the nutrition of goldfish (*Carassius auratus*) larvae as source of protein and vitamins. *Aquac. Res.*, 37: 793-798
- **Coutteau P., Sorgeloos P.** (1992) – The use of algal substitutes and the requirement for live algae in hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: An international survey', *J Shellfish Res*, 11 (2), 467–476.

- **Coutteau P., VanStappen G. e Sorgeloos P.** (1996) – *Arch. Anim. Nutr.*, 49, 49
- **Culkin F.** (1965) – The major constituents of seawater. In: *Chemical Oceanography* (J.P.Riley and G. Skirrow ed.) Vol. I. Academic, London pp.121-161
- **Day J.G., Edwards A.P., Rodgers G.A.** (1991) – Development of an industrial-scale process for the heterotrophic production of microalgal mollusc feed. *Biores. Technol.*, 38, 245–249
- **Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P. A., Smith F.** (1965) – Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356
- **Fabregas J., Abalde J., Herrero C., CabezasB. E Veiga M.** (1984) - Growth of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentration. *Aquaculture*, 42: 207-215
- **Fabregas J. e Herrero C.** (1986) - Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets. *Aquaculture*, 51: 237-243
- **Fabregas J., Otero A., Morales E., Cordero B, Patino M.** (1996) – *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to Artemia. *Aquaculture*, 143: 197-204
- **FAO** (2012) – World review of fisheries and aquaculture. In: The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agriculture organization of the united nations. Rome, 2012
- **Fenton O., O’hUallachàin D.** (2012) - Agricultural nutrient surpluses as potential input sources to grow third generation biomass (microalgae): A review. *Algal Research*, 1:49-56
- **Folch J., Lees M., Stanley H.S.** (1957) – A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol.Chem.*, 226: 497-509
- **Francis-Floyd, R** (2002) – Fish Nutrition. Florida Cooperative Extension Service, IFAS, University of Florida. EDIS VM114. <http://edis.ifas.ufl.edu/FA096>
- **Fulks W., Main K.L.** (Eds.) (1991) – Rotifer and Microalgae Culture Systems. (Fulks W., Main K.L. Ed.) Proceedings of a U.S.-Asia Workshop. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA. 364 pp.
- **Gardeur J.N., Mathis N., Kobilinsky A., Brun-Bellut J.** (2007). – Simultaneous effects of nutritional and environmental factors on growth and

flesh quality of *Perca fluviatilis* using a fractional factorial design study. *Aquaculture*, 273: 50–63

- **Geri G., Poli B.M., Gualtieri M., Lupi P., Parisi G.** (1995) – Body traits and chemical composition of muscle in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) as influenced by age and rearing environment. *Aquaculture*, 129: 329-333
- **Goksan T., Ak I., Gokpinar S.** (2010) – An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (*Chlorophyceae*). *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20 (9): 1276–1282
- **Gouveia L., Batista A.P., Sousa I., Raymundo A., Bandarra N.M.** (2008) - Microalgae in novel food products. In: *Food Chemistry Research Developments* (ed. Papadopoulos K.N.), Nova Science Publishers, Inc., New York, USA. pp. 75–111
- **Green J. C., Leadbeater B.S.C.** (1994) – The *Haptophyte* algae. *Sist. Ass. Special Vol N° 51*, Clarendon press, Oxford, p.446
- **Grigorakis K.** (2011) – Effects of nutrition and aquaculture practices on fish quality. In: *The Seafood Industry: Species, Products, Processing, and Safety* (ed. Alasalvar C., Shahidi F., Miyashita K., Wanasundara U.), Blackwell Publishing Ltd pp. 82-95
- **Grobbelaar J.U.** (1994) – Turbulence in algal mass cultures and the rate of light/dark fluctuations. *J. Appl. Phycol.*, 6: 331-335
- **Grobbelaar J.U.** (2004) – Algal nutrition In: *Handbook of Microalgal Culture-Biotechnology and Applied Phycology* (Richmond A., ed), Blackwell Science Ltd. pp. 97-115
- **Guillard R.R.L., Ryther J.H.** (1962) – Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.*, 8: 229-239
- **Guschina I.A., Harwood J.L.** (2006) – Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.*, 45: 160-186
- **Halver J. E., Hardy R.W.** (2002) - Fish nutrition. (ed. Halver J. E., Hardy R.W.) Academic Press, New York, NY .
- **Heredia-Arroyo T., Wei W., Hu B.**, (2010) – Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella* protothecoides. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 162 (7): 1978–1995

- **Hillebrand H., Durselen C.D., Kirschtel D., Pollinger U., Zohary T.** (1999) – Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.*, 35: 403-424
- **Holland D.L., Gabbott P.A.** (1971) – A micro-analytical scheme for the determination of protein, carbohydrate, lipid and RNA levels in marine invertebrate larvae. *J. Mar. Biol. Assoc.*, UK 51: 659-668
- **International Standard ISO10253** (1995) – Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*
- **Iyovo G.D., Du G., Chen J.** (2010) – Poultry Manure Digestate Enhancement of *Chlorella Vulgaris* Biomass Under Mixotrophic Condition for Biofuel Production. *J. Microbial.Biochem. Technol.*, 2: 51-57
- **Kester D.R., Duedall I.W., Connors D.N., Pytkowicz R.M.** (1967) - Preparation of artificial seawater. In: *Limnology and Oceanography* Vol. 12, No. 1, pp. 176–178
- **Laing I. e Utting S.D.** (1980) – The influence of salinity on the production of two commercially important unicellular marine algae. *Aquaculture*, 21:79-86
- **Laws E.A., Berning J.L.** (1991) – A Study of the energetics and economics of microalgal mass culture with the marine chlorophyte *Tetraselmis suecica*: Implications for use of power plant stack gases. *Biotechnol. Bioengin.* 37: 936-947.
- **Lehr F., Posten C.** (2009) – Closed photo-bioreactors as tools for biofuel production. *Curr. Opin. Biotech.*, 20: 280-285
- **Lourenço S.O., Lanfer Marquez U.M.m Mancini- Filho J., Barbarino E., Aidar E.** (1997) – Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture*, 248: 153-168
- **Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr L., Randall R.J.** (1951) – Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275
- **Luten J.B., Martinsdóttir E.** (1997) – QIM: a European tool for fish freshness evaluation in the fishery chain. In: Olafsdóttir G., Luten J., Dalgaard P., Careche M., Verrez-Bagnis V., Martinsdóttir E., Heia K. (eds.), Methods to determine the freshness of fish. Proceedings of the Final meeting of the Concerted Action “Evaluation of Fish Freshness”, (ed. Olafsdóttir G., Luten J., Dalgaard P., Careche M., Verrez-Bagnis V., Martinsdóttir E., Heia K.) AIR3CT942283, Nantes, Nov. 12-14: 287-296.

- **Lyman J. e Flemig R.H.** (1940) – Composition of sea water. *J.Mar Res.*, 3: 134-136
- **Mahadevaswamy M., Venkataraman L.V.**(1986) – Bioconversion of poultry droppings for biogas and algal production. *Agr. Waste.*, 18: 93–101
- **Markou G. e Georgakakis D.** (2011) – Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Appl.Energy*, 88: 3389-3401
- **Marsh J.B., Weinstein D.B.** (1966) – Simple charring method for determination of lipid. *J. Lipid. Res.* 7: 574-576
- **Martin C., de la Noüe J., Picard G.** (1985) – Intensive cultivation of freshwater microalgae on aerated pig manure. *Biomass*, 7: 245–59
- **Materassi R., Tredici M.R., Milicia F., Sili C., Pelosi E., Vincenzini M., Torzillo G., Balloni W., Florenzano G., Wagener K.** (1983) – Development of a production size system for the mass culture of marine microalgae. In: *Energy from biomass* (ed. Palz W., Pirrwitz D.). Riedel Publishing Company, Boston, Series E, vol. 5, pp. 150-158.
- **Mazzola A., Marino G.** (2001) – Le specie eurialine In: *Acquacoltura responsabile verso le produzioni acquatiche del terzo millennio* (ed. Cataudella S. e Bronzi P.) pp.547-579.
- **Mojtaba A, Mohd Shamzi M., Rosfarizan M., Raha A.R, Arbakariya B. A.** (2011) – Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.*, 53: 187-195
- **Molina Grima E., Belarbi E.H., F.G. Ación Fernández A.** (2003) Recovery of microalgae biomass and metabolites: process options and economic. *Biotechnol. Adv.*, 20:491-515
- **Molina Grima E., García Camacho F., Ación Fernández F.G.** (1999) – Production of EPA from *Phaeodactylum tricornutum*. In: *Chemicals from Microalgae* (ed. Cohen Z.), London, pp. 1-29
- **Molina Grima E., Martinez E., Sanchez S., Garcia F., Contreras A.** (1991) – The influence of temperature and the initial N:P ratio on the growth of microalgae *Tetraselmis* sp. *Process. Biochem.*, 26: 183-187
- **Montaini E., Chini Zittelli G., Tredici M.R., Molina Grima E., fernandez-Sevilla J.M., Sanchez Perez J.A.** (1995) – Long-term preservation of

- Tetraselmis suecica*: influence of storage on viability and fatty acid profile. *Aquaculture*, 134: 81-90
- **Morrison R., Smith M.L.** (1964) - Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.*, 5: 600-608
 - **Mulbry W., Kondrad S., Pizarro C., Kebede-Westhead E.** (2008) - Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresour Technol.*, 99: 8137–8142
 - **Muller-Feuga A., Moal J., Kaas R.** (2003) – The microalgae of aquaculture. In *Live feeds in marine aquaculture* (Ed. Støttrup J., McEvoy L. A.) , Oxford, Blackwell Science, 206–252.
 - **Natrah F.M.I., Yusoff F.M., Shariff M., Abas F., Mariana N.S.** (2007) – Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *J. Appl. Phycol.*, 19: 711-718
 - **Oliva-Teles A.** (2000) – Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. *Aquacult. Int.*, 8: 477-492
 - **Orban E.** (2011) – I prodotti della pesca e dell’acquacoltura e della nutrizione umana In: *Lo stato della pesca e dell’acquacoltura nel mare italiano* (ed. Cataudella S. e Spagnolo M.) Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali.
 - **Orban E., Di Lena G., Navigato T., Masci M., Sinesio F., Casini I.** (2001) – Nutrizione umana ed acquacoltura In: *Acquacoltura responsabile verso le produzioni acquatiche del terzo millennio* (Cataudella S. e Bronzi P. ed.), pp.239-254.
 - **Otero A., Fàbregas J.** (1997) - Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture*, 159: 111-123
 - **Palmegiano G.B., Gai F., Gasco L., Lembo G., Spedicato M.T., Trotta P., Zoccarato I.** (2009) – Partial replacement of fish meal by T-Iso in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles diets. *Ital. J. Anim. Sci.*, 8 (2): 869–871
 - **Patil V., Kallqvist T., Olsen E., Votg G., Gislerød H.R.** (2007) – Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquacult. Int.*, 15: 1–9.

- **Patterson G.W., Tsitsa-Tzardis E., Wilkfors G.H., Gladu P.K., Chitwood D.J., Harrison D.** (1993) – Sterols of *Tetraselmis* (*Prasinophyceae*). *Comp. Biochem. Physiol.*, B 105: 253-255
- **Pearson T.R., Strickland J.H.D.** (1963) – Discussion of Spectrophotometric determination of marine plant pigments with revised equation ascertaining chlorophyll and carotenoides. *J. Mar. Resour.*, 12: 121-130
- **Pedroni P.M., Lamenti G., Proserpi G., Ritorto L., Scolla G., Capuano F., Valdiserri M.** (2004) - Enitecnologie R & D project on microalgae biofixation of CO₂: outdoor comparative tests of biomass productivity using flue gas CO₂ from a NGCC power plant. Proceedings of Seventh International Conference on Greenhouse Gas Control Technologies (GHGT-7), 5–9 September 2004, Vancouver, Canada
- **Perez-garcia O., Escalante F. M. E., de- Bashan I., Bashan Y.** (2011) – Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.*45: 11-36
- **Pesando D.** (1990) – Antibacterial and antifungal activities of marine algae. In: *Introduction to Applied Phycology* (Akatsuka I. ed.). pp. 3-26
- **Poli B.M., Parisi G., Zampacavallo G, Mecatti M., Lupi P., Gualtieri M., Franci O.** (2001) - Quality outline of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reared in Italy: shelf life, edible yield, nutritional and dietetic traits. *Aquaculture*, 202: 303-315
- **Poli B.M., Parisi G., Scappini F., Zampacavallo G.** (2005) – Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquacult. Int.*, 13: 29-49
- **Poli B.M., Parisi G., Giorgi G., Galigani I., Michelotti D., Bonelli A., Costantini L.** (2008) – Studio dei parametri morfologici/merceologici e di adiposità generale della Spigola allevata ad Orbetello per l'individuazione di indici semplici, non distruttivi e poco costosi, utili alla definizione di standard di qualità da utilizzare in schemi di certificazione. *Aquacoltura in Toscana. Studi e analisi di settore*, Firenze (Italia), ARSIA, pp.147-162
- **Poli B. M.** (2011) – Qualità totale nella filiera ittica. In: , *Lo stato della pesca e dell'acquacoltura nel mare italiano* (Cataudella S. e Spagnolo M. ed.), Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

- **Pulz O., Gross W.** (2004) – Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Biotechnol.*, 65: 635-648
- **Pushparaj B., Pelosi E., Tredici M.R., Pinzani E., Materassi R.** (1997) – An integrated culture system for outdoor production of microalgae and cyanobacteria. *J. Appl. Phycol.* 9: 113-119
- **Qiang H. & Richmond A.** (1994) - Optimizing the population density in *Isochrysis galbana* grown outdoor in a glass column photobioreactor. *J. Appl. Phycol.*, 6: 391-396
- **Regolamento (CE) n° 1967/2006** del consiglio, 21 dicembre 2006
- **Regolamento (CE) n° 2406/1996** del consiglio, 26 novembre 1996
- **Regolamento (CE) n°1224/2009** del consiglio, 20 novembre 2009
- **Regolamento (CE) n° 2081/92** del consiglio, 14 luglio 1992
- **Regolamento (CE) n° 1774/2002** del consiglio, 3 ottobre 2002
- **Richardson J.W., Johnson M.D., Outlaw J.L.** (2012) – Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactors for profitable production of algae for transportation fuels in the Southwest. *Algal Res.*, 1: 93-100
- **Robert R., Parisi G., Rodolfi L., Poli B.M., Tredici M.R.** (2001) – Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture.*, 192: 333-346
- **Rodolfi L., Chini Zittelli G., Barsanti L., Rosati G., Tredici M. R.** (2003) – Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. *Biomol. Eng.*, 20:243-248
- **Rodolfi L., Chini Zittelli G., Biondi N., Tredici M.R.** (2006) – High surface-to-volume ratio photobioreactors used at the University of Florence for the cultivation of microalgae. Abstract of Aqua 2006 International Conference & Exhibition, Florence, Italy, 9-13 May, 2006, p.795
- **Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Del Bimbo L., Tredici M.R.** (2008) – The “Green Wall” Panel. Abstracts of the 11th International Conference on Applied Phycology, June 22-27, 2008, Galway, Ireland, p. 93
- **Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R.** (2009) – Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, pp.100-112

- **Schipp G.** (2008) – Is the use of fishmeal and fish oil in aquaculture diets sustainable?, North. Territory Gov., 124, 1–15
- **Sen B., Kocer M.A.T., Alp M.T.** (2005) – Studies on growth of marine microalgae in batch cultures: IV. *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (Prasinophyta). *Asian J. Plant Sciences*, 4: 645-647
- **Shahidi F.D., Metusalach, Brown J.A.** (1998) – Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. *Crit. Rev. food Sci.*, 38: 1–67.
- **Sialve B., Bernet N., Bernard O.** (2009) – Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnol Adv.*, 27:409–16.
- **Singh M., Reynolds D.L., Das K.C.** (2011) – Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.*, 102: 10841-10848
- **Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A.** (2006) – Commercial applicatins of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.*, 101,2: 87-96
- **Sukenik A., Wahnou R.** (1991) – Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97:61-72
- **Sukenik A., Wahnou R.** (1991) – Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97: 61–72.
- **Tibaldi E., Lanari D., D’Agaro E., Balestrazzi R.** (2001) – Nutrizione in acquacoltura In:., Acquacoltura responsabile verso le produzioni acquatiche del terzo millennio (Cataudella S. e Bronzi P. ed.) pp.144-175
- **Tibaldi E., Hakim Y., Uni Z., Tulli F., de Francesco M., Luzzana U., Harpaz S.** (2006) – Effects of the partial substitution of dietary fish meal by differently processed soybean meals on growth performance, nutrient digestibility and activity of intestinal brush border enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 261: 182-193
- **Tredici M.R., Chini Zittelli G.** (1997) – Cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* in flat plate reactors. In: *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): *Physiology, Cell-biology and Biotechnology* (Vonshak A. ed.), Taylor & Francis, London. pp. 117-130

- **Tredici M.R., Chini Zittelli G.** (1998) – Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 57: 187-197
- **Tredici M.R.** (2004) - Mass production of microalgae: Photobioreactors. In: *Handbook of Microalgal Culture- Biotechnology and Applied Phycology* (Richmond A., ed), Blackwell Science Ltd., pp. 178-214
- **Tredici, M. R., Rodolfi, L.** (2004) – Reactor for industrial culture of photosynthetic micro-organism. Brevetto WO2004/074423
- **Tredici M.R.** (2007) – Biodiesel da microalghe: vero o falso? Agro-Energie- Nuove opportunità per la valorizzazione delle risorse del settore agricolo, 25 settembre 2007, Roma
- **Tredici M., Rodolfi L. Sanpietro G.,** (2009) – Fotobioreattori a basso costo per la coltura di microalghe. Brevetto italiano. Assegnato a Fotosintetica & Microbiologica
- **Tredici M.R., Biondi N., Ponis E., Rodolfi L., Chini Zittelli G.** (2009) – Advances in microalgal culture for aquaculture feed and other uses. In: *New technologies in aquaculture* (ed. Burnell G. & Allan G.), Best-set Typesetter Ltd., Hong Kong., pp 610-676
- **Tredici M., Rodolfi L., Sampietro G., Bassi N** (2010) – Low-cost photobioreactor for microalgae cultivation. Patent WO2011/013104. Applicant: Fotosintetica & Microbiologica S.r.l.
- **Tredici M.R.** (2010) – Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution. *Future Science - Biofuels* 1: 143–162
- **Tredici M.R., Chini Zittelli G., Rodolfi L.** (2010) - Photobioreactors. In: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology* (ed. Flickinger M.C.), J. Wiley & Sons Inc., New York, USA. Vol 6 pp. 3821–3838
- **Ukeless R., Rose W.E.** (1976) – Observtions on organic carbon utilization by photosynthetic marine microalgae. *Mar.Biol.*, 37: 11-23
- **Van Bergeijk S. A., Salas-Leiton, Canavate J.P.** (2010) - Low and variable productivity and low efficiency of mass cultures of the haptophyte *Isochrysis* aff. galbana (T-ISO) in outdoor tubular photobioreactors. *Aquac. Eng.*, 43: 14-23
- **Venkataraman L.V., Madhavi Devi K., Mahadevaswamy M., Mohammed Kunhi A.A.** (1982) – Utilisation of rural wastes for algal biomass production

- with *Scenedesmus acutus* and *Spirulina platensis* in India, *Agr. Waste*, 4: 117–130.
- **Wang H., Xiong H., Hui Z., Zen X.** (2012) – Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids. *Bioresource Technol.*, 104: 215–220
 - **Weissman J.C., Goebel R.P.** (1987) – Design and analysis of pond system for the purpose of producing fuels. Final Report, *Solar Energy Res. Inst.*, Golden CO, SERI/STR, pp. 231-2840
 - **William P.J.B., Laurens L.M.L.** (2010) – Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy Environ. Sci.*, 3: 554-590
 - **Woetz, I., Feffer, A., Lundquist, T., & Nelson, Y.** (2009) – Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. *J. Environ. Eng.*, 135: 1115–1122
 - **Xie J., Zhang Y., Li Y., Wang Y.** (2001) – Mixotrophic cultivation of *Platymonas subcordiformis*. *J. Appl. Phycol.*, 13: 343-347
 - **Yildiz M., Sener, E., Timur M.** (2008) – Effects of differences in diet and seasonal changes on the fatty acid composition in fillets from farmed and wild sea bream (*Sparus aurata* L.) and sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Int. J. Food Sci. Technol.*, 48: 853–858
 - **Zhu C. J., Lee Y. K., Chao T. M.** (1997) - Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *J. Appl. Phycol.*, 9: 541-457
 - **Zhukova N.V., Aizdacher N.A.** (1995) – Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochem.*, 39: 351-356
 -

RINGRAZIAMENTI

Il primo non posso non farlo alla persona alla quale ho dedicato questa tesi, me stessa. Grazie alla mia caparbia e determinazione sono riuscita a finire questo percorso di tre anni. Ringrazio tutti coloro che hanno permesso la fattibilità di questo lavoro:

- Prof. Tredici Mario e Dott.ssa Chini Zittelli Graziella perché, mi hanno permesso di fare un bel percorso di Dottorato, mi hanno arricchito ulteriormente con le loro conoscenze e sono stati disponibili
- Fotosintetica & Microbiologica s.r.l. per avermi fornito alcuni dei ceppi sul quale è stata svolta la sperimentazione
- Roquette per avermi fornito alcuni dei ceppi sul quale è stata svolta la sperimentazione
- Archimede Ricerche s.r.l per avermi permesso di svolgere parte della sperimentazione presso l'impianto a GWP e in particolare ringrazio il Dott. Mangini per la sua disponibilità ed accoglienza
- Prof. Tibaldi e Prof.ssa Poli per avermi permesso di svolgere la sperimentazione sull'alimentazione della spigola presso il Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università degli Studi di Udine

Ringrazio tutti coloro che mi hanno appoggiato supportato ed incoraggiato in questi anni.

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori e a mia sorella Ilaria che hanno dovuto sopportare tutti i miei cambiamenti di umore, che hanno sempre ascoltato con tanta pazienza le mie lamentele, ma che mi hanno sempre incoraggiato e aiutato ad andare avanti. So che non è stato facile per loro!

Ringrazio i miei due amici Valentina ed Emanuele che non mi hanno mai lasciata sola nei momenti di bassa sia affettivi che lavorati di questi tre anni e mi hanno dato la forza per andare avanti lasciandomi sempre libera di dare sfogo alle mie sensazioni ed emozioni.

Ringrazio le mie colleghe Cristina (che è tre anni che mi sopporta!), Giulia, Sara, Emma e Cecilia con cui ho condiviso molto tempo a lavoro ed extra-lavoro e con le quali sono nate belle amicizie che tuttora vanno avanti.

Ringrazio tutti i miei parenti che hanno creduto in me incoraggiandomi sempre.
Ringrazio tutti i miei amici che mi hanno riscaldato con i loro calore e mi hanno sempre incitato e fatto forza.

Ringrazio tutte le persone del CNR con cui ho condiviso molti momenti e che mi hanno accolto tutte le mattine con il sorriso.