

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”



Scuola Politecnica e delle Scienze di Base

Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata

XXVIII Ciclo

Tesi di Dottorato

Studi metabolici e applicazioni bioenergetiche di diatomee marine

Coordinatore

Ch.mo Prof.
Ezio Ricca

Candidato

Dott.
Pierpaolo Botte

Tutor

Dott.
Angelo Fontana

Anni accademici 2013/2016

INDICE

ABBREVIAZIONI	pag. 1
ABSTRACT	pag. 4
1. INTRODUZIONE	pag. 6
1.1 DIATOMEE	pag. 6
<i>1.1.1 Caratteristiche generali</i>	pag. 6
<i>1.1.2 Caratteristiche della struttura, della parete cellulare e del protoplasto delle diatomee</i>	pag. 9
<i>1.1.3 Composizione chimica cellulare</i>	pag. 13
<i>1.1.4 Riproduzione e curva di crescita delle diatomee</i>	pag. 15
<i>1.1.5 Ruolo ecologico delle diatomee</i>	pag. 18
1.2 APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE DELLE DIATOMEE	pag. 24
<i>1.2.1 Principali applicazioni biotecnologiche non energetiche delle diatomee</i>	pag. 24
<i>1.2.2 Problema energetico e fonti rinnovabili: applicazioni biotecnologiche energetiche delle diatomee</i>	pag. 27
<i>1.2.3 Produzione di bio-oli per il biodiesel</i>	pag. 28
1.3 OBIETTIVI DEL LAVORO DI TESI DOTTORALE	pag. 35
2. SELEZIONE DELLE SPECIE MODELLO	pag. 37
2.1 INTRODUZIONE	pag. 37
<i>2.1.1 Screening tra microalghe e diatomee per la selezione delle specie modello</i>	pag. 37
2.2 RISULTATI E DISCUSSIONI	pag. 38
<i>2.2.1 Selezione delle specie modello</i>	pag. 38
2.3 CONCLUSIONI	pag. 46

3. INFLUENZA DI GAS (CO₂) E NUTRIENTI NELLE COLTURE DELLE SPECIE MODELLO	pag. 47
3.1 INTRODUZIONE	pag. 47
3.1.1 <i>Caratteristiche ed equilibri chimici dell'anidride carbonica</i>	pag. 47
3.1.2 <i>Effetti della CO₂ sulla fisiologia delle diatomee</i>	pag. 50
3.1.3 <i>Effetti dei nutrienti sulla fisiologia delle diatomee</i>	pag. 55
3.1.4 <i>Obiettivi dell'attività sperimentale: studio degli effetti di CO₂ e nutrienti nelle colture delle specie modello</i>	pag. 58
3.2 RISULTATI E DISCUSSIONI	pag. 61
PARTE I – EFFETTO CO₂ E NUTRIENTI	pag. 61
3.2.1 <i>Crescite di controllo di T. weissflogii e C. cryptica in condizioni caratterizzate da Basso Regime di Nutrienti (BRN)</i>	pag. 61
3.2.2 <i>Crescite di T. weissflogii e C. cryptica in condizioni caratterizzate da Basso Regime di Nutrienti (BRN) e 10% di CO₂</i>	pag. 64
3.2.3 <i>Crescite di T. weissflogii e C. cryptica in condizioni caratterizzate da Alto Regime di Nutrienti (ARN)</i>	pag. 69
3.2.4 <i>Crescite di T. weissflogii e C. cryptica in doppia fase con diverse combinazioni di Alto Regime di Nutrienti (ARN), insufflazione di CO₂ al 10% e Sospensione Aggiunta Nutrienti (SAN)</i>	pag. 73
3.2.5 <i>Confronto riassuntivo per T. weissflogii e C. cryptica tra le varie combinazioni di Basso e Alto Regime di Nutrienti, Sospensione Aggiunta Nutrienti e CO₂ al 10%</i>	pag. 80
PARTE II – EFFETTO DEPRIVAZIONE SELETTIVA	pag. 83
3.2.6 <i>Effetto combinato della CO₂ e della limitazione selettiva di nutrienti (silicati, nitrati o fosfati) nelle colture delle specie selezionate</i>	pag. 83
3.2.6.1 <i>Andamento delle curve di crescita e analisi biochimiche della biomassa di T. weissflogii e C. cryptica</i>	pag. 84
3.2.6.2 <i>Analisi elementare (CHNS) e TOC (Carbonio Organico Totale) delle biomasse</i>	pag. 88
3.2.6.3 <i>Osservazioni al microscopio ottico, marcatura delle gocce lipidiche con il reattivo fluorescente BODIPY e analisi NMR per la determinazione lipidica</i>	pag. 93
3.3 CONCLUSIONI	pag. 99

4. STUDI METABOLICI – ANALISI LIPIDOMICA	pag. 102
4.1 INTRODUZIONE	pag. 102
<i>4.1.1 Caratteristiche delle componenti lipidiche di base: gli acidi grassi</i>	pag. 102
<i>4.1.2 Biosintesi degli acidi grassi</i>	pag. 105
<i>4.1.3 Biosintesi dei glicerolipidi di membrana</i>	pag. 107
<i>4.1.4 Biosintesi dei lipidi neutri in microalghe e diatomee</i>	pag. 109
<i>4.1.5 Obiettivi dell'attività sperimentale: analisi qualitativa e quantitativa delle varie classi lipidiche mediante Cromatografia Liquida ad Ultra Alta Prestazione/ Spettrometria di Massa ad Alta Risoluzione (UHPLC/HRMS)</i>	pag. 114
4.2 RISULTATI E DISCUSSIONI	pag. 117
PARTE I – CONFRONTO CO₂ vs ARIA	pag. 117
<i>4.2.1 Analisi degli andamenti e della composizione biochimica delle biomasse di C. cryptica nelle condizioni di crescita Aria e CO₂</i>	pag. 117
<i>4.2.1.1 Andamento delle curve di crescita e analisi biochimiche della biomassa</i>	pag. 117
<i>4.2.1.2 Analisi elementare (CHNS), TOC (Carbonio Organico Totale) e Tasso di fissazione della CO₂ (P_{CO2})</i>	pag. 119
<i>4.2.1.3 Analisi NMR per la determinazione lipidica</i>	pag. 120
<i>4.2.2 Analisi lipidomica: determinazione della composizione e della variazione in acidi grassi delle singole specie delle varie classi lipidiche di C. cryptica</i>	pag. 121
PARTE II – CONFRONTO –N e –Si vs CO₂	pag. 130
<i>4.2.3 Analisi degli andamenti e della composizione biochimica delle biomasse di C. cryptica nelle condizioni di crescita –N e –Si</i>	pag. 130
<i>4.2.3.1 Andamento delle curve di crescita e analisi biochimiche della biomassa</i>	pag. 130
<i>4.2.3.2 Analisi elementare (CHNS), TOC (Carbonio Organico Totale) e Tasso di fissazione della CO₂ (P_{CO2})</i>	pag. 133
<i>4.2.3.3 Analisi NMR per la determinazione lipidica</i>	pag. 134
<i>4.2.4 Analisi lipidomica: determinazione della composizione e della variazione in acidi grassi delle singole specie delle varie classi lipidiche di C. cryptica</i>	pag. 136
<i>4.2.5 Valutazioni su remodeling e sintesi de novo dei lipidi in C. cryptica</i>	pag. 142
<i>4.2.6 Acidi grassi come valore aggiunto per applicazioni biotecnologiche</i>	pag. 145
4.3 CONCLUSIONI	pag. 147

5. STUDI METABOLICI – ANALISI TRASCRIPTOMICA	pag. 150
5.1 INTRODUZIONE	pag. 150
<i>5.1.1 Diatomee e biologia molecolare</i>	pag. 150
<i>5.1.2 Obiettivi dell'attività sperimentale: assemblaggio de novo del trascrittoma di <i>C. cryptica</i> cresciuta in Regime Controllato di Nutrienti in presenza di aria o CO₂ 10% (v/v) e in doppia fase con deprivazione selettiva di silicati o nitrati</i>	pag. 152
5.2 RISULTATI E DISCUSSIONI	pag. 155
<i>5.2.1 Assemblaggio de novo del trascrittoma di <i>C. cryptica</i> cresciuta in Regime Controllato di Nutrienti in presenza di aria o CO₂ al 10% e in doppia fase con deprivazione selettiva di silicati o nitrati</i>	pag. 155
<i>5.2.2 Analisi differenziale dei livelli di espressione delle isoforme nella condizione B vs A (CO₂ vs Aria)</i>	pag. 158
<i>5.2.3 Analisi differenziale dei livelli di espressione delle isoforme nella condizione C vs B (-Si vs CO₂)</i>	pag. 163
<i>5.2.4 Analisi differenziale dei livelli di espressione delle isoforme nella condizione D vs B (-N vs CO₂)</i>	pag. 167
5.3 CONCLUSIONI	pag. 172
5.4 APPENDICE	pag. 175
6. SCALE-UP PRE-INDUSTRIALE DI COLTURE DI DIATOMEE PER LA PRODUZIONE DI BIO-OLI	pag. 177
6.1 INTRODUZIONE	pag. 177
<i>6.1.1 Colture intensive di diatomee su grande scala</i>	pag. 177
<i>6.1.2 Sistemi aperti: caratteristiche e limiti degli open ponds</i>	pag. 179
<i>6.1.3 Sistemi chiusi: caratteristiche e limiti dei fotobioreattori</i>	pag. 181
<i>6.1.4 Influenza di luce e temperatura sulle colture intensive delle diatomee</i>	pag. 188
<i>6.1.5 Metodi di raccolta della biomassa</i>	pag. 191

6.2 ATTIVITA' SPERIMENTALE IN CAMPO	pag. 193
<i>6.2.1 Individuazione dell'area da utilizzare per lo scale-up in campo delle colture di diatomee e caratteristiche tecniche del fotobioreattore e del sistema di coltura scelto per le colture intensive</i>	pag. 193
<i>6.2.2 Obiettivi dello studio applicativo in campo</i>	pag. 197
6.3 RISULTATI E DISCUSSIONI	pag. 199
<i>6.3.1 Analisi delle biomasse ottenute dalle colture intensive in campo</i>	pag. 199
<i>6.3.2 Confronto delle produttività di biomassa annuali tra diversi tipi di impianti in campo</i>	pag. 209
6.4 CONCLUSIONI	pag. 212
7. CONCLUSIONI FINALI	pag. 214
8. MATERIALI E METODI	pag. 218
8.1 SISTEMI PER LA CRESCITA INDOOR DELLE DIATOMEE	pag. 218
<i>8.1.1 Ottimizzazione del sistema di lavoro per colture di diatomee con gas (CO₂)</i>	pag. 218
<i>8.1.2 Caratteristiche della cappa chimica</i>	pag. 224
<i>8.1.3 Caratteristiche della cella climatica</i>	pag. 225
8.2 CEPPI UTILIZZATI PER LA SPERIMENTAZIONE E PREPARAZIONE DEI MEZZI DI CRESCITA	pag. 226
<i>8.2.1 Ceppi utilizzati</i>	pag. 226
<i>8.2.2 Preparazione inoculi e mezzi di crescita con acqua di mare naturale</i>	pag. 226
<i>8.2.3 Mezzo di coltura standard f/2</i>	pag. 228
8.3 PROVE DI CRESCITA PER LA VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI CO₂ E NUTRIENTI SULLA FISIOLOGIA DELLE DIATOMEE	pag. 229
<i>8.3.1 Crescite per le curve di controllo a Basso Regime di Nutrienti (BRN)</i>	pag. 229
<i>8.3.2 Crescite per le curve a Basso Regime di Nutrienti (BRN) con CO₂ al 10%</i>	pag. 230
<i>8.3.3 Crescite ad Alto Regime di Nutrienti (ARN)</i>	pag. 230
<i>8.3.4 Crescite in doppia fase ad Alto Regime di Nutrienti seguito da Sospensione Aggiunta Nutrienti (ARN + SAN)</i>	pag. 230

8.3.5 <i>Crescite in doppia fase ad Alto Regime di Nutrienti seguito da Sospensione Aggiunta Nutrienti ma in presenza di CO₂ al 10% (ARN + SAN (CO₂))</i>	pag. 231
8.3.6 <i>Crescite in doppia fase ad Alto Regime di Nutrienti con CO₂ al 10% seguito da Sospensione Aggiunta Nutrienti in presenza di CO₂ al 10% (ARN (CO₂) + SAN (CO₂))</i>	pag. 231
8.3.7 <i>Crescite in doppia fase ad Alto Regime di Nutrienti con CO₂ al 10% seguito da deprivazione selettiva di silicati, fosfati o nitrati in presenza di CO₂ al 10%</i>	pag. 231
8.3.8 <i>Crescite di C. cryptica per le analisi di lipidomica e trascrittomica</i>	pag. 232
8.4 TECNICHE PER IL MONITORAGGIO DELLE CRESCITE CELLULARI	pag. 233
8.4.1 <i>Metodi diretti e indiretti per la determinazione cellulare</i>	pag. 233
8.4.2 <i>Recupero della biomassa per le analisi biochimiche</i>	pag. 234
8.5 ANALISI BIOCHIMICHE DELLE COMPONENTI CELLULARI	pag. 235
8.5.1 <i>Determinazione del contenuto di carboidrati (Metodo di DuBois)</i>	pag. 235
8.5.2 <i>Determinazione del contenuto proteico (Metodo di Lowry)</i>	pag. 235
8.5.3 <i>Determinazione del contenuto lipidico totale (Estrazione di Folch modificata)</i>	pag. 236
8.5.4 <i>Determinazione del contenuto lipidico totale (Metodo Metil-Tert-ButilEtere – MTBE)</i>	pag. 237
8.5.5 <i>Analisi quantitativa e qualitativa dei lipidi totali mediante Risonanza Magnetica Nucleare (¹H-NMR)</i>	pag. 238
8.5.6 <i>Analisi qualitativa e quantitativa delle varie classi lipidiche con UHPLC/HRMS</i>	pag. 239
8.5.7 <i>Hierarchical Cluster Analysis dei dati qualitativi e quantitativi ottenuti con UHPLC/HRMS</i>	pag. 240
8.5.8 <i>Marcatura delle gocce lipidiche con il reattivo fluorescente BODIPY</i>	pag. 241
8.5.9 <i>Analisi elementare (CHNS) e del Carbonio Organico Totale (TOC) della biomassa</i>	pag. 241
8.5.10 <i>Tasso di fissazione della CO₂</i>	pag. 243
8.6 DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEI MACRONUTRIENTI INORGANICI (SILICATI, NITRATI E FOSFATI)	pag. 244
8.6.1 <i>Determinazione quantitativa dei silicati</i>	pag. 244
8.6.2 <i>Determinazione quantitativa dei nitrati</i>	pag. 245
8.6.3 <i>Determinazione quantitativa dei fosfati</i>	pag. 246
8.7 ANALISI BIOMOLECOLARI	pag. 247
8.7.1 <i>Assemblaggio de novo del trascrittoma e successiva analisi differenziale dei trascritti</i>	pag. 247
BIBLIOGRAFIA	pag. 248

ABBREVIAZIONI

SPECIE BIOLOGICHE

- ❖ *Nannochloropsis salina* = *N. salina*
- ❖ *Cylindrotheca fusiformis* = *C. fusiformis*
- ❖ *Chlamydomonas reinhardtii* = *C. reinhardtii*
- ❖ *Dunaliella salina* = *D. salina*
- ❖ *Dunaliella tertiolecta* = *D. tertiolecta*
- ❖ *Chaetoceros muelleri* = *C. muelleri*
- ❖ *Phaeodactylum tricornutum* = *P. tricornutum*
- ❖ *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* = *P. pseudodelicatissima*
- ❖ *Thalassiosira weissflogii* = *T. weissflogii*
- ❖ *Thalassiosira rotula* = *T. rotula*
- ❖ *Thalassiosira pseudonana* = *T. pseudonana*
- ❖ *Cyclotella cryptica* = *C. cryptica*
- ❖ *Arabidopsis thaliana* = *A. thaliana*

LIPIDI

- ❖ Monogalattosildiacilgliceroli = MGDG
- ❖ Digalattosildiacilgliceroli = DGDG
- ❖ Sulfoquinosildiacilgliceroli = SQDG
- ❖ Glicolipidi = GL
- ❖ Fosfatidilcolina = PC

- ❖ Fosfatidilinositoli = PI
- ❖ Fosfatidilgliceroli = PG
- ❖ Fosfolipidi = PL
- ❖ Monoacilgliceroli = MAG
- ❖ Diacilgliceroli = DAG
- ❖ Triacilgliceroli = TAG
- ❖ Acidi grassi liberi = FFA
- ❖ Acidi grassi totali = TFA
- ❖ Acidi grassi polinsaturi = PUFA
- ❖ Acido eicosapentaenoico = EPA
- ❖ Acido docosaesaenoico = DHA
- ❖ Esteri metilici degli acidi grassi = FAME

CONDIZIONI DI CRESCITA

- ❖ Basso Regime di Nutrienti = BRN
- ❖ Basso Regime di Nutrienti con CO₂ 10% (v/v) = BRN (CO₂)
- ❖ Alto Regime di Nutrienti = ARN
- ❖ Alto Regime di Nutrienti + Sospensione Aggiunta Nutrienti = ARN + SAN
- ❖ Alto Regime di Nutrienti + Sospensione Aggiunta Nutrienti con CO₂ 10% (v/v) = ARN + SAN (CO₂)
- ❖ Alto Regime di Nutrienti con CO₂ 10% (v/v) + Sospensione Aggiunta Nutrienti con CO₂ 10% (v/v) = ARN (CO₂) + SAN (CO₂)
- ❖ Alto Regime di Nutrienti con CO₂ 10% (v/v) + Deprivazione Selettiva di NaNO₃ con CO₂ 10% (v/v) = -N

- ❖ Alto Regime di Nutrienti con CO₂ 10% (v/v) + Deprivazione Selettiva di NaH₂PO₄ con CO₂ 10% (v/v) = -P
- ❖ Alto Regime di Nutrienti con CO₂ 10% (v/v) + Deprivazione Selettiva di Na₂SiO₃ con CO₂ 10% (v/v) = -Si
- ❖ Regime Controllato di Nutrienti = Aria
- ❖ Regime Controllato di Nutrienti con CO₂ 10% (v/v) = CO₂
- ❖ Regime Controllato di Nutrienti con CO₂ 10% (v/v) + Deprivazione Selettiva di Na₂SiO₃ con CO₂ 10% (v/v) = -Si
- ❖ Regime Controllato di Nutrienti con CO₂ 10% (v/v) + Deprivazione Selettiva di NaNO₃ con CO₂ 10% (v/v) = -N

ABSTRACT

Le diatomee sono organismi unicellulari fotoautotrofi eucarioti caratterizzati da un particolare scheletro siliceo. Costituiscono il più grande gruppo del fitoplancton marino e svolgono un ruolo ecologico essenziale costituendo la base della catena trofica marina e contribuendo al mantenimento dei cicli geochimici oceanici. Sono inoltre considerate i più efficienti organismi fotosintetici e da sole sono responsabili di circa un quarto dell'assorbimento dell'anidride carbonica fissata sul pianeta.

La presente tesi dottorale ha la finalità di studiare il potenziale ruolo biotecnologico delle diatomee. In particolare, considerata la crescente preoccupazione per gli effetti dell'innalzamento dei gas climalteranti nell'atmosfera e i conseguenti scompensi causati dal riscaldamento globale, l'attività di ricerca è stata indirizzata allo studio del metabolismo lipidico nelle diatomee marine e alla capacità di questi organismi di poter essere utilizzate come materiale organico per la produzione di bio-oli da convertire in biocarburanti.

La tesi comprende concettualmente tre fasi organizzate intorno a:

- selezione dei ceppi e valutazione delle potenzialità metaboliche e della produttività lipidica;
- studio della sintesi lipidica e dei fattori biochimici e molecolari connessi alla plasticità metabolica;
- utilizzo per applicazioni biotecnologiche ed energetiche.

Per la selezione dei ceppi modello, è stata testata la produttività in biomassa e lipidi di 21 ceppi microalgali, di cui 17 diatomee e 4 microalghe verdi. Il confronto dei dati effettuato attraverso metodi statistici basati sull'analisi multivariata ha permesso di selezionare due diatomee centriche, *Thalassiosira weissflogii* e *Cyclotella cryptica*, come potenziali candidati per la produzione di biomasse e bio-oli (d'Ippolito *et al.* 2015). Queste potenzialità sono state quindi testate attraverso un complesso schema di esperimenti finalizzati all'ottimizzazione della coltivazione e allo studio degli

effetti dell'anidride carbonica e della deprivazione o limitazione di azoto, fosforo e silicio sulla produzione delle biomasse e di lipidi, in particolare triacilgliceroli, con entrambe le specie.

Risultati incoraggianti sono stati ottenuti con entrambe le specie raggiungendo valori massimi di produttività in biomassa liofila di circa 121.4 mg L⁻¹ giorno⁻¹ e 22.1 mg L⁻¹ giorno⁻¹ di estratto lipidico per *T. weissflogii* e di 75.0 mg L⁻¹ giorno⁻¹ e di 24.9 mg L⁻¹ giorno⁻¹, rispettivamente, per *C. cryptica* (Botte *et al.*, manoscritto in preparazione). Questi studi hanno anche evidenziato la straordinaria resilienza delle diatomee a differenti condizioni ambientali e di coltivazione, dimostrando un'inusuale versatilità delle vie biochimiche e plasticità nella regolazione del metabolismo.

Per approfondire questi aspetti, sulle due diatomee sono state condotti studi utilizzando le moderne tecnologie -omiche, principalmente trascrittomica e lipidomica, che hanno fornito nuove informazioni sulla regolazione dei pathway lipidici in risposta a stimoli esterni selettivi. In particolare i risultati ottenuti hanno fornito chiare indicazioni sulla biosintesi *de novo* delle principali classi lipidiche e dimostrato l'interconversione indotta da fattori biotici tra lipidi strutturali e lipidi di riserva (in particolare triacilgliceroli).

Il rilievo applicativo di questi processi e l'applicabilità industriale della plasticità metabolica osservate in laboratorio sono stati valutati in test di produzione di biomassa in campo utilizzando la diatomea *T. weissflogii*. La sperimentazione è stata effettuata su un impianto in provincia di Salerno costituito da fotobioreattori inclinati in PVC morbido con una capacità totale netta di 8000 litri, utilizzando fumi di scarico da motore a combustione alimentato con oli vegetali. I risultati hanno evidenziato una chiara divergenza tra le rese in laboratorio e le rese outdoor anche se la produttività di biomassa e la resistenza del ceppo microalgale consentono di essere fiduciosi per le future potenzialità applicative.

1. INTRODUZIONE

1.1 DIATOMEE

1.1.1 Caratteristiche generali

Le diatomee sono organismi unicellulari fotoautotrofi eucarioti costituiti da un caratteristico scheletro siliceo e appartenenti alle classe delle *Bacillariophyceae*. Esse rappresentano una delle più importanti classi di microalghe sia in ambiente marino che di acqua dolce. Il termine generico microalga indica un insieme di organismi acquatici autotrofi, geneticamente anche molto differenti tra di loro, e provvisti di pigmenti fotosintetici. Questi sono sia responsabili delle loro colorazioni che in grado di catturare la luce, permettendone l'uso come sorgente di energia per la produzione di sostanze organiche a partire da sostanze inorganiche come CO₂, acqua e sali inorganici (Riedl 2010). Ne sono state descritte circa 8000 differenti specie nei mari e nei laghi di tutto il mondo e recenti proiezioni stimano che il numero di specie esistenti possa essere intorno a 20000 (Appeltans *et al.* 2012; Guiry 2012); nel Mediterraneo ne sono state caratterizzate circa 500 specie (Cabrini *et al.* 2010; Riedl 2010).

La comparsa delle diatomee sul nostro pianeta risale a circa 200 milioni di anni fa. La loro longevità potrebbe spiegarsi con il fatto che le diatomee si adattano molto bene a diverse condizioni ambientali permettendone la diversa distribuzione in vari ambienti, anche molto estremi. Infatti le diatomee sono ubiquitarie e risultano presenti nei sistemi acquatici costieri (generalmente poche specie costituite da popolazioni numerose) e oceanici (molte specie composte da popolazioni ridotte), negli ambienti marini, polari, di transizione e nelle acque dolci; alcune specie vivono addirittura nel fango o nei terreni umidi (Cabrini *et al.* 2010; Riedl 2010).

Anche se le diatomee vengono generalmente considerate come microalghe, esse hanno delle caratteristiche peculiari che le distinguono dagli altri organismi eucarioti fotoautotrofi. Ciò può

essere dovuto anche al complesso processo evolutivo con cui si sono formate, che ha previsto un primo processo di endosimbiosi primaria tra un eucariote eterotrofo sconosciuto e un cianobatterio: a seguito di questo processo quest'ultimo si è evoluto nel cloroplasto con due membrane. Successivamente, si è verificato un secondo processo di endosimbiosi tra un altro eucariote eterotrofo sconosciuto e l'organismo derivante dal processo di endosimbiosi primaria (Armbrust 2009). In questo modo si sono evoluti i plastidi caratterizzati da quattro membrane e presenti, in particolare, nelle diatomee e nelle alghe brune (Hildebrand *et al.* 2012) (Figura 1).

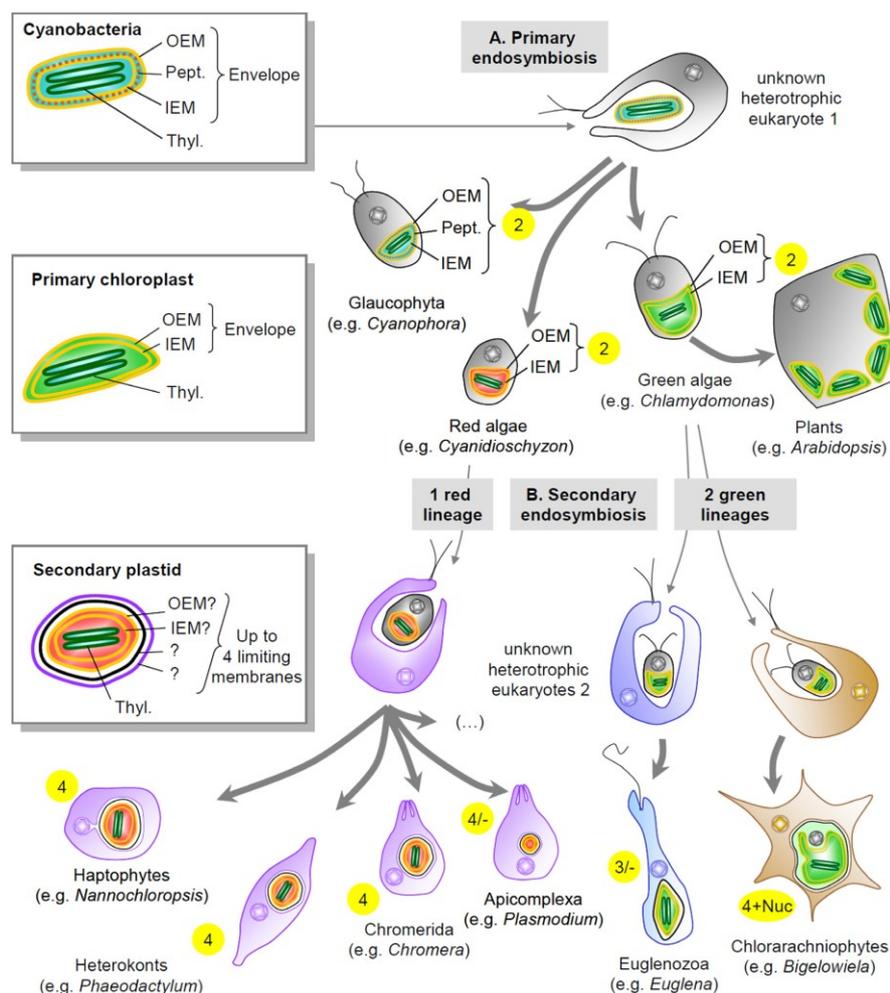


Figura 1 – Rappresentazione schematica dei processi di endosimbiosi primaria e secondaria. Con A è indicato il processo di endosimbiosi primaria tra un eucariote eterotrofo sconosciuto e un cianobatterio Gram-negativo, da cui si sono evolute le Glaucocistofite, le alghe rosse, le alghe verdi e le piante. Con B è invece indicato il processo di endosimbiosi secondaria, che ha coinvolto gli organismi derivanti dal processo di endosimbiosi primaria e un eucariote eterotrofo sconosciuto. Per le diatomee è stato proposto che si siano verificati vari processi di endosimbiosi secondaria tra un'alga rossa e verde (Petroutsos *et al.* 2014)

Quindi, vista la loro complessa origine evolutiva, un gran numero di proteine delle diatomee sono simili a quelle di altri eucarioti fotosintetici, quali alghe rosse, piante verdi e cianobatteri; al tempo stesso, sempre per la loro complessa origine da un punto di vista evolutivo, vari aspetti del metabolismo delle diatomee differiscono sostanzialmente da quelli degli altri organismi fotosintetici e quindi occorre fare attenzione nel generalizzare riguardo gli studi su questa tipologia di organismi (Figura 2).

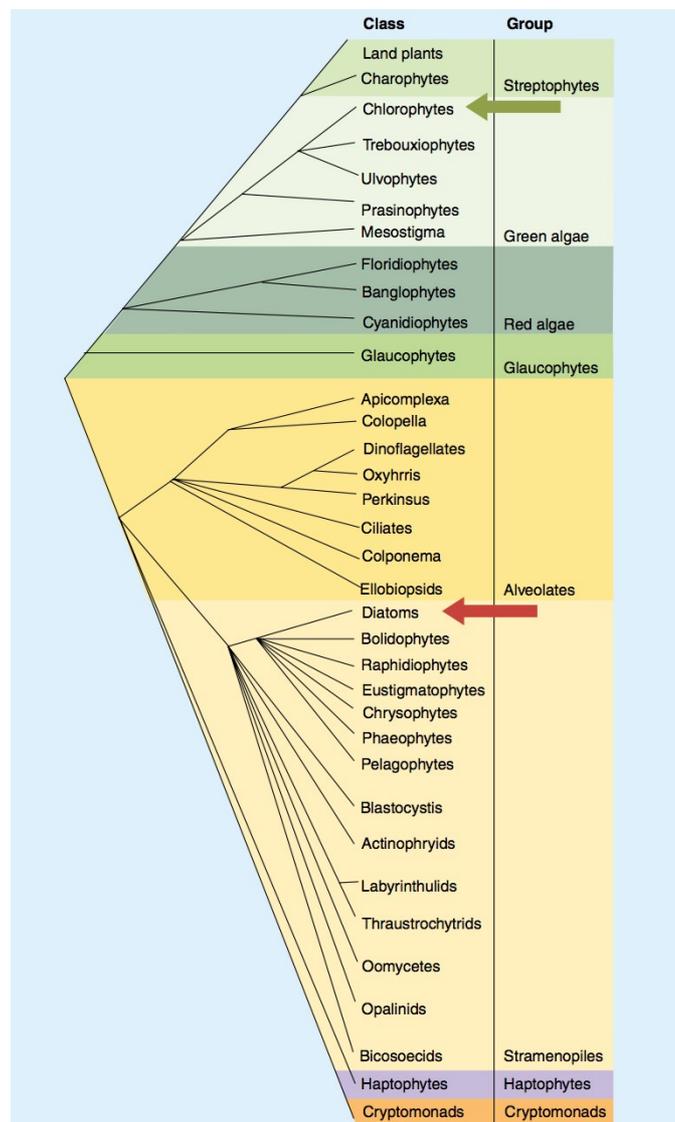


Figura 2 – Albero filogenetico degli eucarioti fotosintetici e dei vari taxa da essi derivanti. La lunghezza dei rami non corrisponde alle distanze filogenetiche. La freccia rossa indica le diatomee (Hildebrand *et al.* 2012)

1.1.2 Caratteristiche della struttura, della parete cellulare e del protoplasto delle diatomee

Generalmente le diatomee hanno dimensioni comprese tra i 10 e i 200 μm e sono organismi prevalentemente unicellulari, anche se alcune specie formano colonie lineari, semplici o ramificate. Solo poche specie sono mixotrofe e, ad oggi, solo meno di dieci specie sono conosciute come eterotrofe obbligate (Streble e Krauter 2010).

Le diatomee sono costituite da un guscio siliceo chiamato frustulo, contenente silice amorfa idratata con una formula generica $[\text{Si}_n\text{O}_{2n-(nx/2)}(\text{OH})_{nx}]$ con $x \leq 4$. Il frustulo avvolge il protoplasto come una scatola da scarpe: le due metà sono dette teche e, precisamente, epiteca la più grande e ipoteca l'altra. Ogni teca è composta da un guscio o valva (il piano) e una cintura commensurale o pleura (l'orlo laterale) (Figura 3). La valva e la cintura commensurale dell'epiteca si chiamano rispettivamente epivalva ed epipleura; quella dell'ipoteca, ipovalva e ipopleura (Streble e Krauter 2010). Inoltre in alcune si osserva sulla faccia valvare una fessura longitudinale, detta rafe; altre specie invece presentano uno pseudorafe, cioè una striscia simile al rafe, ma alla quale non corrisponde una vera fessura (Mann e Droop 1996).

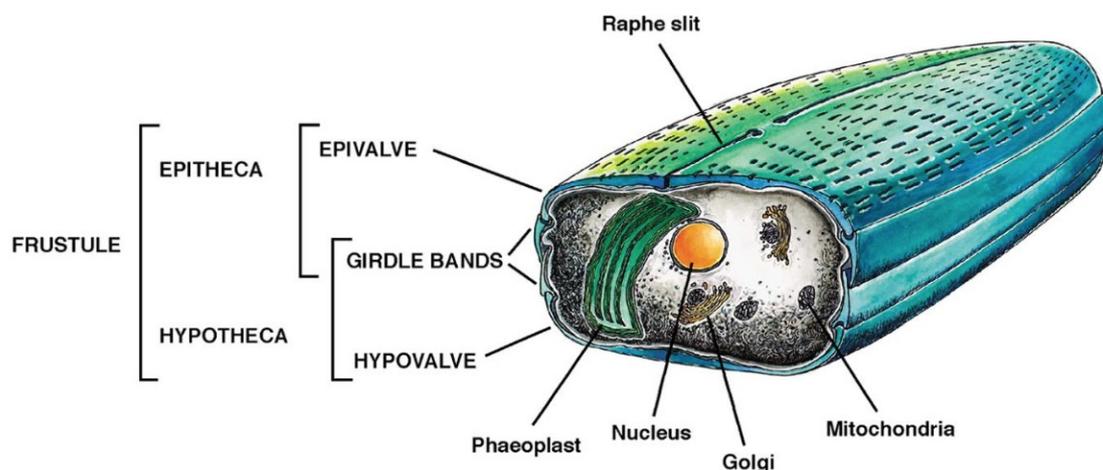


Figura 3 - Rappresentazione schematica della struttura cellulare di una diatomea

In base alla loro simmetria le diatomee si dividono principalmente in due grandi ordini: centriche e pennate (Figura 4).

Le centriche sono caratterizzate da valve a simmetria radiale (visione frontale), sono prive di rafe e di pseudorafe, e hanno molti cloroplasti, mentre le pennate sono caratterizzate da una simmetria bilaterale, generalmente hanno una forma più allungata e presentano solo uno o due cloroplasti. Viste frontalmente, lungo l'asse apicale di molte pennate può aprirsi il rafe che spesso presenta al centro due ingrossamenti detti noduli centrali e alle estremità due noduli polari.

Le diatomee centriche sono tutte planctoniche e sono particolarmente abbondanti in zone ricche di nutrienti e nelle regioni subpolari; le diatomee pennate sono prevalentemente bentoniche e sono presenti in acque dolci, salmastre e marine di bassa profondità (Cabrini *et al.* 2010).

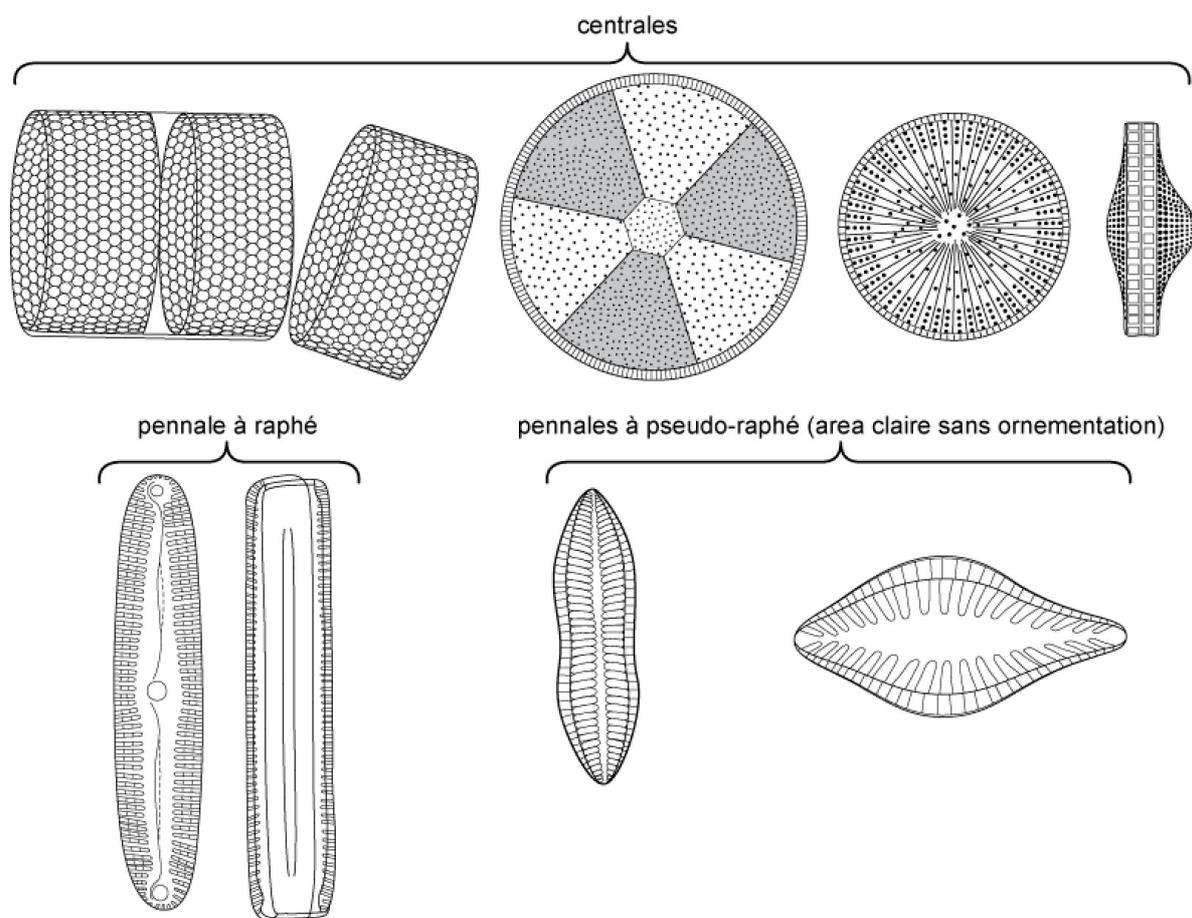


Figura 4 - Schema di base dell'orientamento strutturale nelle *Bacillariophyceae*: struttura centrica a simmetria radiale (in alto), struttura pennata a simmetria bilaterale (con rafe o pseudorafe, in basso) (Mathieu *et al.* 2011)

Quindi le diatomee possono essere sia planctoniche che bentoniche, epizoiche come pure epifitiche, ed è possibile incontrarle anche a 200 m di profondità (Riedl 2010). Le diatomee non sono dotate di flagelli, ma grazie alla produzione di sostanze che ne variano la densità sono in grado di spostarsi lungo la colonna d'acqua, mentre l'emissione di sostanze mucillaginose dal rafe permette ad alcune pennate di scivolare attaccate al substrato (Avancini *et al.* 2006; Cabrini *et al.* 2010).

L'identificazione delle diatomee è essenzialmente basata sulla morfologia, sulla struttura e sulla consistenza silicea del frustulo, che presenta una grande varietà di forme e di ornamentazioni che risultano più evidenti in mancanza del protoplasma. Altri caratteri utili per la determinazione del genere o della specie di una diatomea sono la forma, il numero e la disposizione dei cloroplasti e la presenza o l'assenza del pirenoide (Cabrini *et al.* 2010).

La parete cellulare è costituita essenzialmente da pectina ed esternamente da deposizioni silicee più o meno spesse e complesse a seconda della specie ed alla disponibilità di silicati nell'acqua (Cabrini *et al.* 2010).

La faccia commensurale è generalmente priva di strutture, mentre le valve sono caratterizzate da pori o areole. Il poro è una semplice apertura che può essere occlusa da una placca o da un velo, mentre l'areola è una camera esagonale nella parete, che è separata da quelle adiacenti mediante setti verticali (Figura 5) (Hendey 1971).

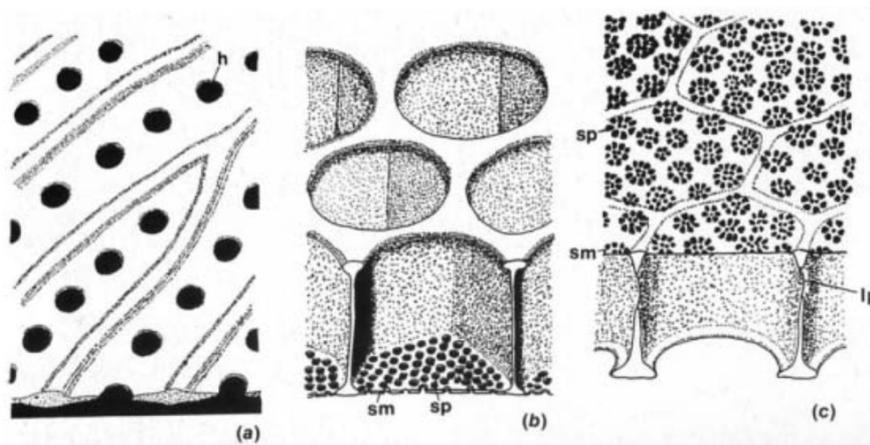


Figura 5 – Tipi di apertura nella parete del frustulo: (a) buchi o pori; (b) apertura che si apre verso l'esterno; (c) apertura che si apre verso l'interno (Hendey 1971)

Grazie a microscopi elettronici a scansione (SEM) o trasmissione (TEM) è possibile osservare sulle superfici valvari alcune estensioni dette processi, che aiutano a mantenere il contatto tra le cellule contigue in una colonia. Queste estensioni si distinguono in processi cornutati, elevazioni, spinule o reste (Figura 6) (Hasle e Lange 1989; Prasad *et al.* 1990; Medlin *et al.* 1993).

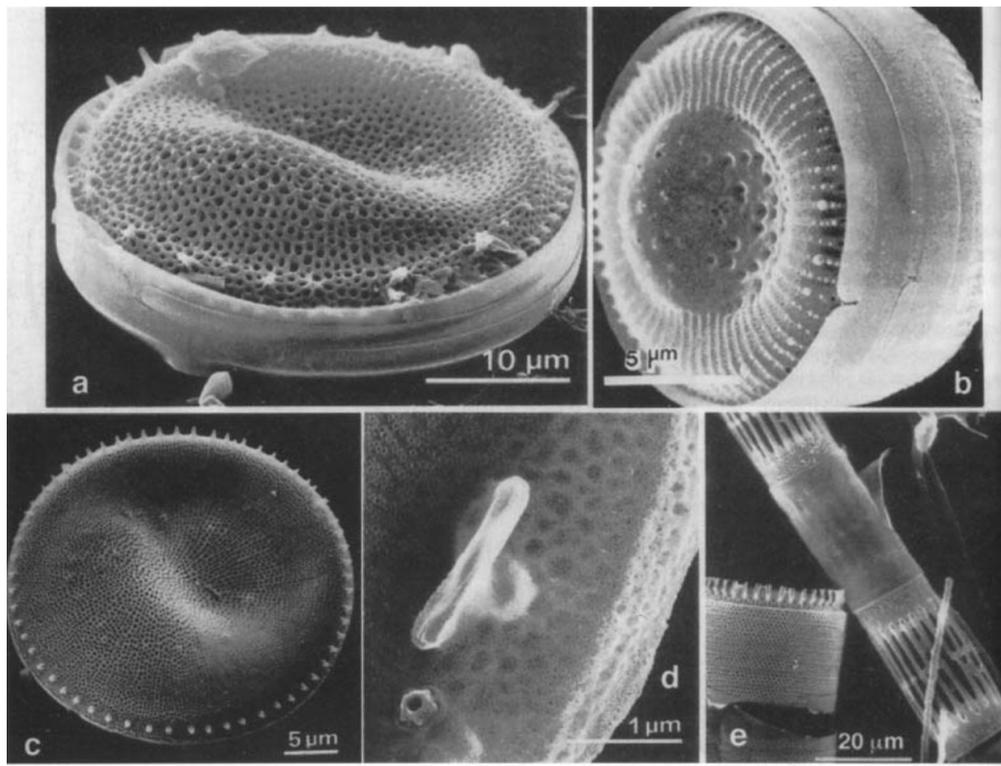


Figura 6 – Fotografie ottenute al microscopio elettronico a scansione di diatomee centriche (a, c, d: Hasle e Lange 1989; b: Prasad *et al.* 1990; e: Medlin *et al.* 1993)

Il protoplasto occupa internamente lo spazio delimitato dalla teca silicea. Il nucleo è posto in posizione centrale, mentre i cloroplasti sono in genere parietali e solitamente ve ne sono uno o due di dimensioni maggiori nelle specie pennate, mentre sono numerosi e piccoli nelle specie centriche (Streble e Krauter 2010). I cloroplasti sono giallo-dorati (rossi in fluorescenza) e sono rivestiti da due membrane e dal doppio strato del reticolo endoplasmatico, che può essere in continuità con l'involucro nucleare quando il cloroplasto è vicino al nucleo. Inoltre hanno tilacoidi, un pirenoide centrale, contengono i pigmenti fotosintetici principali quali la clorofilla a, c₁, c₂, c₃ e quelli accessori come la diatossantina, la diadinoxantina, la fucoxantina e il carotene (Cabrini *et al.* 2010).

Il pirenoide, un corpo proteico leggermente più scuro in confronto al resto del cloroplasto e difficilmente visibile al microscopio ottico, svolge un ruolo di riserva ed è importante in quanto al suo interno è presente l'enzima **Ribulosio Bisfosfato Carbossilasi/Ossigenasi**, RUBISCO (van den Hoek *et al.* 1995).

Un altro elemento importante presente all'interno del protoplasto è rappresentato dai vacuoli (due di grandi dimensioni oppure numerosi più piccoli). I prodotti di riserva sono oli che vengono immagazzinati all'interno di questi vacuoli sotto forma di goccioline; fra l'altro è grazie ad esse che le diatomee planctoniche riescono a galleggiare nonostante la pesante corazza silicea (Streble e Krauter 2010).

1.1.3 Composizione chimica cellulare

La composizione chimica delle diatomee è piuttosto simile a quella delle altre microalghe e può variare in funzione delle condizioni di crescita, della disponibilità dei nutrienti, della luce e della somministrazione di gas (CO₂ ed NO_x). In peso secco generalmente per il 30 - 60% sono costituite da proteine, per il 5 - 20% da carboidrati e per il 10 - 50% da lipidi (Chen *et al.* 2009). Questi ultimi vengono utilizzati nella produzione di biodiesel, mentre la frazione proteica può essere usata come fertilizzante o, insieme ai carboidrati, può essere digerita anaerobicamente per la produzione di biometano o bioidrogeno.

I lipidi possono essere essenzialmente divisi in due gruppi in base alla polarità della molecola. La frazione lipidica polare delle diatomee è costituita principalmente da monogalattosildiacilgliceroli (MGDG), digalattosildiacilgliceroli (DGDG), sulfoquinovosildiacilgliceroli (SQDG), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositolo (PI), fosfatidilglicerolo (PG) e altri costituenti minori. La frazione neutra comprende principalmente mono- (MAG), di- (DAG) e tri-acilgliceroli (TAG), ma anche steroli, idrocarburi, pigmenti (carotene e clorofille) (Figura 7) (Stonik e Stonik 2015). Questi ultimi tre gruppi sono ovviamente solubili nei solventi organici, ma non sono utili per la produzione di biodiesel.

Nelle microalghe i lipidi neutri sono utilizzati soprattutto come forma di stoccaggio dell'energia, mentre i lipidi polari sono principalmente i costituenti dei doppi strati delle membrane cellulari.

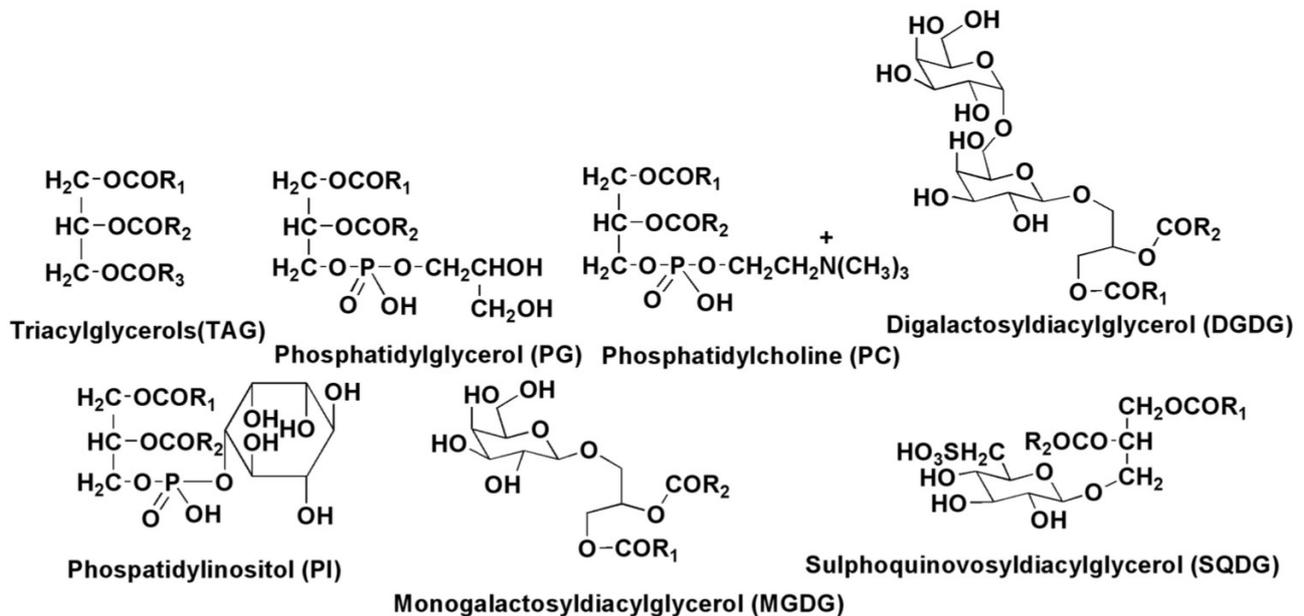


Figura 7 – Principali componenti lipidici delle diatomee: triacilgliceroli (TAG), fosfatidilgliceroli (PG), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositolo (PI), sulfoquinovosildiacylgliceroli (SQDG), monogalattosildiacylgliceroli (MGDG) e digalattosildiacylgliceroli (DGDG) (Stonik e Stonik 2015)

Gli acidi grassi che costituiscono i lipidi delle diatomee sono generalmente a media e lunga catena con 16, 20 e 22 atomi di carbonio e presentano diversi gradi di insaturazione. Molto caratteristici delle diatomee sono gli acidi grassi C16, quali il C16:3 ω 4 e il C16:4 ω 1, che insieme al 20:5 ω 3 rappresentano i principali acidi grassi polinsaturi (Figura 8) (d'Ippolito *et al.* 2005; Fontana *et al.* 2007; Hu *et al.* 2008).

I lipidi che sono prodotti come riserva energetica dalle diatomee vengono trasferiti tramite la catena alimentare agli altri animali marini che non producono da soli acidi grassi polinsaturi (Stonik e Stonik 2015).

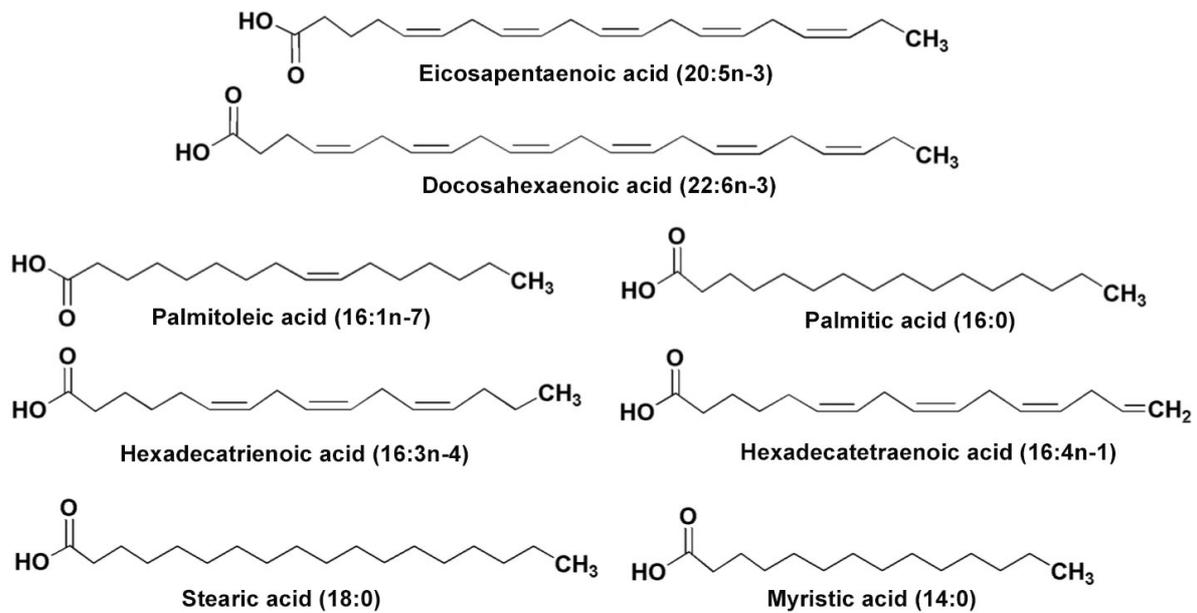


Figura 8 – Alcuni tra i principali acidi grassi presenti nelle diatomee (Stonik e Stonik 2015)

Per quanto riguarda la frazione dei carboidrati, questi sono principalmente rappresentati dai polisaccaridi strutturali presenti nella parete cellulare e che hanno un contenuto variabile e proporzionale di galattosio, glucosio, mannosio, fucosio e xilosio. Fondamentali sono anche i polisaccaridi di riserva, il cui principale componente è un polimero del glucosio ramificato al C-2 e C-6, chiamato crisolaminarina, e i polisaccaridi extracellulari che spesso formano rivestimenti viscosi intorno alla cellula, con funzione di aggregazione cellulare, scambio ionico, protezione dai predatori e locomozione per le specie bentoniche (Staats *et al.* 1999; Granum e Myklestad 2002).

1.1.4 Riproduzione e curva di crescita delle diatomee

Le diatomee sono diploidi e si riproducono per divisione binaria nella direzione parallela all'asse maggiore: ogni cellula figlia riceve dalla cellula madre una valva, mentre quella mancante viene sempre riformata *ex novo*. Ne consegue che l'individuo che eredita la valva minore si riduce di dimensione e questa diminuzione si ripete attraverso le successive divisioni: così facendo in una

linea di divisione cellulare le dimensioni della teca si riducono progressivamente fino ad arrivare ad un limite minimo compatibile con i processi vitali, variabile da specie a specie (Figura 9).

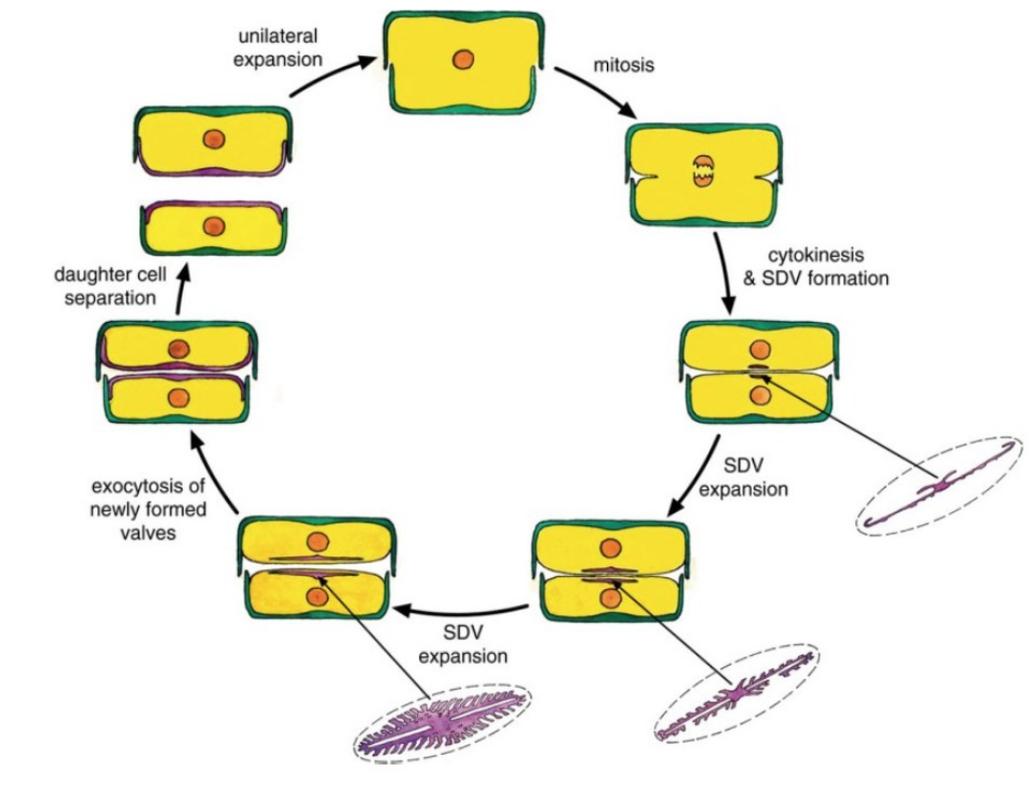


Figura 9 - Schema della divisione cellulare mitotica di una diatomea

Per ristabilire le dimensioni di partenza, la riduzione della teca termina con una divisione meiotica e la produzione di gameti aploidi che successivamente si fondono in acqua dando origine ad un'auxospora diploide che aumenterà di taglia fino al raggiungimento delle dimensioni iniziali della cellula (Cabrin *et al.* 2010).

In risposta a particolari fattori quali possono essere l'alternanza stagionale, la carenza di nutrienti, la temperatura, l'intensità luminosa ed il pH, le diatomee possono produrre delle spore di resistenza, più o meno durevoli nel tempo e molto diverse dalla forma vegetativa, che possono germinare al ripresentarsi delle condizioni favorevoli per la crescita. Questo stadio di quiescenza rappresenta una strategia di sopravvivenza in condizioni alterate dell'ecosistema e in particolari situazioni (ad

esempio nelle acque di zavorra delle navi permettendo il potenziale trasferimento di una specie da un mare all'altro). In entrambi i casi le spore possono germinare e sviluppare la forma vegetativa quando le condizioni ambientali tornano favorevoli (Cabrini *et al.* 2010). Le spore hanno valve molto inspessite e citoplasma denso ricco di sostanze di riserva (Avancini *et al.* 2006).

La crescita delle diatomee in un reattore in cui i nutrienti sono presenti in quantità sufficienti e le condizioni climatiche sono adeguate presenta un andamento caratteristico rappresentato nella figura 10.



Figura 10 - Rappresentazione schematica della curva di crescita delle diatomee in condizioni batch

La curva caratteristica della crescita delle diatomee può essere divisa in quattro fasi:

- fase di latenza (o lag): è una fase di adattamento delle cellule al mezzo di coltura e la velocità di crescita è zero;
- fase esponenziale: è una fase in cui i microrganismi crescono alla velocità massima e il numero di cellule raddoppia ad intervalli regolari di tempo. La velocità di crescita è costante e dipende dalla disponibilità dei nutrienti, dalla temperatura e dalla luce;

- fase stazionaria: è una fase in cui la scarsità di nutrienti e l'accumulo di metaboliti tossici rallentano la crescita fino ad azzerarla; la velocità di crescita è nulla ed il numero di organismi costante;
- fase senescente: è la fase in cui il numero di cellule vitali decresce essendo sospesa sia la fase di divisione sia quella metabolica. Essa, in genere, avviene in seguito ad un'eccessiva concentrazione algale, all'esaurimento di nutrienti nel mezzo di coltura e all'instaurarsi di condizioni avverse alla crescita (temperature non idonee, presenza di sostanze tossiche, illuminazione inadeguata).

Infatti la crescita delle diatomee dipende da diverse variabili:

- fattori abiotici: come luce (importanti sono sia l'intensità che la lunghezza d'onda), temperatura, concentrazione dei nutrienti, ossigeno, anidride carbonica, pH, salinità e sostanze tossiche;
- fattori biotici: come organismi patogeni (batteri, funghi, virus) e altre alghe in competizione;
- variabili operative: agitazione, rapporto tra portata volumetrica e volume del reattore, profondità del reattore rispetto alla superficie su cui incide la luce, frequenza di raccolta della biomassa.

Negli ambienti naturali le diatomee sono più abbondanti numericamente all'inizio della primavera e in autunno quando l'intensità luminosa e la durata del giorno sono ottimali per la fotosintesi (Werner 1977).

1.1.5 Ruolo ecologico delle diatomee

Le diatomee svolgono una serie di funzioni essenziali per l'ecosistema. Il ruolo ecologico delle diatomee ha grande importanza negli studi sulla qualità delle acque sia marine che dolci essendo questa classe una delle principali componenti della comunità fitoplanctonica. Infatti le diatomee costituiscono il più abbondante gruppo del fitoplancton eucariotico marino: con il loro 40% di attività fotosintetica ricoprono un ruolo fondamentale nella produzione primaria oceanica. Sostengono gran parte dei livelli trofici superiori e le catene alimentari a basso consumo energetico che mantengono su larga scala la pesca costiera, come nel caso delle acciughe nella risalita

peruviana. La loro presenza negli oceani diventa osservabile anche macroscopicamente in particolare durante i periodi di fioritura, definiti bloom, in cui questi organismi aumentano le loro concentrazioni cellulari passando da centinaia a milioni di cellule per millilitro (Figura 11) (Bowler *et al.* 2010).



Figura 11 – Immagine dal satellite di un bloom di fitoplankton a sud delle coste dell’Inghilterra (McCallum *et al.* 2010)

Dato che le diatomee necessitano di silicio per la costruzione del frustulo, la loro crescita influenza notevolmente il ciclo del silicio a mare. Durante i fenomeni di fioritura delle diatomee, la silice disciolta negli oceani raggiunge livelli elevatissimi. La successiva “pioggia” di frustuli delle diatomee morte alla fine della fioritura forma i depositi di silice organica sul fondo dell’oceano. Data la stabilità dei loro gusci silicei, le diatomee allo stato fossile sono molto abbondanti: le prime diatomee centriche compaiono nei depositi fossili del tardo Cretaceo, mentre quelle pennate prive di rafe in quelli del tardo Cretaceo, quelle con rafe nell’Eocene (Round *et al.* 1990).

Dall'accumulo dei gusci delle diatomee continentali e marine si forma la diatomite, una roccia silicea, di cui abbiamo due varietà: la farina fossile, meno compatta, leggera, bianca, grigia o nerastra, e il tripoli, più compatto e chiaro. La prima serve per la fabbricazione della dinamite, di mattonelle refrattarie, per filtrare liquidi e come isolante; il tripoli come abrasivo per la pulitura di metalli, pietre e simili. Gli enormi depositi fossili di diatomite dimostrano il successo biologico di questa classe di microalghe nel corso di migliaia di anni (Round *et al.* 1990).

Inoltre le diatomee ricoprono un ruolo importante anche nel ciclo biogeochimico del carbonio, in quanto, a causa della loro pesante parete di silice, gli organismi morti e morenti contribuiscono al trasporto verso i fondali del carbonio organico. Questo processo trasferisce energia, elettroni e carbonio nelle profondità marine ed è essenziale per la sopravvivenza di tutti gli organismi viventi al di sotto della zona fotica della colonna d'acqua (Bowler *et al.* 2010). Il processo aiuta anche a sequestrare il carbonio nelle zone più profonde del mare dove viene immagazzinato per periodi che vanno da secoli a millenni. Una gran parte dei giacimenti petroliferi, infatti, deriva da diatomee che sono affondate nelle diverse ere temporali geologiche (Figura 12) (Falkowski *et al.* 2005, 2008).

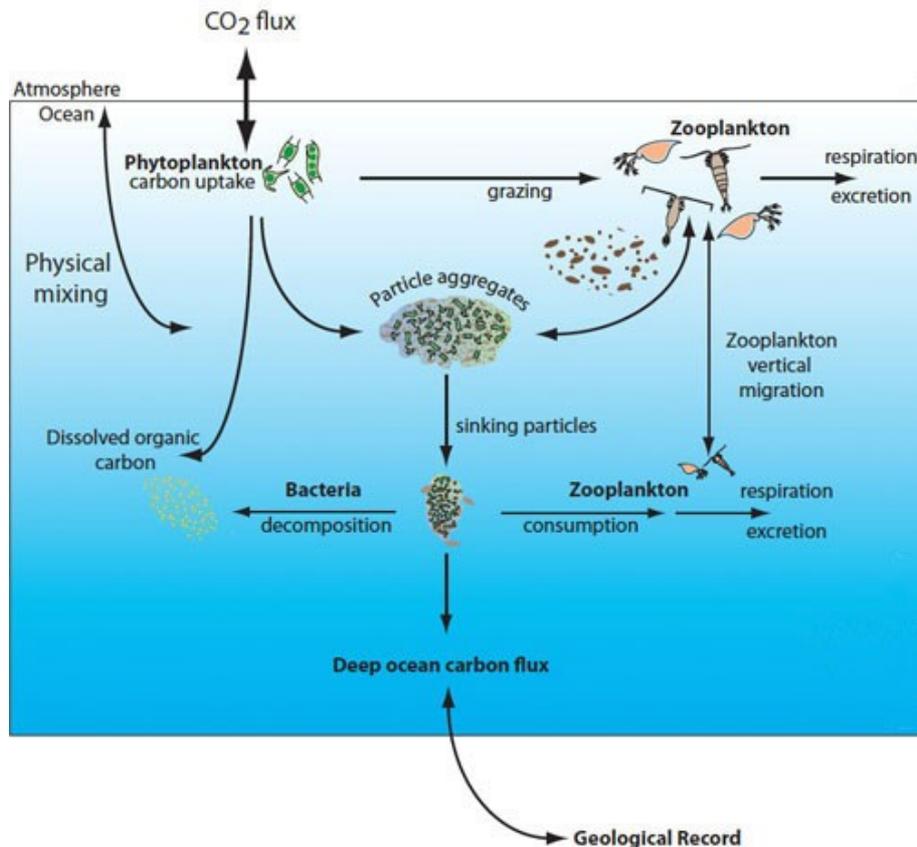


Figura 12 – Schematizzazione del ciclo del carbonio in mare

L'elevata capacità da parte delle diatomee di svolgere un importante compito di collegamento nel processo di scambio della CO_2 tra l'atmosfera e l'oceano risulta molto complesso e in parte ancora oggi poco noto alla comunità scientifica.

Come la maggior parte degli organismi fotosintetici, le diatomee fissano il carbonio utilizzando la **Ribuloso Bisfosfato Carbossilasi/Ossigenasi**, RUBISCO. Questo enzima nelle diatomee è caratterizzato dallo stesso basso tasso di turnover e dalla tendenza a fissare l' O_2 di altri organismi fotosintetici e la sua affinità per la CO_2 è solo marginalmente migliore.

La diffusione della CO_2 in acqua è più di 5000 volte più lenta che in aria e questo limita fortemente l'acquisizione del carbonio da parte del fitoplancton. Per tale ragione le diatomee hanno sviluppato dei meccanismi di concentrazione della CO_2 (CCM) per aumentarne la concentrazione nel sito di

fissazione della RUBISCO (Hopkinson *et al.* 2011). Attualmente sono stati proposti principalmente due meccanismi di concentrazione della CO_2 : uno di tipo biofisico, l'altro di tipo biochimico.

Nel meccanismo di tipo biofisico la CO_2 e l' HCO_3^- sono trasportati nelle cellule come forme inorganiche con l'aiuto di trasportatori e dell'enzima anidrasi carbonica (CA); per la conversione $\text{CO}_2 - \text{HCO}_3^-$ anche il pH stromale alcalino gioca un ruolo cruciale.

L'altro meccanismo, quello biochimico, coinvolge la fissazione del carbonio inorganico in composti C4: in questo caso delle carbossilasi fissano il carbonio a intermedi C3 per formare composti C4 che possono essere trasportati nel cloroplasto. Questi vengono poi decarbossilati per consegnare il carbonio inorganico alla RUBISCO: a questo punto l'intermedio C3 viene riciclato per un altro processo identico (Figura 13) (Obata *et al.* 2013).

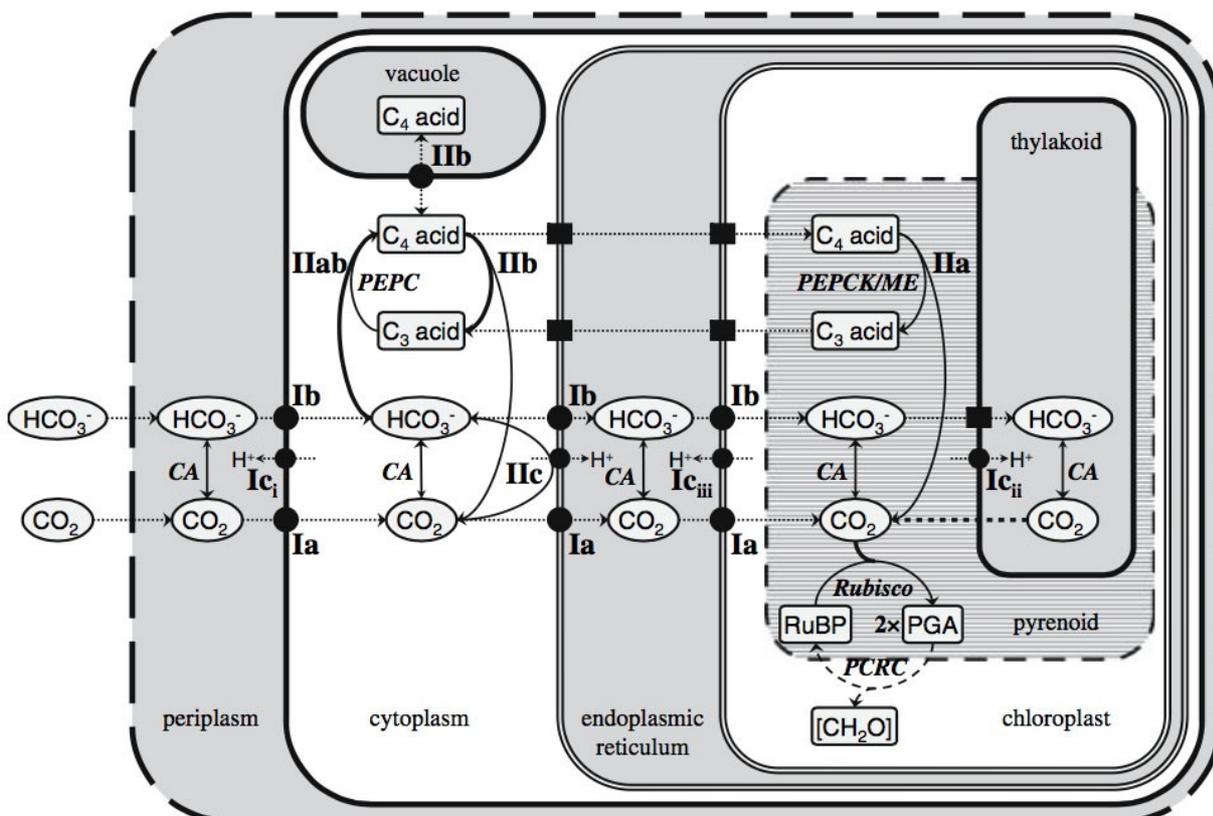


Figura 13 – Rappresentazione schematica dei CCM di tipo biofisico e biochimico presenti nelle diatomee. La presenza simultanea di tutti di questi meccanismi porterebbe a cicli futili, quindi solo sottoinsiemi limitati di questi processi possono funzionare insieme (Roberts *et al.* 2007)

Esistono evidenze scientifiche che le diatomee hanno sia il metabolismo C3 che C4 per la fissazione biochimica del carbonio e la preferenza per un meccanismo piuttosto che per l'altro dipende strettamente dalla specie, per cui non è possibile fare generalizzazioni. Per esempio, *Phaeodactylum tricornutum* e *Thalassiosira pseudonana* codificano per nove e tredici CA, rispettivamente, ma solo *P. tricornutum* ha le β -CA che lavorano nei cloroplasti. Non è ancora chiaro se l'utilizzo da parte delle cellule di un determinato tipo di meccanismo di CCM piuttosto che un altro possa essere legato, da un punto di vista evolutivo, ai diversi livelli di CO₂ presenti nei vari periodi geologici in cui si sono evolute le diverse specie di diatomee (Hildebrand *et al.* 2012).

La parete di silice gioca un ruolo importante nei meccanismi di concentrazione del carbonio, in quanto studi suggeriscono che lo scheletro siliceo sia un sistema tampone efficace per il pH, che aumenta l'attività delle anidrasi carboniche nei pressi della superficie cellulare e consente la conversione del bicarbonato in CO₂ (Hildebrand *et al.* 2012).

Nonostante entrambi i meccanismi di concentrazione della CO₂, quello biofisico e quello biochimico, sono ancora poco noti, ci sono prove che ne evidenziano la presenza nelle diatomee (Obata *et al.* 2013).

In particolare, le membrane delle diatomee sono altamente permeabili alle piccole molecole prive di carica netta, come la CO₂, con conseguente notevole scambio per diffusione della CO₂ tra l'ambiente esterno e quello cellulare, che quindi hanno approssimativamente la stessa concentrazione. Invece la membrana del cloroplasto è quasi impermeabile all'HCO₃⁻, per cui solo una piccola parte riesce a passare con flusso passivo ed è quindi il trasporto attivo dal citoplasma al cloroplasto il principale motore dei CCM.

Nelle diatomee solo un terzo del flusso di carbonio in ingresso è effettivamente fissato fotosinteticamente, mentre il resto è perso per diffusione della CO₂ dal cloroplasto verso il citoplasma, dove viene recuperata con un'idratazione a HCO₃⁻ ad opera di una anidrasi carbonica. Per ottenere la concentrazione di CO₂ necessaria per saturare la fissazione del carbonio, molto probabilmente la CO₂ è concentrata all'interno del pirenoide, un organello all'interno del cloroplasto

dove è localizzata la maggior parte della RUBISCO. Sia il flusso passivo in entrata della CO₂ dal mezzo esterno che il riciclo della CO₂ in uscita dal cloroplasto sono dovuti all'attività enzimatica di un'anidrasi carbonica insieme con il mantenimento di una bassa concentrazione di HCO₃⁻ nel citoplasma.

Non è possibile distinguere la forma in cui il carbonio è trasportato (come CO₂, HCO₃⁻ o composto C4 che viene successivamente decarbossilato) (Obata *et al.* 2013).

1.2 APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE DELLE DIATOMEES

1.2.1 Principali applicazioni biotecnologiche non energetiche delle diatomee

Dalle diverse specie microalgali, comprese le diatomee, possono essere ricavati vari composti chimici ad alto valore aggiunto quali pigmenti, antiossidanti, β-carotene, polisaccaridi, acidi grassi e vitamine, che sono in gran parte utilizzati come materie prime in diversi settori industriali (ad esempio come prodotti farmaceutici, cosmetici, nutraceutici, alimenti funzionali). Un fattore importante da tenere in considerazione è che la produzione di queste sostanze e composti bioattivi richiede l'utilizzo di monoculture e di sistemi di coltivazione controllati per ottenere una buona produttività e grado di purezza (Mata *et al.* 2010).

In campo medico le diatomee vengono saggiate come fonti promettenti di sostanze dotate di proprietà antibatteriche, antivirali e antitumorali (Hildebrand *et al.* 2012). Per esempio, le diatomee contengono diversi tipi di steroli, che possono essere utilizzati nella prevenzione delle malattie cardiovascolari. Gli acidi grassi polinsaturi a catena lunga (PUFA), in particolare della serie ω-3 e ω-6 come l'acido eicosapentaenoico (EPA), il docosaesaenoico (DHA) e l'arachidonico (AA), sono considerati farmacologicamente importanti e utilizzati per la profilassi e il trattamento terapeutico di infiammazioni croniche (per esempio reumatismi, malattie della pelle e infiammazione della mucosa del tratto gastrointestinale). Inoltre, si ritiene che abbiano un effetto positivo sulle malattie

cardiocircolatorie, sulle malattie cardiache coronariche, sull'aterosclerosi, in casi di ipertensione, colesterolo e trattamento del cancro (Mata *et al.* 2010; Hildebrand *et al.* 2012).

Attualmente la principale fonte di questi acidi grassi per l'impiego umano sono i pesci marini. Ma importanti sono i vantaggi derivanti dall'utilizzo degli oli da microalghe piuttosto che pesce, come l'assenza di un odore sgradevole, la riduzione del rischio di contaminazione chimica e una migliore potenziale purificazione, che quindi rendono questi organismi una fonte ottimale di PUFA. Per esempio in Europa i PUFA di origine microalgale sono aggiunti al latte per i bambini (de Jesús Paniagua-Michel *et al.* 2015); inoltre gli acidi polinsaturi ω -3 possono avere anche un ruolo ecologico di difesa contro i predatori (Figura 14) (Stonik e Stonik 2015).

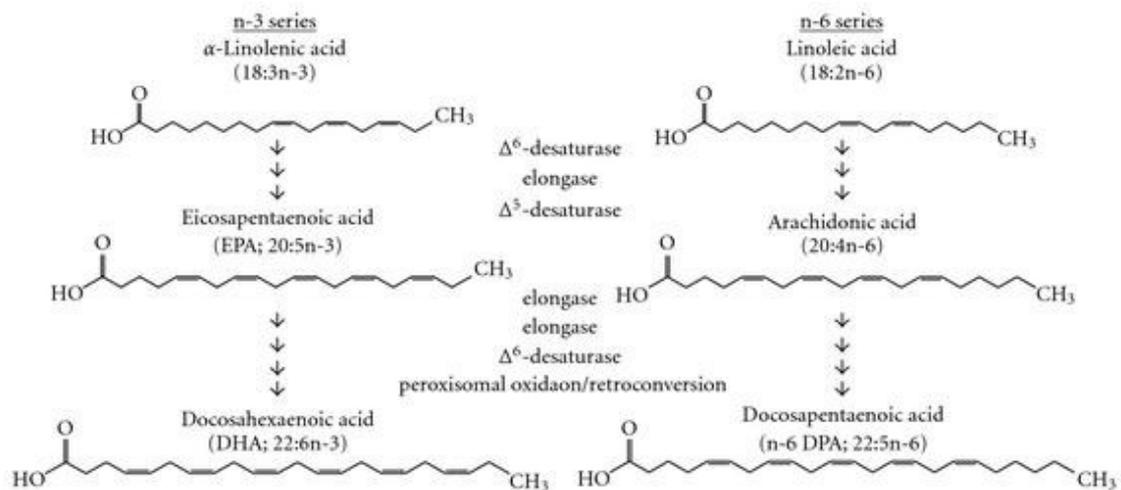


Figura 14 – Acidi grassi polinsaturi (PUFA) con alto valore farmaceutico e nutrizionale ottenuti da piante e microalghe

Anche altri acidi grassi insaturi costituenti dei lipidi delle diatomee, ad esempio il 18:1 e il 18:2 che sono componenti di solito minoritari, mostrano proprietà antimicrobiche (Stonik e Stonik 2015).

Attualmente la popolazione è sempre più preoccupata e consapevole riguardo l'insorgere di malattie quali colesterolo, malattie cardiache e osteoporosi e quindi fa affidamento non solo sui farmaci per trattare o prevenire queste malattie, ma anche curando la dieta. Tradizionalmente sono utilizzati integratori alimentari che derivano dalle piante; tuttavia, nel corso degli ultimi anni sono stati

riconosciuti e apprezzati i benefici per la salute di microrganismi acquatici come le microalghe, soprattutto dopo l'introduzione degli integratori probiotici (Mata *et al.* 2010). Le microalghe hanno proteine di qualità superiore rispetto ad altre fonti vegetali, come grano, riso e legumi. In particolare le diatomee hanno un contenuto proteico molto più elevato rispetto a quello del latte e contengono anche quantità elevate di vitamine A, B, C, D, E, K e B12 (Werner 1977). Questo ventaglio di caratteristiche le rende un pregevole materiale da impiegare come integratore alimentare nella dieta umana ed animale.

Infatti attualmente le colture di diatomee trovano largo impiego come fonte di cibo negli allevamenti di molti animali acquatici commercialmente importanti (ad esempio, negli allevamenti delle larve e delle forme giovanili di molti molluschi, gamberi, crostacei e pesci) sia d'acqua dolce che salata. A tale scopo, gli organismi non devono essere tossici, di dimensioni accettabili per essere ingeriti, la parete cellulare dovrebbe essere digeribile in modo da rendere facilmente disponibili le sostanze nutritive, devono crescere bene su grande scala ed avere un alto valore nutritivo. Per quest'ultimo parametro, proteine e lipidi sono determinanti; in particolare per i lipidi è importante sia la qualità che la quantità: per esempio a seconda della quantità di acidi grassi essenziali (soprattutto della serie ω -3 e ω -6) le larve dei pesci possono essere sane o malformate (Mata *et al.* 2010; de Jesús Paniagua-Michel *et al.* 2015). Specie appartenenti a generi come *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Nannochloropsis*, *Pavlova* e *Skeletonema* sono molto utilizzati negli impianti di acquacoltura (de Jesús Paniagua-Michel *et al.* 2015).

Inoltre molti composti con attività antiossidante (ad esempio aminoacidi, β -carotene, astaxantina e altri carotenoidi) sono stati isolati da alcune specie di diatomee e hanno un alto potenziale per la protezione contro lo stress ossidativo, causa di un'ampia gamma di malattie e dell'invecchiamento. Infatti anche nel campo della cosmesi, l'elevato tenore e la varietà delle sostanze organiche contenute nelle microalghe ne rendono possibile l'impiego con azioni depurative e drenanti per il corpo (Mata *et al.* 2010).

Anche altri composti, come i polisaccaridi e la teca cellulare silicea caratteristica delle diatomee, sono utilizzati molto spesso in diversi settori industriali e possono essere estratti dalle varie specie di diatomee rendendole così di ulteriore interesse biotecnologico (Barrow e Shahidi 2007).

Non ultimi i trattamenti delle acque reflue e l'utilizzo dei fumi da un'unità industriale, da usare come fonte di CO₂ e NO_x in modo da ottenere una riduzione delle emissioni complessive, possono rendere ancor più ecologicamente sostenibile ed economicamente conveniente e redditizia la produzione di biomassa da microalghe (Mata *et al.* 2010; Hildebrand *et al.* 2012).

1.2.2 Problema energetico e fonti rinnovabili: applicazioni biotecnologiche energetiche delle diatomee

Dalla metà del XIX secolo, con l'avvento dell'era industriale, si è registrato un continuo incremento della domanda mondiale di energia, che, secondo le previsioni più attendibili, nel 2050 triplicherà ulteriormente rispetto ai valori attuali già elevati. Ciò è dovuto principalmente:

- al generale incremento della popolazione mondiale;
- al notevole incremento delle richieste di energia da parte dei Paesi in via di sviluppo, quali la Cina o l'India, che sono molto popolosi e stanno raggiungendo gli standard economici e la qualità della vita dei Paesi occidentali.

La situazione impone all'attenzione del mondo politico e scientifico il problema di garantire l'approvvigionamento di energia nel lungo periodo e la necessità di far fronte sia all'esaurimento del petrolio sia ai problemi ambientali derivanti dall'utilizzo dei combustibili fossili. Il fabbisogno energetico del pianeta attualmente dipende quasi completamente (85%) dall'utilizzo di combustibili fossili, quali carbone, petrolio e gas naturale (Energy needs, choices and possibilities. Scenarios to 2050. Shell International 2001).

Le continue e non controllate emissioni di gas serra hanno provocato, provocano e continueranno a provocare un ulteriore aumento delle temperature globali e cambiamenti climatici di lunga durata, aumentando la probabilità di impatti seri e irreversibili sulle persone e sugli ecosistemi. Limitare in

modo serio i cambiamenti climatici richiede una riduzione sostanziale e duratura delle emissioni di gas serra. Per tale motivo la politica degli ultimi anni ha enfatizzato il risparmio energetico e incentivato l'utilizzo delle fonti di energia rinnovabili non fossili (Climate Change 2014: Synthesis report. The intergovernmental panel on climate change 2014). Sotto questa denominazione vanno quelle forme di energia derivanti da fonti che, per le loro caratteristiche intrinseche, si rigenerano o non sono "esauribili" nella scala dei tempi "umani". Rientrano in questa categoria l'energia idroelettrica, marina, eolica, solare, geotermica, da biomassa e la termovalorizzazione.

Ai fini delle direttive della Commissione Europea si intende per biocarburante un carburante liquido o gassoso ricavato da biomasse. Negli ultimi anni la Commissione Europea ha proposto misure di sostegno, di incentivo e stimolo a favore delle fonti energetiche rinnovabili, fra cui l'adozione di un sistema di sostegno ai biocarburanti, in particolare nel settore dei trasporti. La tabella di marcia fissata dall'Europa prevede un obiettivo generale obbligatorio pari ad una quota del 20% di impiego delle fonti energetiche rinnovabili nel consumo interno lordo entro il 2020. Per i biocarburanti, la Commissione intende fissare un obiettivo minimo del 10% entro il 2020, stimando che l'obiettivo del 20% permetterà riduzioni fino a 600 - 900 milioni di tonnellate di CO₂ all'anno.

1.2.3 Produzione di bio-oli per il biodiesel

A causa del crescente aumento del prezzo dell'energia, almeno in parte dovuto alla limitazione delle riserve di combustibili fossili, vi è quindi una forte richiesta di carburanti rinnovabili, che non determinino emissione di CO₂ netta, che siano trasportabili ed ecologicamente e commercialmente sostenibili.

Tra i biocarburanti, uno dei più importanti è il biodiesel. Con questo termine si intende un carburante diesel derivato da oli vegetali, di solito composto da esteri metilici di acidi grassi a catena lunga. La composizione chimica, in particolare la lunghezza della catena dell'acido grasso, dipende dalla fonte dell'olio. Il biodiesel è prodotto solitamente dall'olio per transesterificazione chimica in presenza di metanolo, che porta alla formazione di tre molecole di esteri metilici e

glicerolo come sottoprodotto (Figura 15). Quest'ultimo, adeguatamente depurato, è commercializzabile, mentre le sostanze ausiliarie residue, compresa l'acqua di produzione, possono essere riutilizzate.

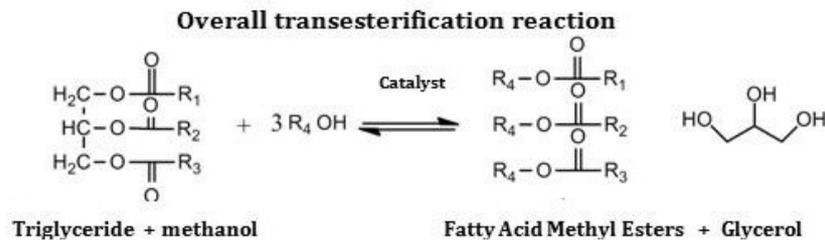


Figura 15 - Reazione di transesterificazione di un trigliceride in presenza di metanolo: gli esteri metilici degli acidi grassi sono una miscela di catene lineari generalmente lunghe da 16 a 22 atomi di C; il secondo prodotto è il glicerolo

Uno dei vantaggi dei biocarburanti liquidi è che possono essere utilizzati direttamente nei motori attualmente già esistenti (Scott *et al.* 2010). Infatti il biodiesel può essere utilizzato in motori standard, anche se è spesso miscelato con il diesel convenzionale; le prestazioni del biodiesel risultano essere del tutto confrontabili con quelle ottenute con il gasolio tradizionale, consentendo buona resa ed affidabilità.

Il biodiesel è quindi destinato ad essere usato come biocarburante alternativo al gasolio, al gas metano, al GPL e al carbone, e l'impiego di colture massive di microalghe oleaginose è tra i filoni più seguiti e battuti nel campo delle applicazioni biotecnologiche di questi microrganismi.

Diesel immaginava che l'utilizzo di un combustibile ottenuto dalla biomassa fosse il vero futuro del suo motore e già in un discorso del 1912 sosteneva che: «l'uso di oli vegetali per il combustibile dei motori può sembrare insignificante oggi, ma tali oli possono diventare, nel corso del tempo, importanti quanto i derivati dal petrolio e dal carbone dei nostri giorni».

Attualmente la produzione di biodiesel si basa sulla conversione mediante una reazione di transesterificazione con metanolo di oli vegetali ottenuti da semi di soia (Bunyakiat *et al.* 2006), semi di colza (Peterson *et al.* 1996), frutti di palma (Al-Widyan e Al-Shyoukt 2002) e semi di

girasole (Antolín *et al.* 2002) oppure dal riciclo di oli esausti (Bouaid *et al.* 2007). L'utilizzo di piante coltivate a terra però richiede notevoli superfici agricole da dedicare esclusivamente a colture energetiche, innescando problematiche di competitività con quelle da destinare a colture agroalimentari. I tempi di crescita e di produzione delle piante da dedicare alla produzione di biodiesel sono estremamente lunghi e difficilmente consentono di far fronte al tasso di consumo del biodiesel imposto dal settore dei trasporti (Verma *et al.* 2010).

Negli ultimi decenni le microalghe sono diventate una fonte appetibile per la produzione di biodiesel, proprio grazie alla loro capacità di accumulare, in determinate condizioni di crescita, elevate quantità di trigliceridi (Hildebrand *et al.* 2012). L'impiego nel settore energetico di tali microrganismi autotrofi ha il duplice vantaggio di combinare la produzione di biocarburanti alla riduzione globale della CO₂ che fissano attraverso la fotosintesi (Fields *et al.* 2014).

Come per ogni aspetto innovativo, anche lo sfruttamento microalgale per la produzione di biodiesel presenta risvolti positivi e negativi rispetto alle più diffuse coltivazioni di piante oleaginose.

Tra gli aspetti positivi ricordiamo:

- la più alta efficienza fotosintetica, in quanto circa il 10% dell'energia solare può essere convertita in biomassa rispetto allo 0.5% delle piante terrestri;
- una struttura cellulare più semplice e con cicli di vita più brevi, di circa 10 giorni;
- la capacità di sintetizzare e accumulare grandi quantità di lipidi con produzioni 20 volte superiori alle rese in olio di altri semi oleosi;
- la capacità di crescere in fotobioreattori con ridotta occupazione di superficie rispetto ad una coltivazione terrestre, permettendo di ottenere buone produttività;
- la coltivazione di microalghe può avvenire in zone non adatte a coltivazioni alimentari, zone aride o industriali e in questo modo non sottrae all'agricoltura superfici utili per prodotti destinati all'alimentazione (Verma *et al.* 2010);
- a seconda della tipologia di microalga utilizzata, il residuo della biomassa, comunemente denominato torta residua e contenente composti quali vitamine, antiossidanti, antimicrobici e

antitumorali, può essere riciclato quale materia prima ad elevato valore aggiunto per applicazioni farmaceutiche, alimentari, biomediche e cosmetiche (Scott *et al.* 2010).

Quello che rende questa tecnologia ancora poco sfruttabile su larga scala è l'alto costo dei sistemi di crescita e di raccolta delle colture massive microalgali.

Considerando le richieste e i consumi dei combustibili fossili, ad oggi la produzione di biodiesel da colture oleaginose non è ancora sufficiente per una sostituzione di questi ultimi. Oggigiorno la produzione di biodiesel in Europa deriva per il 65% dagli oli vegetali, in Brasile per il 50% dalla coltivazione della canna da zucchero, mentre negli Stati Uniti il 40% della coltivazione di mais viene utilizzato per la produzione di etanolo (Razeghifard 2013).

Il potenziale delle microalghe, in generale, e delle diatomee, in particolare, per la produzione di biodiesel nei confronti delle colture oleaginose è stato più volte evidenziato in diverse pubblicazioni scientifiche internazionali. In una stima effettuata considerando la richiesta di fabbisogno nel settore dei trasporti americano, per poter soddisfare il 50% della richiesta in biodiesel sarebbe necessario un quantitativo di colture oleaginose che occuperebbe una superficie di coltivazione pari al 24% della superficie americana, mentre l'utilizzo delle microalghe ridurrebbe notevolmente la superficie di utilizzo fino al 3% (Tabella 1) (Chisti 2007).

Tabella 1 - Confronto nella produzione di biodiesel derivante da biomasse differenti (Chisti 2007)

Comparison of some sources of biodiesel		
Crop	Oil yield (L/ha)	Land area needed (M ha) ^a
Corn	172	1540
Soybean	446	594
Canola	1190	223
Jatropha	1892	140
Coconut	2689	99
Oil palm	5950	45
Microalgae ^b	136,900	2
Microalgae ^c	58,700	4.5

^a For meeting 50% of all transport fuel needs

^b 70% oil (by wt) in biomass.

^c 30% oil (by wt) in biomass.

Il costo per la produzione e la commercializzazione dei biocarburanti da microalghe è attualmente ridotto grazie all'opportunità di ottenere finanziamenti governativi nel settore delle energie pulite. Questi investimenti possono svolgere un ruolo cruciale in quanto il costo di produzione totale stimato per circa 0.6 tonnellate di biodiesel microalgale da 5 tonnellate di biomassa (raccolta ogni 12 giorni da un sistema chiuso) è di circa \$100000 (circa \$19 al gallone) per il primo anno di attività. Tuttavia, il costo stimato di olio algale in un sistema aperto è di circa \$4.75 al gallone. Nonostante l'elevato costo attuale della produzione di biocarburanti da microalghe, è importante che la ricerca in questo settore continui, considerando i benefici ambientali nell'impiego di colture biologiche come fonte di energia rinnovabile per contrastare l'aumento dei livelli di CO₂ nell'atmosfera (Razeghifard 2013).

Le diatomee, viste le loro caratteristiche specifiche, si inseriscono a pieno titolo nell'elenco delle specie microalgali potenzialmente utilizzabili per la produzione di biodiesel.

Aldilà degli aspetti strutturali e fisiologici già discussi precedentemente, per la produzione di biodiesel le diatomee presentano molte caratteristiche favorevoli rispetto alle altre microalghe.

Le diatomee sono ottimi accumulatori di lipidi grazie alla presenza dell'ampio vacuolo come sede di stoccaggio e presentano un'elevata capacità di assorbimento dei nutrienti e al tempo stesso di sopravvivenza a stati di deprivazione da nitrati e silicati che ne determinano, a livello fisiologico, condizioni di stress con conseguente maggiore accumulo di trigliceridi, importanti ai fini della produzione di biodiesel.

Si potrebbe pensare che è più difficile estrarre i lipidi dalle diatomee a causa delle loro pareti cellulari solide, ma ciò non è vero. Infatti sebbene i componenti della parete siano solidi, l'intera struttura è costituita da sottostrutture silicee che sono collegate a molecole organiche e che sono rotte facilmente, lasciando che i solventi organici estraggano lipidi e pigmenti (Hildebrand *et al.* 2012).

Queste caratteristiche, insieme alla capacità di crescita anche a bassa illuminazione e in presenza di forti turbolenze, fanno sì che la produttività stimata oscilli dai 5 ai 25 g m⁻² giorno⁻¹ e, nello

specifico, per la specie *Cyclotella cryptica* si aggiri intorno ai $20 \text{ g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$, il tutto perfettamente al passo con le produttività delle più comuni microalghe produttrici di biodiesel come *Nannochloropsis salina* e *Chlorella* sp. ($10 - 25 \text{ g m}^{-2} \text{ giorno}^{-1}$) (Hildebrand *et al.* 2012).

Il biodiesel ottenuto da fonti biologiche è costituito da miscele di esteri metilici di acidi grassi a lunga catena, generalmente acido stearico ed acido palmitico.

Le proprietà chimico-fisiche del biodiesel sono determinate dalla struttura degli acidi grassi che lo costituiscono. Mentre le insaturazioni, e di conseguenza il profilo degli acidi grassi, sembrano non influenzare la reazione di transesterificazione, invece determinano alcune importanti proprietà del biocarburante prodotto. Gli acidi grassi saturi producono un biodiesel con una maggiore stabilità ossidativa, con un più alto numero di cetano e con un aspetto gelatinoso a temperatura ambiente. Il biodiesel prodotto da biomasse ricche di PUFA (acidi grassi polinsaturi), invece, è caratterizzato da una facile ossidazione e grandi problemi di instabilità nei periodi prolungati di conservazione (Chisti 2007; Hu *et al.* 2008).

Nelle diatomee sono note diverse classi di idrocarburi: una prima classe comprende alcani quali il C17:0 e vari alcheni ritrovati da diversi gruppi di scienziati (Figura 16). Questi sono composti prodotti dalla biodecarbossilazione degli acidi grassi.

Un altro gruppo di idrocarburi sono biosintetizzati dagli acidi grassi, ma sia come risultato di una decarbossilazione che dell'allungamento della catena di carbonio, talvolta seguita dall'introduzione di ulteriori doppi legami (come l'n-25:7 e l'n-27:7).

Inoltre alcuni idrocarburi derivati dagli acidi grassi e presenti nelle diatomee potrebbero essere assorbiti dall'ambiente circostante. Ad esempio, è stato riscontrato che la diatomea marina *C. cryptica* in determinate condizioni di coltura è capace di accumulare idrocarburi esogeni, soprattutto a 16 atomi di carbonio, captandoli dal mezzo esterno (Stonik e Stonik 2015).

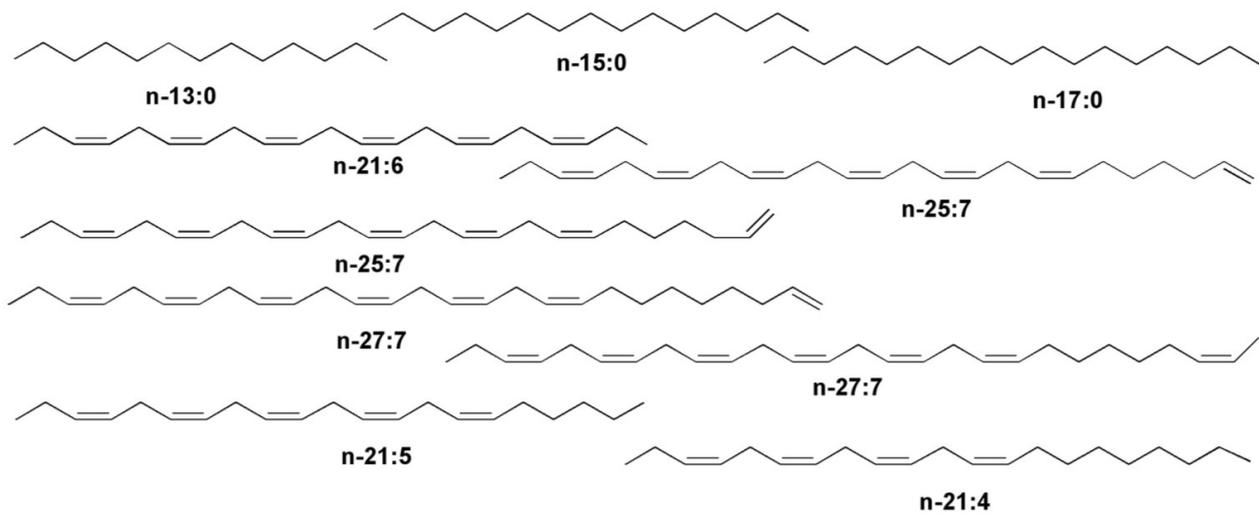


Figura 16 – Alcuni tipici idrocarburi delle diatomee (Stonik e Stonik 2015)

La produzione del biodiesel dalle diatomee necessita di tre punti di partenza fondamentali che sono: la scelta della specie da utilizzare in funzione del suo potenziale di produzione lipidica, l'ottimizzazione della crescita al fine di ricavare le migliori produttività e la conoscenza del metabolismo lipidico cellulare, al fine di poterlo ottimizzare a fini bioenergetici.

Per ogni fase del processo ci sono molti fattori da considerare e studiare, tra cui l'energia e i materiali da utilizzare (ad esempio le sostanze nutrienti e l'energia da impiegare per la miscelazione della coltura durante la crescita) e il trattamento più appropriato della biomassa residua. Inoltre va anche considerato se è meglio impiegare i bioreattori chiusi o aperti, le strategie da adottare per evitare contaminazioni da parte di altri organismi e come le sostanze nutritive e la CO₂ devono essere somministrati alla coltura. Infatti per la maggior parte delle microalghe, diatomee comprese, la sintesi di molecole come i TAG può essere influenzata e ottimizzata variando le condizioni di crescita (Figura 17) (Scott *et al.* 2010).

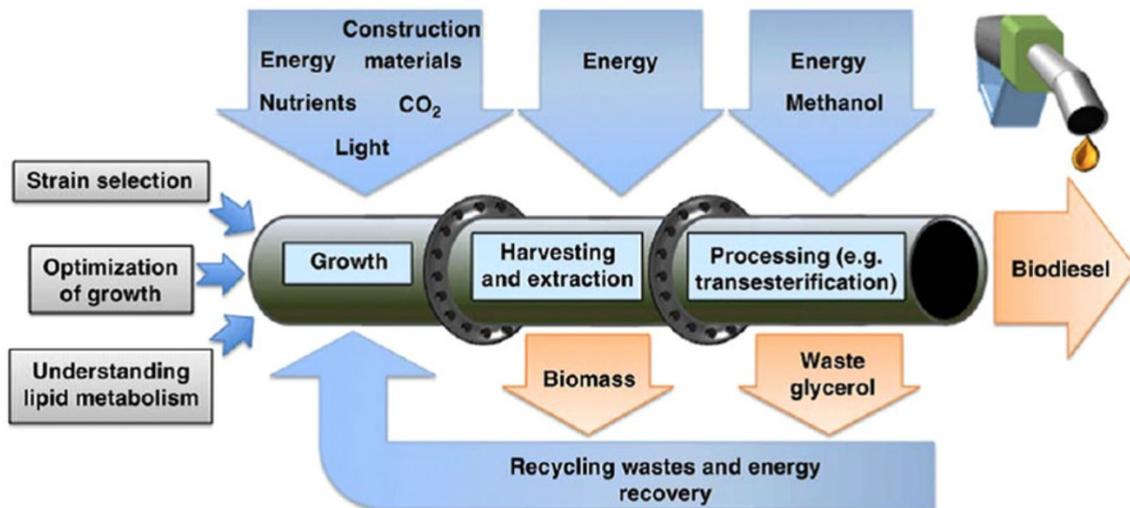


Figura 17 – Schema in cui sono mostrate le principali fasi e gli input e output da tenere in considerazione nel processo di produzione di biodiesel microalgale (Scott *et al.* 2010)

1.3 OBIETTIVI DEL LAVORO DI TESI DOTTORALE

Come ora appare chiaro, le diatomee sono alghe unicellulari marine che svolgono un ruolo ecologico importante come principali attori della produzione primaria globale costituendo il più importante gruppo eucariotico del fitoplankton (Avancini *et al.* 2006). Questi organismi sono in grado di sopravvivere e proliferare in una vasta gamma di condizioni ambientali, adattando il loro metabolismo con meccanismi ancora in gran parte sconosciuti.

Tale importanza in ambito ecologico insieme con le caratteristiche chimiche naturali di questi organismi sono state spunto e base di partenza per la ricerca scientifica oggetto del presente lavoro di tesi dottorale svolto presso l'Istituto di Chimica Biomolecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche (ICB – CNR) di Pozzuoli (Na). Tale ricerca è nata con la finalità di ottenere una produzione sostenibile di bio-oli e di raggiungere tale scopo mediante l'osservazione, lo studio e la comprensione dei meccanismi metabolici alla base delle trasformazioni delle componenti lipidiche, delle cinetiche dei processi biochimici e dell'effetto dei nutrienti, della CO₂ e dei gas di scarico da motore a combustione su colture di diatomee cresciute in laboratorio ed in campo.

L'intera attività è inserita in un corretto programma di pianificazione necessario per ottenere come fine applicativo la produzione di bio-oli. Tale programma ha come punti chiave:

- la scelta di uno o più ceppi dal buon potenziale lipidico;
- l'ottimizzazione delle crescite e delle produttività;
- l'approfondimento della conoscenza del metabolismo lipidico.

A seguito di un lavoro preliminare di screening sono state scelte come protagoniste dello studio due specie di diatomee marine, *Thalassiosira weissflogii* e *Cyclotella cryptica*; successivamente, sfruttando come base di partenza la capacità fissativa della CO₂ di questi organismi e nell'ottica di un loro possibile impiego in colture massive outdoor con utilizzo di gas ad effetto serra, è stata posta particolare attenzione allo studio degli effetti, anche combinati, di fattori di stress quali la somministrazione di CO₂ e la deprivazione di nutrienti su colture di entrambe le specie. Particolare attenzione è stata posta sulle produttività in biomassa e lipidi e sulla produzione di lipidi neutri di riserva, come i triacilgliceroli.

A seguito dell'analisi dei risultati della prima fase di sperimentazione effettuata su entrambe le specie in colture indoor su piccola scala, si è scelto di differenziare l'impiego dei due ceppi utilizzando la diatomea *T. weissflogii* per la sperimentazione outdoor su scala pre-industriale grazie ad un impianto di nuova costruzione da 8000 L di volume di lavoro sito presso lo stabilimento I.GI. di Palomonte (Sa).

All'interno di uno scenario ancora oggi molto complesso e per certi versi sconosciuto, quale quello strettamente legato al metabolismo lipidico delle diatomee, si è inserita un'altra parte dell'attività di tesi, che ha visto l'impiego della seconda specie selezionata nello screening iniziale, *C. cryptica*. Per tale aspetto è stato applicato un triplice approccio (spettrometrico di massa mediante UHPLC/HRMS, spettroscopico di risonanza magnetica mediante ¹H-NMR e trascrittomico) risultato fondamentale come attività preliminare per mettere in luce meccanismi i metabolici strettamente legati alla produzione di lipidi nelle condizioni di crescita messe a punto nelle prove di laboratorio.

2. SELEZIONE DELLE SPECIE MODELLO

2.1 INTRODUZIONE

2.1.1 Screening tra microalghe e diatomee per la selezione delle specie modello

Le microalghe oleaginose sono tassonomicamente molto differenti e il loro contenuto lipidico totale può variare notevolmente sia tra i diversi gruppi tassonomici che tra gli individui della stessa specie. Questi organismi mostrano un contenuto medio in lipidi pari a circa il 25% del peso secco della biomassa totale e che può aumentare (anche raddoppiare o triplicare) quando le cellule sono cresciute in condizioni di stress (Rodolfi *et al.* 2009).

Nello specifico le diatomee producono gocce di olio che vengono conservate nell'ambiente intracellulare come materiale di riserva, con percentuali che variano da meno del 12% a più del 45% del peso secco, a seconda delle condizioni di crescita (Hildebrand *et al.* 2012). Sia manipolazioni genetiche che delle condizioni di crescita hanno dimostrato la possibilità di aumentare la produzione di lipidi nelle cellule, rinnovando l'interesse sugli studi riguardanti il potenziale di questi microrganismi per la produzione di biocombustibili (Hildebrand *et al.* 2012).

Uno dei punti chiave per poter sviluppare una tecnologia basata sulla produzione di biocarburanti da microalghe, in particolar modo diatomee, è la selezione di specie produttive e robuste. L'Aquatic Species Programme (Sheehan *et al.* 1998) ha riportato l'isolamento, la caratterizzazione e lo screening di più di 3000 specie differenti. Da questo studio furono selezionati circa 50 ceppi microalgali, di cui il 60% erano diatomee, scelti su criteri come alte velocità di crescita, produttività lipidica e capacità di essere coltivate su larga scala (Hildebrand *et al.* 2012). Più recentemente, molti autori hanno focalizzato l'attenzione sulla potenziale produttività di specie come *Nannochloropsis* sp., che è stata indicata come il miglior candidato da impiegare per la produzione di biocarburanti fra una trentina di ceppi di microalghe marine e di acqua dolce (Rodolfi *et al.*

2009). Altri screening sono stati effettuati da Griffiths e Harrison (2009) basandosi sull'analisi delle biomasse e delle produttività dei lipidi per la potenziale applicazione di 55 microalghe per la produzione di biocarburanti; Nascimento *et al.* (2013) ha selezionato specie di *Chlorella* e *Botryococcus* tra 12 ceppi diversi, utilizzando i profili di produttività dei lipidi e degli acidi grassi come criteri selettivi.

Riprendendo studi condotti negli ultimi anni nel laboratorio dove è stato svolto il lavoro di tesi, la prima parte dell'attività sperimentale ha riguardato l'analisi comparativa di 21 specie di microalghe, principalmente diatomee, in relazione alla produttività in biomassa e lipidi.

2.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

2.2.1 Selezione delle specie modello

Per la selezione di specie di diatomee robuste e produttive gli obiettivi da raggiungere sono stati:

- testare la produttività in biomassa e lipidi di 17 specie di diatomee presenti nella ceppoteca di Istituto. I risultati sono stati messi a confronto con quelli ottenuti utilizzando 4 microalghe verdi scelte tra i generi maggiormente impiegati per la produzione di olio;
- selezionare le diatomee più promettenti mediante applicazione dell'Analisi della Componente Principale (PCA);
- verificare sulle specie selezionate una prima risposta del metabolismo lipidico in condizioni di parziale limitazione di alcuni nutrienti, come il silicio (Si) e l'azoto (N), in un modello di coltura a due stadi (d'Ippolito *et al.* 2015).

Nelle prove sperimentali effettuate durante lo screening, ogni ceppo microalgale ha mostrato una specifica pendenza e durata della curva di crescita, che presumibilmente riflette anche una variabilità nelle risposte cellulari e metaboliche tra le diverse specie. Poiché non è stato possibile determinare un giorno comune di raccolta della biomassa per tutti i ceppi, ogni coltura è stata raccolta in fase stazionaria e sono stati valutati una serie di parametri chimici e biochimici relativi

ad ogni crescita. In tabella 1 sono riportati i principali parametri di crescita e i valori delle produttività ottenute per le singole specie.

Tabella 1 – Parametri chimici e biochimici analizzati nelle colture di 17 diatomee marine in confronto con altre microalghe marine (d’Ippolito *et al.* 2015)

Class	Microalae	Onset stationary phase (days)	Duplication time (h)	Biomass productivity (mg L ⁻¹ day ⁻¹)	Lipid productivity (mg L ⁻¹ day ⁻¹)	Percentage of lipids	Percentage of FFA	Percentage of TAG	Percentage of GL	Percentage of PL
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros curvisetus</i> CCMP 3260	7	18	13.22 ± 0.66	1.97 ± 0.04	14.86 ± 0.31	100	—	—	—
	<i>Chaetoceros socialis</i> CCMP 3263	7	16	2.47 ± 0.07	0.19 ± 0.01	7.63 ± 0.23	100	—	—	—
	<i>Chaetoceros affinis</i> CCMP 3259	7	17	4.13 ± 0.17	0.50 ± 0.01	12.11 ± 0.30	100	—	—	—
	<i>Thalassiosira rotula</i> CCMP 1647	7	17	5.44 ± 0.33	0.43 ± 0.01	7.95 ± 0.26	100	—	—	—
	<i>Thalassiosira rotula</i> CCMP 3264	7	19	4.35 ± 0.22	0.54 ± 0.02	12.42 ± 0.37	100	—	—	—
	<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09	6	16	24.29 ± 0.97	7.27 ± 0.28	29.94 ± 1.17	3.0 ± 0.2	51.0 ± 3.2	30.0 ± 1.0	16.0 ± 1.0
	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1010	6	22	12.53 ± 0.44	4.87 ± 0.10	38.84 ± 0.78	8.0 ± 0.3	53.0 ± 1.9	21.0 ± 1.3	18.0 ± 1.1
	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1336	6	24	14.84 ± 0.45	3.48 ± 0.10	23.48 ± 0.66	5.0 ± 0.3	45.0 ± 3.2	31.0 ± 1.3	19.0 ± 1.1
	<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP 1335	8	24	5.87 ± 0.24	1.72 ± 0.07	29.33 ± 1.17	5.0 ± 0.3	19.0 ± 0.9	55.0 ± 1.8	21.0 ± 1.0
	<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331	13	48	7.11 ± 0.14	2.98 ± 0.09	41.97 ± 1.26	0	55.0 ± 2.1	24.0 ± 1.7	21.0 ± 1.0
	<i>Skeletonema marinoi</i> CCMP 2092	7	23	9.02 ± 0.54	0.85 ± 0.02	9.38 ± 0.23	100	—	—	—
	<i>Skeletonema marinoi</i> CCMP 2052	7	16	7.17 ± 0.27	0.66 ± 0.03	9.14 ± 0.43	100	—	—	—
	<i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343	7	15	27.27 ± 1.09	4.78 ± 0.18	17.51 ± 0.67	7.0 ± 0.2	18.0 ± 0.7	54.0 ± 3.2	21.0 ± 0.5
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCMP 632	11	29	22.44 ± 0.90	2.09 ± 0.06	9.32 ± 0.28	11.0 ± 0.7	19.0 ± 0.6	44.0 ± 2.1	26.0 ± 1.0
	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> B317	10	15	4.12 ± 0.11	0.56 ± 0.03	13.50 ± 0.81	100	—	—	—
<i>Ditylum brightwellii</i> CCMP 358	12	34	4.66 ± 0.28	0.57 ± 0.03	12.20 ± 0.71	52.0 ± 3.6	—	19.0 ± 0.8	29.0 ± 1.8	
<i>Melosira octogona</i> CCMP 483	10	25	9.10 ± 0.44	1.88 ± 0.11	20.60 ± 1.24	2.0 ± 0.1	29.0 ± 1.8	38.0 ± 1.2	31.0 ± 1.9	
Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369	21	44	33.09 ± 1.16	7.27 ± 0.31	21.98 ± 0.92	14.0 ± 0.5	20.0 ± 0.5	39.0 ± 2.3	27.0 ± 1.6
Chlorophyceae	<i>Dunaliella salina</i> CCAP19/18	20	83	19.79 ± 0.99	5.22 ± 0.17	26.36 ± 0.87	6.0 ± 0.3	7.0 ± 0.3	49.0 ± 2.1	38.0 ± 2.3
	<i>Dunaliella tertiolecta</i> CCMP 1320	14	51	36.42 ± 1.02	9.71 ± 0.44	26.65 ± 1.20	5.0 ± 0.2	17.0 ± 1.2	53.0 ± 1.7	25.0 ± 1.1
	<i>Chlamydomonas</i> sp. CCMP 222	12	30	14.26 ± 0.53	2.98 ± 0.15	20.92 ± 1.05	3.0 ± 0.2	7.0 ± 0.3	60.0 ± 3.7	30.0 ± 1.0

Nonostante la differenza nella produzione assoluta di biomassa (700 mg L⁻¹ per *Nannochloropsis salina*, 500 mg L⁻¹ per *Dunaliella tertiolecta*, 195 mg L⁻¹ per *Cylindrotheca fusiformis*, 146 mg L⁻¹ per *Thalassiosira weissflogii* P09, 247 mg L⁻¹ per *Phaeodactylum tricornutum*), la produttività (mg L⁻¹ giorno⁻¹) delle diatomee è paragonabile a quella delle microalghe verdi (per esempio, 33 mg L⁻¹ giorno⁻¹ per *N. salina*, 36 mg L⁻¹ giorno⁻¹ per *D. tertiolecta*, 27 mg L⁻¹ giorno⁻¹ per *C. fusiformis*, 24 mg L⁻¹ giorno⁻¹ per *T. weissflogii* P09 e 22 mg L⁻¹ giorno⁻¹ per *P. tricornutum*).

In condizioni di crescita standard e presenza di nutrienti, la frazione lipidica in alcune specie di diatomee (ad esempio, *T. weissflogii* CCMP 1010 o *Cyclotella cryptica* CCMP 331) rappresentava quasi il 40% della materia organica totale, mentre per le altre microalghe, comprese quelle verdi, i livelli dei lipidi sono risultati di solito inferiori al 30% della biomassa totale.

Per quanto concerne il contenuto dei triacilgliceroli (TAG), alcune diatomee hanno mostrato un'alta percentuale di tale frazione, che costituiva anche più del 50% del contenuto lipidico totale (d'Ippolito *et al.* 2015).

I risultati ottenuti sono stati elaborati tramite analisi statistica multivariata con l'applicazione dell'Analisi della Componente Principale (PCA). I parametri presi in considerazione sono stati il tempo di duplicazione, la produttività in biomassa e lipidi, la percentuale di lipidi rispetto alla biomassa liofila, la percentuale dei triacilgliceroli e degli acidi grassi liberi rispetto al contenuto totale di glicerolipidi.

Attraverso l'Analisi della Componente Principale (PCA) si ottiene una ripartizione dei dati biologici di partenza e delle specie prese in considerazione nello screening in uno spazio tridimensionale (score plot), mentre la posizione di ogni specie è determinata dalla variazione dei parametri nel loading plot (Figura 1) Le specie microalgali clusterizzano in quattro gruppi ben definiti con un alto significato statistico (80%), ottenendo anche una netta separazione tra le diatomee e le specie non-diatomee (Figura 1A). Il loading plot in figura 1B evidenzia il contributo di ciascun parametro nella determinazione della posizione delle specie nello score plot.

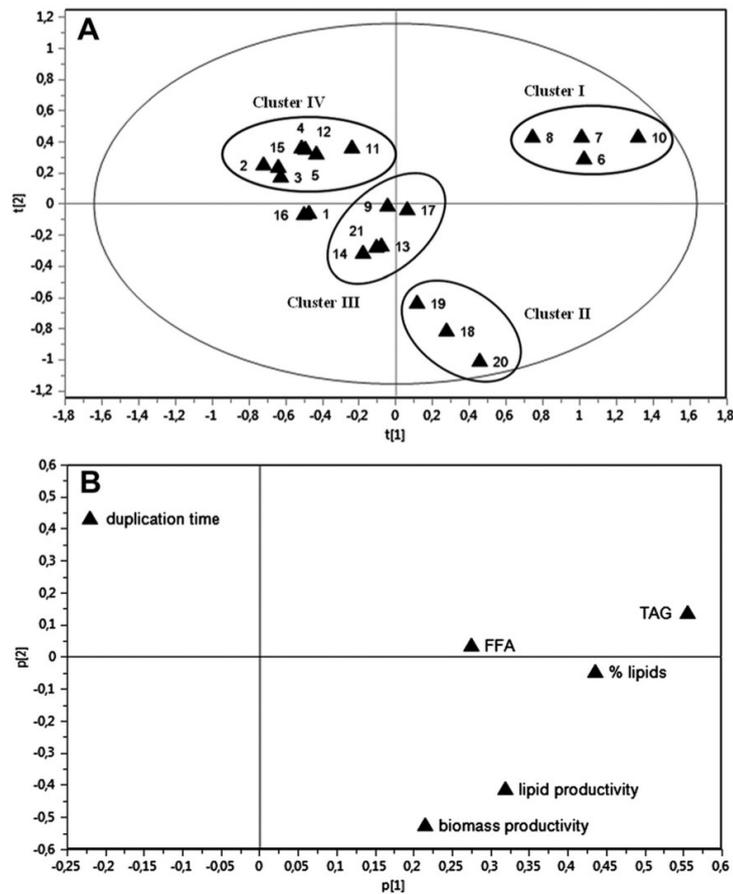


Figura 1 – Analisi PCA della distribuzione delle specie in due modelli statistici: (A) score plot delle specie impiegate nello screening; (B) loading plot dei parametri responsabili della loro diversa suddivisione. 1 *Chaetoceros curvisetus*, 2 *Chaetoceros socialis*, 3 *Chaetoceros affinis*, 4 *Thalassiosira rotula* 1647, 5 *Thalassiosira rotula* 3264, 6 *Thalassiosira weissflogii* P09, 7 *Thalassiosira weissflogii* 1010, 8 *Thalassiosira weissflogii* 1336, 9 *Thalassiosira pseudonana*, 10 *Cyclotella cryptica*, 11 *Skeletonema marinoi* 2092, 12 *Skeletonema marinoi* 2052, 13 *Cylindrotheca fusiformis*, 14 *Phaeodactylum tricornutum*, 15 *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*, 16 *Ditylum brightwelli*, 17 *Melosira octogona*, 18 *Nannochloropsis salina*, 19 *Dunaliella salina*, 20 *Dunaliella tertiolecta*, 21 *Chlamydomonas* sp. (d’Ippolito *et al.* 2015)

I quattro cluster individuati erano costituiti:

- cluster 1: specie con alta percentuale di lipidi e di triacilgliceroli;
- cluster 2: specie con alta produttività lipidica e resistenza alle contaminazioni;
- cluster 3: specie con bassi livelli di triacilgliceroli;
- cluster 4: specie con tempi di duplicazione brevi e forte attività enzimatica idrolitica.

All'interno del cluster 1, quello caratterizzato da una più alta percentuale di lipidi e triacilgliceroli, sono rientrate le quattro specie di diatomee centriche: gli strain di *T. weissflogii* e *C. cryptica*.

Una grande differenza nei tempi di duplicazione e nella percentuale di lipidi, in particolare trigliceridi, determinava la separazione di queste specie da *Dunaliella salina*, *D. tertiolecta* e *N. salina* (cluster 2), anche se la produttività lipidica nei due gruppi è in alcuni casi confrontabile (ad esempio $7.3 \text{ mg L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$ per *T. weissflogii* P09 e *N. salina* e $9.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$ per *D. tertiolecta*). Il cluster 2 è caratterizzato da elevata produttività lipidica e comprende i generi microalgali che hanno suscitato notevole interesse nella ricerca di candidati biologici per la produzione di energia da biomasse.

Nel cluster 3, caratterizzato da bassi livelli di TAG, sono rientrate le diatomee oggi più largamente studiate per la produzione di biodiesel (*T. pseudonana* e *P. tricornutum*).

Nel cluster 4 sono raggruppate le diatomee che hanno alte velocità di duplicazione ma che, rispetto al cluster 1, presentano una bassa produttività lipidica a causa di una forte attività enzimatica idrolitica, che determina una diminuzione delle principali classi di lipidi e un conseguente aumento dei livelli di acidi grassi liberi, che influenzano negativamente l'impiego biotecnologico di queste specie come potenziali fonti di bio-oli (d'Ippolito *et al.* 2015).

Quindi tra 21 ceppi microalgali metodi statistici basati sull'analisi multivariata hanno permesso di selezionare due ceppi, *T. weissflogii* P09 e *C. cryptica* CCMP 331, che nelle condizioni sperimentali utilizzate presentavano valori di produttività di biomassa, lipidi e trigliceridi superiori a quelli delle più comuni microalghe verdi, come *Nannochloropsis* sp. e *Dunaliella* sp., attualmente in uso per la produzione di biodiesel.

Il genere *Thalassiosira* è costituito da moltissime specie: la maggior parte (circa 100) sono marine, anche se almeno dodici sono state isolate da acque dolci. Le cellule hanno forma cilindrica e sono generalmente singole o unite in fili; hanno numerosi plastidi discoidali e sono tra i principali componenti del plancton marino (Figura 2) (<http://www.algaebase.org>).

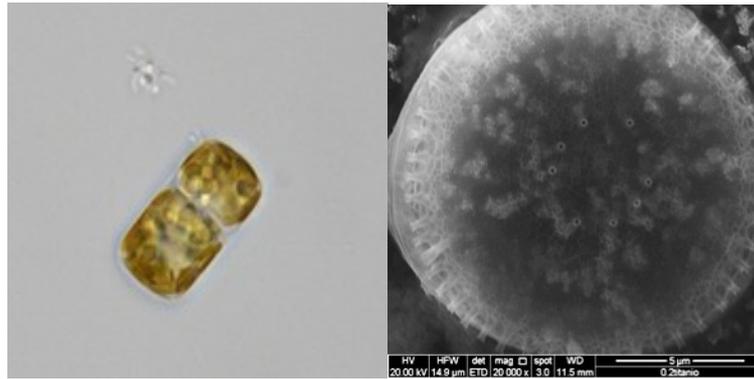


Figura 2 – Fotografia al microscopio ottico (100x, a sinistra) e al microscopio elettronico a scansione (20000x, a destra) della diatomea centrica *T. weissflogii*

Il genere *Cyclotella* è rappresentato da circa un centinaio di specie ed è costituito da organismi unicellulari, dal frustulo corto e cilindrico, che mostrano una forma rettangolare in vista commesurale. Le dimensioni sono molto ridotte: il diametro valvare varia da 3.5 a 70 µm; i cloroplasti sono numerosi e rotondi; in genere vivono in acqua dolce, ma sono presenti anche in ambiente marino; non sono mai stati segnalati né stati di resistenza e né tossicità (Figura 3) (Avancini *et al.* 2006).

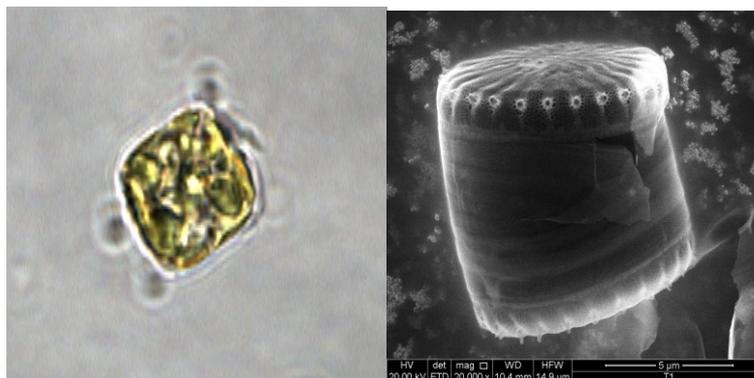


Figura 3 – Fotografia al microscopio ottico (100x, a sinistra) e al microscopio elettronico a scansione (20000x, a destra) della diatomea centrica *C. cryptica*

Attualmente una delle tecniche di laboratorio, a volte non sempre semplice da riprodurre anche in campo industriale, per aumentare la produzione lipidica è quella di sottoporre durante la crescita le specie microalgali a condizioni di stress da nutrienti. E' noto infatti che la limitazione dei nutrienti

influenza il metabolismo microalgale e in particolare la produttività in olio (Hildebrand *et al.* 2012). La quantità di lipidi che potenzialmente può essere prodotta in queste condizioni è enorme e ciò giustificherebbe gli sforzi da fare per superare gli ostacoli tecnici per applicare questa metodica in campo industriale.

Ad oggi, gli effetti che stress da nutrienti provocano sul metabolismo lipidico delle diatomee sono abbastanza controversi e comunque risultano essere specie-specifici (Yu *et al.* 2009; Chauton *et al.* 2013).

Quindi un'altra parte dell'attività sperimentale è stata quella di verificare una risposta preliminare del metabolismo lipidico di *T. weissflogii* e *C. cryptica*, le due diatomee presenti nel cluster 1 e precedentemente selezionate, in condizioni di parziale limitazione di alcuni nutrienti.

T. weissflogii e *C. cryptica* sono state sottoposte ad una condizione di crescita a due stadi, con una prima fase in cui le sostanze nutritive venivano fornite alla coltura in modo continuo seguita da una fase di induzione della produzione lipidica in condizioni di limitazione parziale di nutrienti. In queste prove preliminari l'apporto di silice e azoto nel mezzo di crescita è stato solo il 20% rispetto alle condizioni standard.

Entrambe le specie, poste in seconda fase di crescita sia non in limitazione che in parziale carenza di nutrienti, hanno mostrato una buona produttività in biomassa e lipidi (Figura 4). Per *T. weissflogii* si può osservare una diminuzione della percentuale lipidica quando i mezzi, sia completi che deprivati parzialmente di nutrienti, sono stati sostituiti, anche se questo non si ripercuote sulla produttività, visto l'aumento della biomassa. Nelle condizioni sperimentali riportate, solo *C. cryptica* ha mostrato un lieve aumento della biomassa in condizioni di limitazione di N, anche se questo effetto non ha comportato un aumento paragonabile nei lipidi.

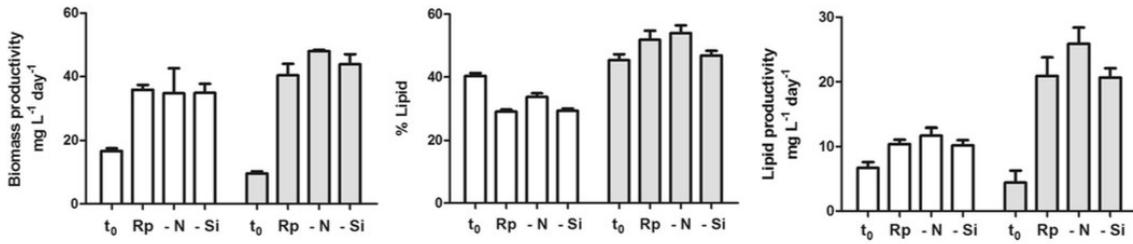


Figura 4 – Effetto della deprivazione parziale di nutrienti (Si e N) sulle produttività di biomassa e lipidi per le diatomee centriche *T. weissflogii* e *C. cryptica* cresciute secondo d’Ippolito *et al.* 2015

Per quanto riguarda la composizione della frazione lipidica estratta dai campioni cresciuti in diverse condizioni, questa è stata analizzata mediante Spettroscopia di Risonanza Magnetica (NMR) utilizzando un protocollo analitico messo a punto per una rapida stima quantitativa di trigliceridi e altri glicerolipidi negli estratti grezzi di microalghe (Nuzzo *et al.* 2013).

In figura 5 sono mostrate le produttività ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$) di triacilgliceroli (TAG), glicolipidi (GL) e fosfolipidi (PL) nelle varie condizioni sperimentali. Gli acidi grassi liberi sono ottenuti per differenza dal contenuto lipidico totale. I livelli dei TAG erano quasi dieci volte superiori ai GL e fino a venti volte in più dei PL. In accordo con i dati sul consumo dei nutrienti, questi risultati indicano l’accumulo di TAG nelle condizioni utilizzate in questo studio, in accordo con Traller e Hildebrand (2013). La crescita di entrambe le diatomee in limitazione di silice non ha indotto cambiamenti nei livelli di TAG, mentre la limitazione di azoto ha indotto un aumento (circa il 20%) nella produttività dei triacilgliceroli rispetto al controllo per *C. cryptica* (d’Ippolito *et al.* 2015).

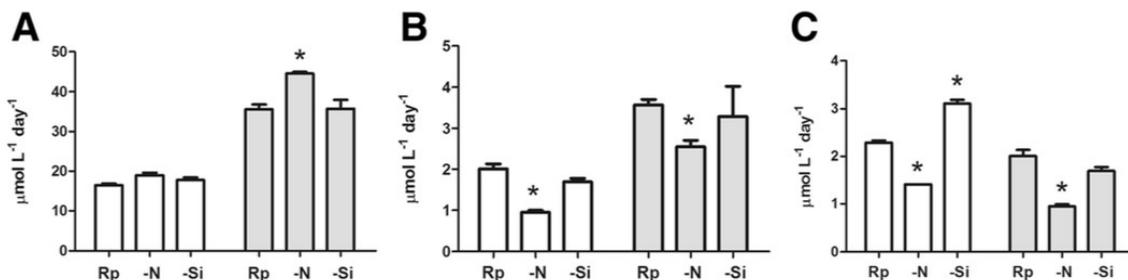


Figura 5 – Variazione di: a) triacilgliceroli, b) glicolipidi, c) fosfolipidi in *T. weissflogii* e *C. cryptica* cresciute secondo d’Ippolito *et al.* 2015

2.3 CONCLUSIONI

Nel primo periodo di tesi, insieme allo sviluppo delle tecniche analitiche e dei protocolli di crescita, è stata eseguita un'analisi delle potenzialità produttive di 21 specie di microalghe.

Lo screening effettuato su 21 ceppi microalgali ha permesso di selezionare due diatomee marine, *T. weissflogii* P09 e *C. cryptica* CCMP 331, che, nelle condizioni sperimentali utilizzate, presentavano valori molto significativi di produttività di biomassa, lipidi e triacilgliceroli, con livelli anche superiori a quelli delle più comuni microalghe verdi attualmente in uso per la produzione di biodiesel.

Inoltre risultati preliminari ottenuti sulle due specie in condizioni di parziale limitazione di N o Si hanno dimostrato la notevole plasticità metabolica di questi organismi in risposta a stimoli esterni, aprendo la strada a studi sperimentali più approfonditi sia per ottimizzare le condizioni di crescita per incrementare la produttività in biomassa, lipidi e TAG, sia per effettuare studi metabolici che permettano di comprendere meglio come la deprivazione di alcuni nutrienti, eventualmente anche accoppiata alla somministrazione nelle colture di gas climalteranti, vada ad agire sull'equilibrio metabolico delle cellule.

3. INFLUENZA DI GAS (CO₂) E NUTRIENTI NELLE COLTURE DELLE SPECIE MODELLO

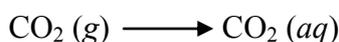
3.1 INTRODUZIONE

3.1.1 Caratteristiche ed equilibri chimici dell'anidride carbonica

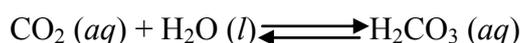
Il biossido di carbonio o anidride carbonica (CO₂) è uno dei gas presenti nella nostra atmosfera ed è distribuito uniformemente con una concentrazione di circa 0.04% (corrispondente a circa 400 ppm).

Oltre ad essere presente in forma gassosa come componente dell'atmosfera, l'anidride carbonica è presente anche in forma disciolta in acqua. A temperatura ambiente, la solubilità dell'anidride carbonica è di circa 90 cm³ di CO₂ per 100 mL di acqua.

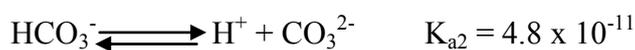
In soluzione acquosa il biossido di carbonio si presenta in diverse forme. In primo luogo, semplicemente si dissolve:



Poi si stabilisce un equilibrio tra la CO₂ disciolta e l'acqua per dare l'H₂CO₃ (acido carbonico):



Solo circa l'1% della CO₂ disciolta esiste come H₂CO₃. L'acido carbonico infatti è un acido debole che si dissocia in due componenti:



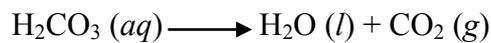
Quando l'anidride carbonica si dissolve nell'acqua di mare, lo ione carbonato, CO₃²⁻, interagisce con i cationi ivi presenti. Secondo le regole della solubilità: “tutti i carbonati sono insolubili, salvo quelli di ammonio e degli elementi del gruppo IIA”: di conseguenza l'interazione tra l'anione carbonato con cationi come Ca²⁺ e Mg²⁺ ne provoca la precipitazione in grossi quantitativi.

Per il carbonato di calcio (CaCO₃), il valore di K_{sp} è 5×10^{-9} e per il carbonato di magnesio (MgCO₃) il K_{sp} è 2×10^{-3} .

Anche se non è solubile in acqua, il carbonato di calcio si dissolve in soluzioni acide. In queste condizioni lo ione carbonato si comporta come una base di Brønsted:



Quindi in condizioni acide è possibile liberare anidride carbonica dall'acido carbonico che si dissocia secondo la reazione:



L'anidride carbonica a pressione atmosferica e a temperatura ambiente è presente come gas e non può esistere in forma liquida in condizioni di pressione atmosferica a nessuna temperatura (Figura 1) (Shakhashiri 2008).

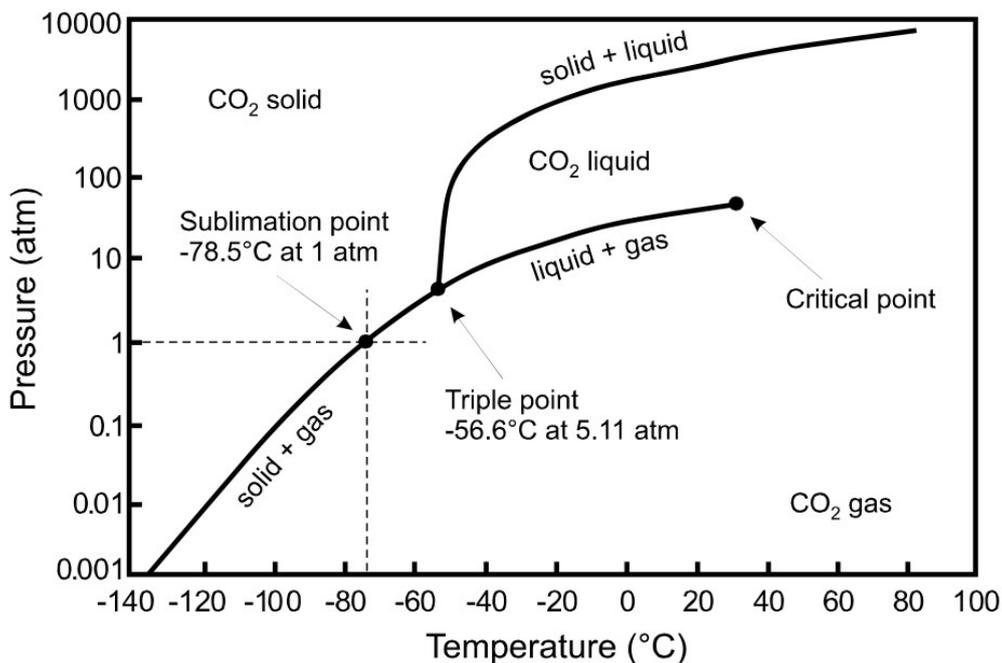


Figura 1 – Diagramma di fase della CO₂ in relazione alle varie pressioni e temperature (Shakhashiri 2008)

Inoltre anche in base al pH della soluzione variano gli equilibri tra lo ione bicarbonato, lo ione carbonato e l'acido carbonico (Figura 2).

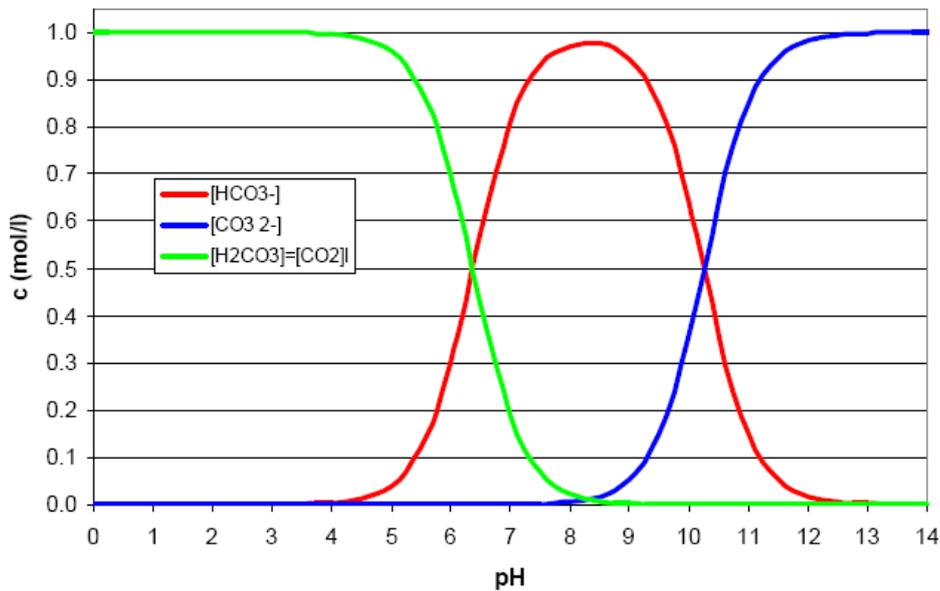


Figura 2 – Equilibri tra pH e ione bicarbonato (rosso), ione carbonato (blu) e acido carbonico (verde)

Si può vedere che a pH < 4.5 c'è solo acido carbonico (e CO₂ disciolta), a valori di pH compresi tra 5 e 10 prevale il bicarbonato, che è l'unica forma esistente al valore di pH 8.3; a valori di pH > 10 prevale lo ione carbonato. Quindi in acqua a pH leggermente basico gli ioni HCO₃⁻ e CO₃²⁻ sono la fonte principale di carbonio inorganico per gli organismi acquatici.

In pratica nell'ecosistema marino si forma un sistema tampone attraverso un equilibrio dinamico fra anidride carbonica, acido carbonico, bicarbonato e carbonato che permette di mantenere il pH intorno a 8.3 (Lower 1999).



3.1.2 Effetti della CO₂ sulla fisiologia delle diatomee

Le microalghe possono essere considerate una fonte alternativa di energia rinnovabile in quanto catturano la CO₂ attraverso la fotosintesi e la convertono in composti organici con basso stato di ossidazione (carbonio ridotto) come i triacilgliceroli (TAG), che possono essere utilizzati per produrre biocarburanti (Razeghifard 2013).

Il processo di base del metabolismo delle microalghe è la fotosintesi, che avviene nei cloroplasti ed è caratterizzata da una fase luminosa e una buia (Figura 3). Questo processo inizia quando l'energia della luce è assorbita e impiegata per scindere una molecola d'acqua e dare vita a un flusso di elettroni che parte da speciali molecole di clorofilla dei due fotosistemi; infatti la fotosintesi ossigenica è supportata dal fotosistema I (PSI) e II (PSII), che sono complessi di proteine e pigmenti. Il NADPH e l'ATP prodotti nella prima parte della fotosintesi sono poi utilizzati nel ciclo di Calvin per fissare la CO₂ in carboidrati, che poi possono essere convertiti in lipidi (tra i quali i TAG) che possono essere estratti e processati per produrre biodiesel (Figura 3).

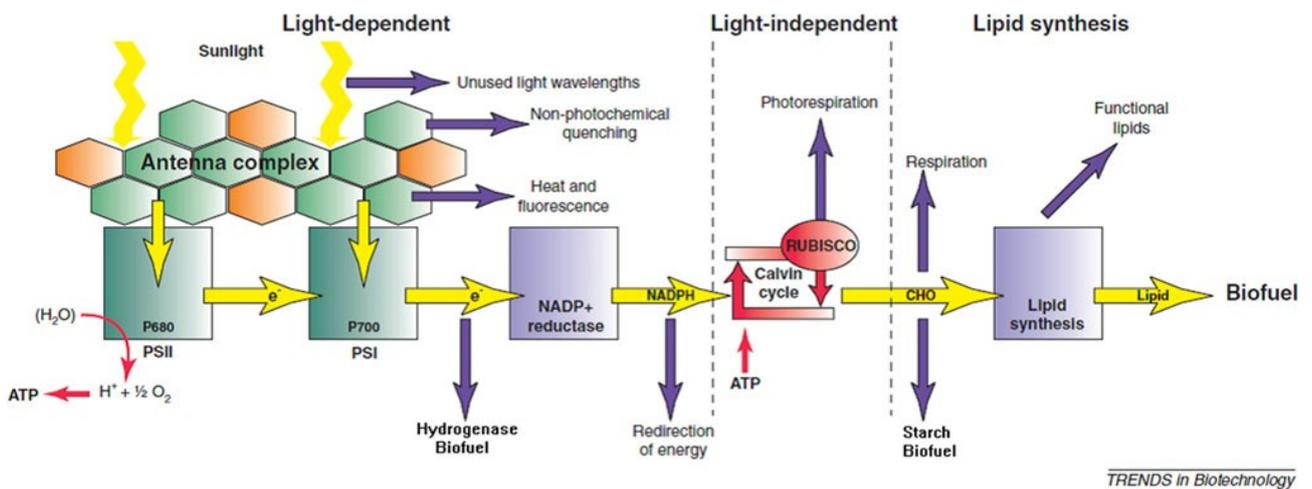


Figura 3 – Schema di conversione dell'energia solare in biocarburanti mediante il processo fotosintetico. La prima parte mostra l'assorbimento della luce da parte dei fotosistemi I e II utilizzando i loro complessi antenna (LHC) e le reazioni che portano alla formazione del NADPH e del gradiente protonico transmembrana. Il gradiente di protoni determina la formazione di ATP. NADPH e ATP sono utilizzati nel ciclo di Calvin per fissare la CO₂ nei carboidrati grazie all'enzima RUBISCO. Uno dei destini dei carboidrati è la loro conversione in lipidi, in particolare triacilgliceroli, che possono essere estratti e lavorati per produrre biodiesel (Razeghifard 2013)

La fissazione autotrofa della CO₂ si realizza grazie all'enzima ribulosio bisfosfato carbossilasi/ossigenasi (RUBISCO), che, in sei cicli successivi, carbossila sei molecole di partenza di ribulosio bisfosfato (RuBP, ciascuna a cinque atomi di C) con sei molecole di CO₂ formando dodici molecole di 3-fosfoglicerato (PGAL, ciascuna a tre atomi di C), che vengono poi ridotte a gliceraldeide-3-fosfato (G3P, ciascuna a tre atomi di carbonio). Nell'insieme, dieci molecole di G3P rigenerano sei molecole iniziali di RuBP, mentre due danno origine a una molecola di glucosio (a sei atomi di C). Quindi zuccheri, cellulosa, lipidi e altre macromolecole sono prodotte tutte a partire dal G3P.

Il destino del carbonio fissato fotosinteticamente è fortemente influenzato dalle condizioni ambientali. Nelle diatomee la maggior parte del carbonio è fissato in glucosio, che poi viene convertito in piruvato, che è decarbossilato ad opera del complesso della piruvato deidrogenasi (PDC) per formare acetil-CoA (Ac-CoA) (Razeghifard 2013; Levitan *et al.* 2014; Mohan *et al.* 2015).

Nella maggioranza dei casi, gran parte dell'Ac-CoA è usato per formare metaboliti intermedi per i pathway anabolici come la biosintesi degli amminoacidi. Tuttavia, in condizioni di stress, le cellule indirizzano il carbonio fissato verso composti di riserva, con la carbossilazione irreversibile dell'Ac-CoA, grazie all'acetil-CoA carbossilasi, a malonil-CoA, che è il substrato necessario per la biosintesi degli acidi grassi. Da questi è possibile sintetizzare i triacilgliceroli che, nella maggior parte delle diatomee, sono i principali composti di riserva e si accumulano in vacuoli presenti nel citoplasma (Figura 4) (Razeghifard 2013; Levitan *et al.* 2014; Mohan *et al.* 2015).

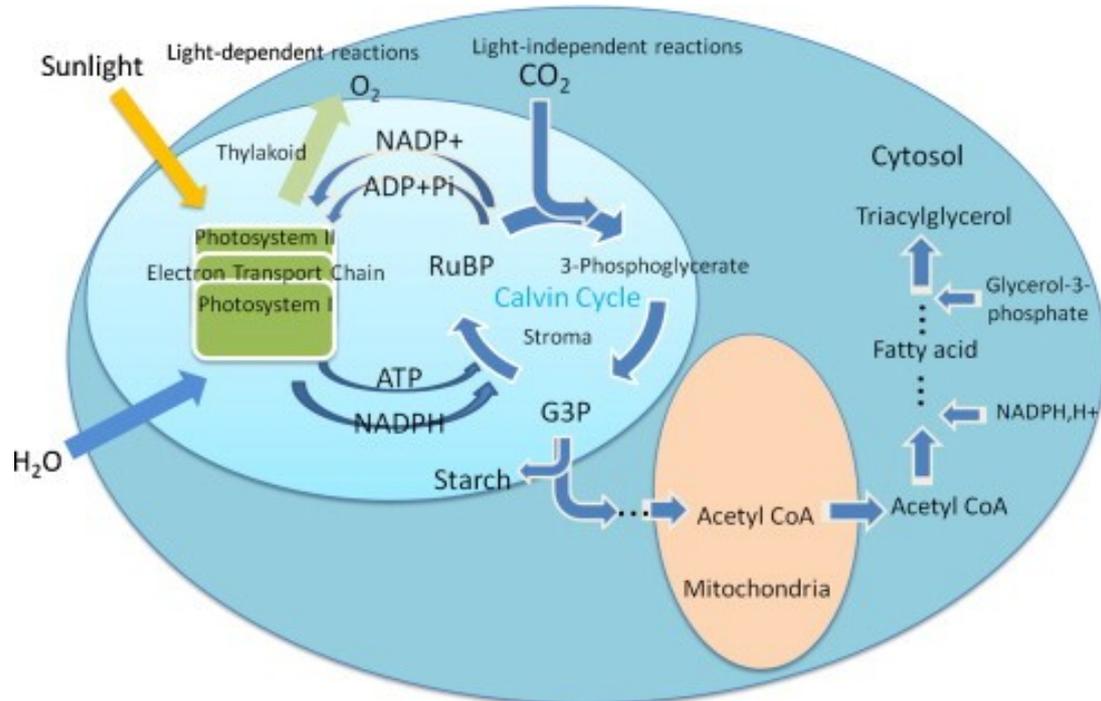


Figura 4 – Schema riassuntivo dalla fissazione autotrofa del carbonio alla produzione di lipidi per i bio-oli (Zeng *et al.* 2011)

Analisi chimiche hanno dimostrato che il 40% - 50% della biomassa algale è rappresentata da carbonio, il che vuol dire che per ottenere 1 kg di biomassa sarebbero necessari circa 1.5 – 2 kg di CO₂ (Salih 2011). Tale osservazione è stata poi grossomodo confermata anche da dati sperimentali ottenuti con le diatomee impiegate nel presente lavoro di tesi e descritti nel presente capitolo.

La tolleranza delle microalghe ad elevate concentrazioni di CO₂ è molto variabile. Alcune specie di microalghe come *Cyanidium caldarium* possono crescere in presenza di un'atmosfera di 100% di CO₂, mentre altre specie sono capaci di vivere a concentrazioni di CO₂ massimo del 15% (Tabella 1). Per alcune delle specie, come *Euglena gracilis*, *Scenedesmus* sp. e *Chlorella* sp. le migliori crescite si sono avute a concentrazioni di CO₂ comprese tra il 5% ed il 20%. Tali specie, rispettivamente, possono comunque tollerare percentuali di CO₂ fino al 45%, all'80% e al 100% (Salih 2011).

Tabella 1 – Percentuale di massima tolleranza della CO₂ per alcune specie microalgali (Salih 2011)

Species	Known Maximum CO ₂
<i>Cyanidium caldarium</i>	100%
<i>Scenedesmus</i> sp.	80%
<i>Chlorococcum littorale</i>	60%
<i>Synechococcus elongatus</i>	60%
<i>Euglena gracilis</i>	45%
<i>Chlorella</i> sp.	40%
<i>Eudorina</i> spp.	20%
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	15%
<i>Nannochloris</i> sp.	15%
<i>Chlamydomonas</i> sp.	15%
<i>Tetraselmis</i> sp.	14%

Per intrappolare e ottimizzare l'utilizzo della CO₂, le cellule microalgali hanno sviluppato dei meccanismi di concentrazione della CO₂ (CCM): generalmente l'attivazione e le modalità di funzionamento dei CCM dipendono dal ceppo, dal pH, dalla disponibilità di luce e da altri fattori chimico-fisici (Mohan *et al.* 2015).

Per quanto riguarda le diatomee, nonostante i numerosi sforzi fatti per definire i meccanismi regolativi coinvolti nell'assimilazione della CO₂ (Ishida *et al.* 2000; de Castro Araújo e Tavano García 2005; Hopkinson *et al.* 2011; Picardo *et al.* 2013; Wang *et al.* 2014; Bailleul *et al.* 2015), ci sono pochi studi sulla tolleranza di questi organismi ad elevate concentrazioni di CO₂. In *Thalassiosira pseudonana* sottoposta ad elevate concentrazioni di CO₂ è stata osservata una diminuzione della clorofilla e della produzione di ossigeno nonché un calo dei tassi di respirazione. Questo potrebbe lasciare ipotizzare che nelle diatomee il meccanismo di concentrazione del carbonio (CCM) in presenza di un'elevata concentrazione di CO₂ potrebbe spingere le cellule a down-regolare la produzione di energia per evitare danni ossidativi (Hennon *et al.* 2014).

Inoltre è stato proposto che quando questi organismi sono spostati da alte (1 - 5%) a basse concentrazioni di CO₂ (0.04%) una serie di anidrasi carboniche e trasportatori specifici del bicarbonato sono sintetizzati in un breve lasso di tempo (circa 6 ore) in modo da lavorare in maniera sinergica per trasportare il carbonio inorganico attraverso la membrana periplasmatica, attraverso il citoplasma, attraverso la membrana del cloroplasto, per fornirlo in forma di CO₂ alla RUBISCO (Gardner *et al.* 2012).

Ishida *et al.* (2000) ha riportato la caratterizzazione di una *T. weissflogii* H1 isolata come specie tollerante alle alte concentrazioni di CO₂. Nel suo studio riporta le curve di crescita di colture incubate con aria e 5%, 10% e 20% di CO₂: i tenori massimi di crescita si sono ottenuti con 10% e 20% di CO₂ rispetto a colture con aria o 5% di CO₂.

Recentemente è stato riportato anche uno studio sulla tolleranza alla CO₂ e l'influenza delle diverse concentrazioni sulla produttività lipidica nella diatomea marina *Chaetoceros muelleri*, aprendo degli importanti scenari per quanto riguarda le applicazioni biotecnologiche di questi organismi nella biomitigazione della CO₂ (Wang *et al.* 2014).

La buona tolleranza delle diatomee, quindi anche *T. weissflogii*, alle alte percentuali di CO₂ potrebbe essere dovuta a dei buoni meccanismi di concentrazione della CO₂ (CCM). Come detto nell'introduzione di questo capitolo, in ambienti marini la forma predominante del carbonio inorganico disciolto è lo ione bicarbonato. Si ritiene che nelle diatomee una prima forma dell'enzima anidrasi carbonica (CA) localizzata nel periplasma possa catalizzare la disidratazione dell'HCO₃⁻ in CO₂ per aumentare il gradiente della diffusione di quest'ultima dal mezzo esterno al citoplasma, mentre una forma di CA citoplasmatica catalizza la reidratazione della CO₂ a HCO₃⁻ per impedirne la perdita per diffusione nel mezzo esterno. Successivamente si verifica la carbossilazione citoplasmatica del fosfoenolpiruvato (PEP) via PEP carbossilasi (PEPC) e malato deidrogenasi a formare composti C₄ come malato e acido ossalacetico, che entrano nel cloroplasto, dove, con una decarbossilazione, si riformano PEP e CO₂, che può quindi essere fissata dalla RUBISCO nel primo passaggio del ciclo di Calvin (Figura 5) (Morel *et al.* 2002).

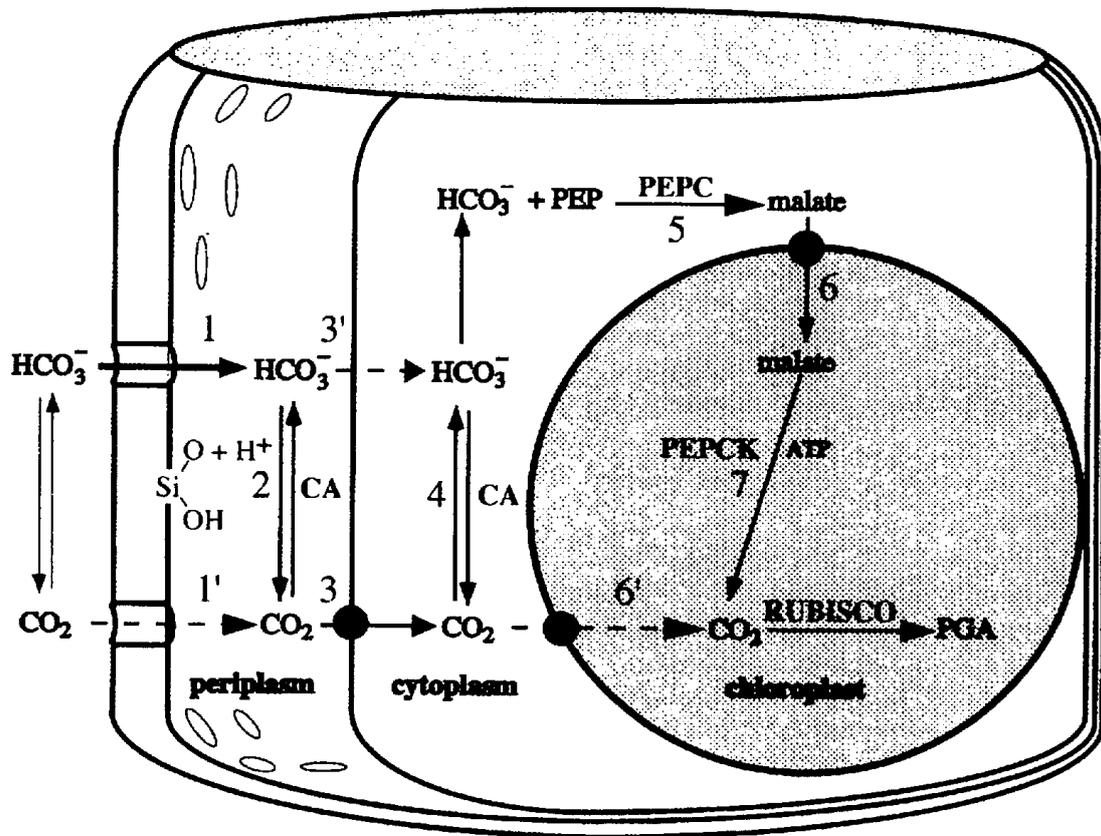


Figura 5 – Modello ipotetico che descrive la captazione del carbonio inorganico in *T. weissflogii*. Studi hanno dimostrato che le CA sono up-regolate in presenza di basse concentrazioni di CO₂ (Morel *et al.* 2002)

3.1.3 Effetti dei nutrienti sulla fisiologia delle diatomee

A seconda dei livelli di stress a cui le cellule vengono sottoposte, si determinano delle risposte specifiche, che determinano il bilancio finale tra la biomassa e l'accumulo lipidico (Figura 6) (Fields *et al.* 2014). Oltre alla temperatura e alla luce, un fattore importante per la crescita delle microalghe è la disponibilità dei nutrienti che tende ad influenzare sia il contenuto lipidico che la composizione lipidica. Nelle microalghe gli acidi grassi variano in lunghezza della catena, grado di insaturazione e posizione del glicerolo; di conseguenza, la frazione dei trigliceridi è costituita da una miscela complessa di diversi tipi di molecole con diverse proprietà fisico-chimiche.

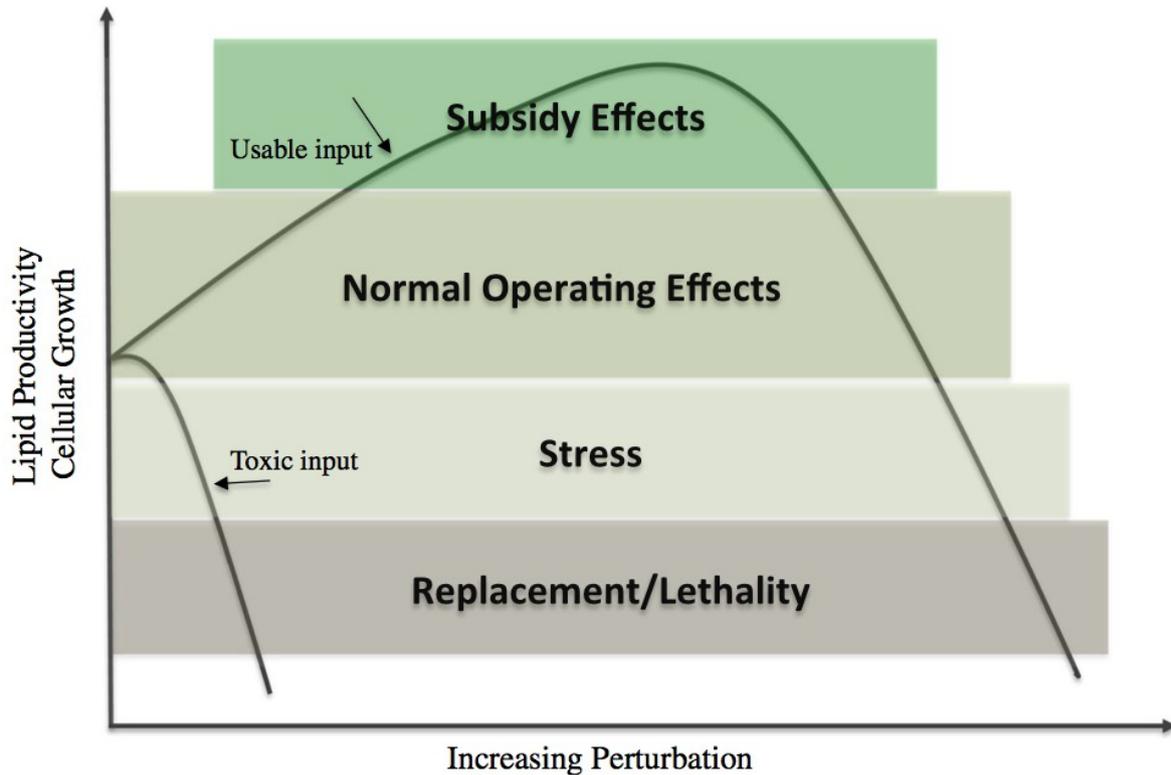


Figura 6 – Curva ipotetica che descrive le prestazioni di un sistema microalgale sottoposto a livelli crescenti di stress al fine di produrre biomassa e/o lipidi (Fields *et al.* 2014)

I maggiori stimoli chimici che inducono l'aumento dei livelli di triacilgliceroli sono la deprivazione di nutrienti, l'alta salinità e il pH del mezzo di crescita. Tra gli stimoli fisici si annoverano la temperatura e l'intensità della luce. Anche la fase di crescita e/o l'età della coltura possono influenzare il contenuto in TAG e la composizione degli acidi grassi (Hu *et al.* 2008).

Tra le condizioni di stress più comunemente studiate e applicate in campo biotecnologico per aumentare la produttività lipidica delle diatomee vi è la deprivazione di nitrati. L'azoto (N) è importante per la sintesi di proteine e acidi nucleici. In condizioni di limitazione o deprivazione di azoto, la cellula limita la produzione di biomassa reindirizzando il carbonio verso la biosintesi dei lipidi di riserva, in particolare i triacilgliceroli. Inoltre in condizione di stress da azoto, le cellule cannibalizzano il loro apparato fotosintetico e riciclano l'azoto intracellulare. L'applicazione dello stress da carenza di N ha lo svantaggio che, sebbene aumenti il contenuto in TAG, riduce i tassi di crescita delle cellule (Levitan *et al.* 2015).

Nelle diatomee anche un altro tipo di stress, quello da deprivazione di silicio (Si), è una strategia utile per ottenere un maggiore accumulo di lipidi nelle cellule. La carenza di silicio è significativa solo per le diatomee perché il silicio (nella forma di silicati) è un componente del frustulo e quindi è essenziale durante la divisione cellulare e per il conseguente aumento di biomassa (Moll *et al.* 2014). L'energia per il trasporto e l'impiego del silicio viene dalla respirazione aerobica senza nessun diretto coinvolgimento della fotosintesi. Per tale motivo nelle diatomee il metabolismo del silicio differisce da quello di altri importanti macronutrienti quali azoto e fosforo, che sono strettamente collegati al metabolismo fotosintetico.

Di fronte alla limitazione di silicio, la maggior parte delle diatomee sembra reindirizzare il metabolismo cellulare verso l'accumulo di lipidi di riserva, anche se tale risposta sembra dipendere dal grado del contenuto di Si nella parete cellulare. Comunque sono numerosi gli studi che hanno dimostrato un aumento dell'accumulo di lipidi quando le diatomee sono coltivate in carenza di silicio (Yu *et al.* 2009; Jeffryes *et al.* 2013).

Nutrienti quali il fosforo (P) invece devono essere forniti con un eccesso significativo perché i fosfati aggiunti al mezzo di crescita si complessano anche agli ioni metallici e di conseguenza non tutto il P aggiunto è biodisponibile (Chisti 2007). Studi riportano che in condizioni di stress da P, la produzione di trigliceridi aumenta di quasi due volte nella diatomea modello *Phaeodactylum tricornutum*. Tuttavia deve essere messo in evidenza che i dati riportati in letteratura sono spesso discordanti o, quantomeno, sembrano variare con il variare delle specie e delle condizioni di crescita. Anche la deprivazione di altri nutrienti, tra cui lo zolfo, il ferro o loro combinazioni, sono riportati essere fattori che promuovono la biosintesi di lipidi/TAG (Fu *et al.* 2015).

L'aumento dei livelli cellulari di triacilgliceroli è dovuto allo spostamento dalla sintesi dei lipidi di membrana alla produzione dei lipidi neutri di riserva. Sia la biosintesi *de novo* che la conversione di lipidi strutturali (fosfo- e glicolipidi) in trigliceridi possono contribuire all'aumento generale degli oli all'interno delle cellule. Purtroppo, anche in questo caso la letteratura è lacunosa se non

contrastante sul ruolo dei due processi o su come essi interagiscano per mantenere il bilancio di massa ed energia cellulare.

3.1.4 Obiettivi dell'attività sperimentale: studio degli effetti di CO₂ e nutrienti nelle colture delle specie modello

Una volta selezionate come specie modello le due diatomee marine *T. weissflogii* e *C. cryptica*, l'attività sperimentale ha riguardato:

- crescita in condizioni batch per definire un sistema di riferimento in condizioni note e controllate;
- l'effetto dell'insufflazione di gas come la CO₂ e di differenti regimi di macronutrienti. I risultati sono stati confrontati con quelli delle curve standard (paragrafi 3.2.2 e 3.2.3);
- lo sviluppo di un sistema a doppia fase che combinasse gli effetti dell'insufflazione di CO₂ e della somministrazione dei nutrienti, allo scopo di individuare una condizione di crescita ottimale per la produzione di biomassa (paragrafi 3.2.4 e 3.2.5);
- gli effetti della deprivazione selettiva dei macronutrienti, allo scopo di ottenere alte biomasse ricche in lipidi, in particolare di triacilgliceroli (paragrafo 3.2.6).

Tutte le condizioni di crescita oggetto di studio sono riassunte nelle tabelle 2 e 3.

Tabella 2 – Schema riassuntivo delle sei tipologie di crescita a cui sono state sottoposte le specie modello *T. weissflogii* e *C. cryptica* selezionate al termine del processo di screening (paragrafi 3.2.1 a 3.2.5). Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato per ciascuna specie

PROVA	DURATA (Giorni)	TIPO DI ESPERIMENTO	CONDIZIONI ESPERIMENTO	
			Aggiunta Nutrienti	Insufflazione
Basso Regime di Nutrienti (BRN)	7	Unica fase	Aggiunta nutrienti solo al giorno 0	Aria
Basso Regime di Nutrienti + CO ₂ [BRN (CO ₂)]	7 -- 10	Unica fase	Aggiunta nutrienti solo al giorno 0	Aria + 10% di CO ₂
Alto Regime di Nutrienti (ARN)	14	Unica fase	Aggiunta nutrienti tutti i giorni	Aria
Alto Regime di Nutrienti + Sospensione Aggiunta Nutrienti (ARN + SAN)	14	Doppia fase	<u>I Fase:</u> Aggiunta quotidiana nutrienti per i primi 7 giorni. <u>II Fase:</u> Sospensione Aggiunta Nutrienti per i secondi 7 giorni	I Fase: Aria - II Fase: Aria
Alto Regime di Nutrienti + Sospensione Aggiunta Nutrienti con CO ₂ [ARN + SAN (CO ₂)]	14	Doppia fase	<u>I Fase:</u> Aggiunta quotidiana nutrienti per i primi 7 giorni. <u>II Fase:</u> Sospensione Aggiunta Nutrienti per i secondi 7 giorni	I Fase: Aria - II Fase: Aria + 10% di CO ₂
Alto Regime di Nutrienti con CO ₂ + Sospensione Aggiunta Nutrienti con CO ₂ [ARN (CO ₂) + SAN (CO ₂)]	14	Doppia fase	<u>I Fase:</u> Aggiunta quotidiana nutrienti per i primi 7 giorni. <u>II Fase:</u> Sospensione Aggiunta Nutrienti per i secondi 7 giorni	I Fase: Aria + 10% di CO ₂ - II Fase: Aria + 10% di CO ₂

Tabella 3 – Schema riassuntivo delle tre tipologie di crescita con deprivazione selettiva a cui sono state sottoposte le specie modello *T. weissflogii* e *C. cryptica* selezionate al termine del processo di screening (paragrafo 3.2.6). Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato per ciascuna specie

PROVA	DURATA (Giorni)	TIPO DI ESPERIMENTO	PROCEDURA ESPERIMENTO	
			Aggiunta Nutrienti	Insufflazione
Deprivazione selettiva (- P)	14	Doppia Fase	<u>I Fase:</u> Aggiunta dosata dei nutrienti per i primi 7 giorni. <u>II Fase:</u> Sospensione Aggiunta NaH ₂ PO ₄ per i secondi 7 giorni	I Fase: Aria + 10% di CO ₂ - II Fase: Aria + 10% di CO ₂
Deprivazione selettiva (- N)	14	Doppia Fase	<u>I Fase:</u> Aggiunta dosata dei nutrienti per i primi 7 giorni. <u>II Fase:</u> Sospensione Aggiunta NaNO ₃ per i secondi 7 giorni	I Fase: Aria + 10% di CO ₂ 10% - II Fase: Aria + 10% di CO ₂
Deprivazione selettiva (- Si)	14	Doppia Fase	<u>I Fase:</u> Aggiunta dosata dei nutrienti per i primi 7 giorni. <u>II Fase:</u> Sospensione Aggiunta Na ₂ SiO ₃ per i secondi 7 giorni	I Fase: Aria + 10% di CO ₂ - II Fase: Aria + 10% di CO ₂ 10%

Tutte le attività hanno avuto come scopo finale la messa a punto di protocolli di crescita consolidati da utilizzare per la successiva fase di sperimentazione in campo. Inoltre i risultati ottenuti hanno evidenziato specifiche risposte cellulari legate alle situazioni di stress, dando così spunto per approfondimenti di carattere metabolico.

I parametri seguiti ed analizzati durante le curve di crescita di tutte le prove sono state:

- concentrazione cellulare;
- andamento del pH;
- biomassa umida e liofila;
- quantificazione di lipidi, proteine e carboidrati;
- analisi ¹H-NMR per la determinazione quantitativa e qualitativa della composizione lipidica;
- consumo nel mezzo di crescita dei principali macronutrienti (silicati, nitrati e fosfati).

3.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

PARTE I – EFFETTO CO₂ E NUTRIENTI

3.2.1 Crescite di controllo di *T. weissflogii* e *C. cryptica* in condizioni caratterizzate da Basso Regime di Nutrienti (BRN)

Al fine di mettere a punto delle crescite indoor in condizioni batch di riferimento da utilizzare come controllo e come base per il confronto con colture perturbate, le cellule di *T. weissflogii* o *C. cryptica* sono state cresciute in carboy da 2.3 L, con un volume operativo di 2 L, insufflazione di aria (CO₂ 0.04%), un'intensità luminosa di 250 μE m⁻² s⁻¹ e un fotoperiodo di 14:10 ore (luce:buio). Per quanto riguarda l'apporto di nutrienti, è stata utilizzata un'unica somministrazione iniziale nelle dosi previste per la preparazione del mezzo di coltura f/2 (Tabella 2).

Come si descritto in figura 7, entrambe le specie raggiungono la fase stazionaria in circa 7 giorni. Inoltre si può osservare che *C. cryptica* raggiunge densità cellulari maggiori rispetto a *T. weissflogii*.

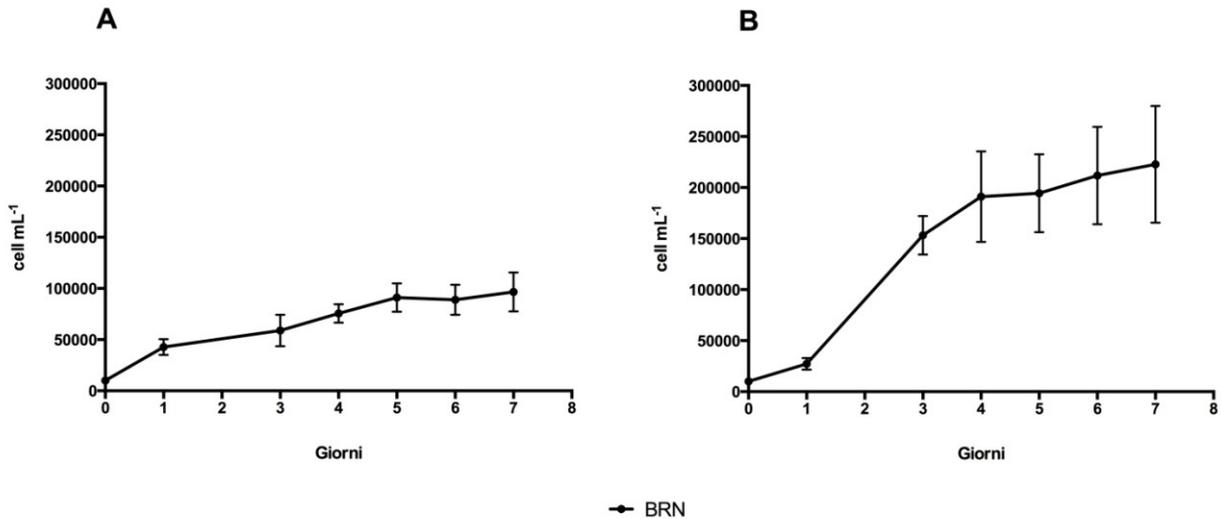


Figura 7 – Curve di crescita della prova BRN, espresse come densità cellulare media (cell mL⁻¹) per (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica*

I valori di biomassa finale liofila netta (biomassa secca meno il residuo di sali stimato in 38 g L⁻¹) sono stati di circa 180 mg L⁻¹ e 140 mg L⁻¹ per *T. weissflogii* e *C. cryptica*, rispettivamente, con una quantità assoluta di lipidi di 38.6 mg L⁻¹ nella *T. weissflogii* e 50.8 mg L⁻¹ per *C. cryptica* (Figura 8).

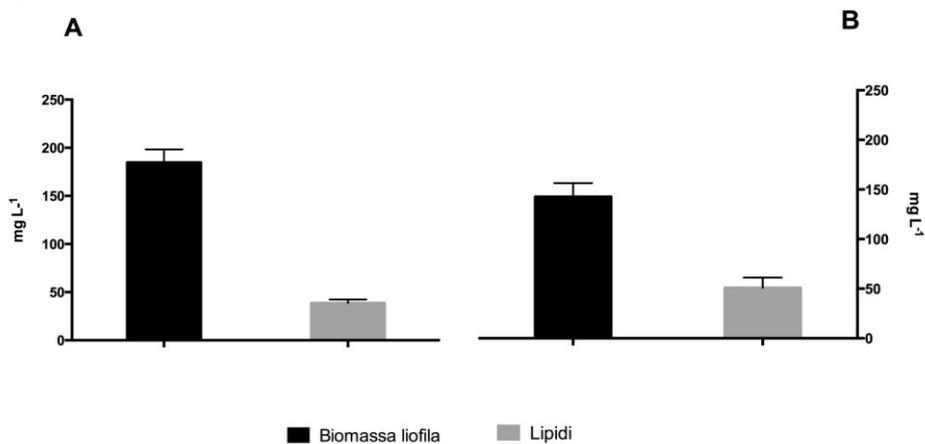


Figura 8 – Rese in biomassa liofila reale (mg L⁻¹) e lipidi (mg L⁻¹) per (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica* nel punto finale delle curve di crescita

In figura 9 sono mostrati i valori percentuali di lipidi, proteine e carboidrati delle biomasse analizzate al giorno finale della curva di crescita: si può osservare che in *T. weissflogii* le quantità di proteine e carboidrati sono leggermente superiori ai lipidi, che invece sono la componente predominante nella biomassa di *C. cryptica*.

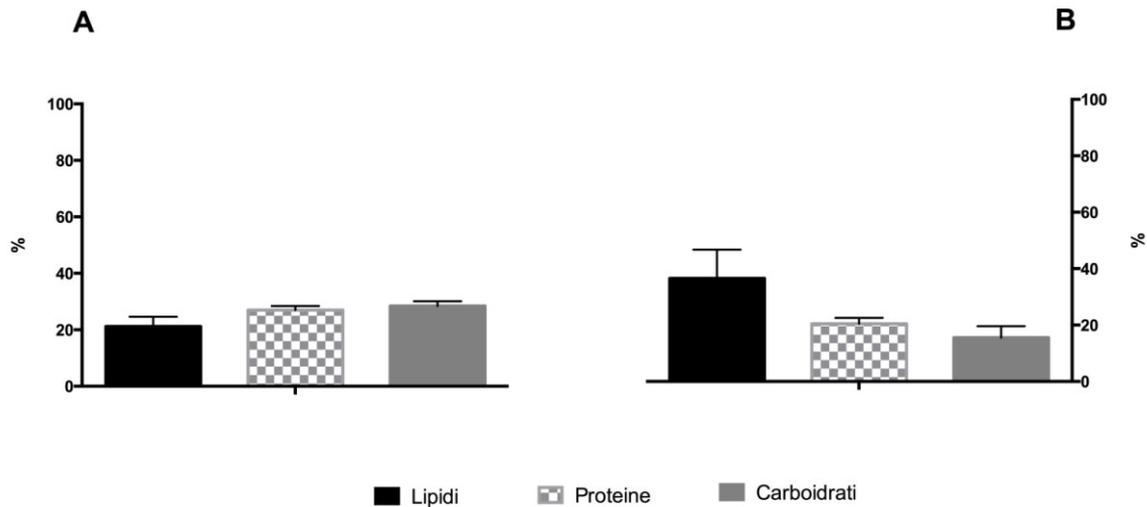


Figura 9 – Valori di lipidi, proteine e carboidrati (%) delle biomasse al giorno finale della curva di crescita in condizione BRN per (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica*

Gli spettri ¹H-NMR hanno mostrato un maggiore accumulo di triacilgliceroli (TAG, circa 59% e 76%, rispettivamente per *T. weissflogii* e *C. cryptica*) rispetto a glicolipidi e fosfolipidi (GL + PL, circa 18% e 11%, rispettivamente) (Figura 10).

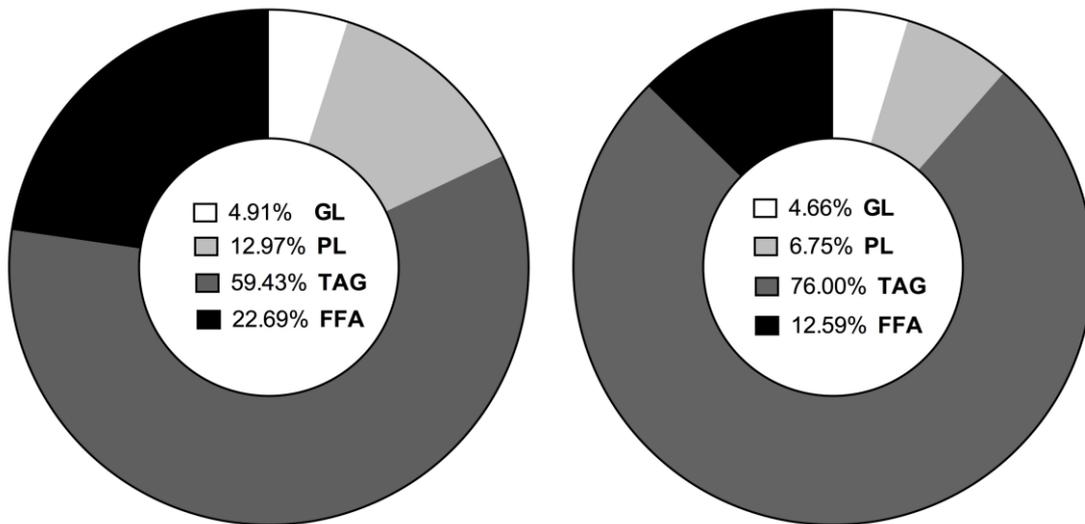


Figura 10 – Ripartizione (%) delle diverse classi lipidiche nella biomassa recuperata il giorno finale della crescita di riferimento (BRN) di *T. weissflogii* (a sinistra) e *C. cryptica* (a destra)

Per quanto riguarda il consumo lungo la curva dei macronutrienti principali, si sono ottenuti andamenti simili per *T. weissflogii* e *C. cryptica* in quanto i silicati sono stati completamente consumati già dopo 3/4 giorni e i fosfati dopo 5/6 giorni di crescita. Invece è rimasto un eccesso di nitrati in entrambe le colture, con un consumo complessivo di circa il 90% e il 50%, per *T. weissflogii* e *C. cryptica*, rispettivamente. Quindi questi risultati suggerivano che aggiungendo i nutrienti soltanto all'inizio della crescita, una sola dose di silicati (106 μM) e fosfati (36 μM) è stata sufficiente per supportare tutta la curva di crescita, mentre una classica dose di nitrati (882 μM) previsti nell' $f/2$ rappresentano un eccesso fisiologico, in quanto non riescono ad essere completamente metabolizzati.

3.2.2 Crescite di *T. weissflogii* e *C. cryptica* in condizioni caratterizzate da Basso Regime di Nutrienti (BRN) e 10% di CO₂

Una volta definita la curva di crescita e la composizione biochimica delle cellule cresciute in un Basso Regime di Nutrienti (BRN) con insufflazione di aria sono state effettuate prove nelle stesse condizioni (BRN) in presenza del 10% di CO₂.

La scelta è andata su questa percentuale di CO₂ dopo aver effettuato prove preliminari con *T. weissflogii* per valutarne la tolleranza della diatomea ad alte concentrazioni di tale gas. Nel confronto con diverse percentuali di CO₂ si è osservata tendenzialmente una diminuzione della densità cellulare e della biomassa all'aumentare della concentrazione del gas, forse a causa dell'eccessivo abbassamento del pH nella coltura. Per tale motivo si è scelto di utilizzare anidride carbonica al 10%, una concentrazione simile a quella presente nelle emissioni dei più comuni processi industriali (motori a combustione interna, cementifici) e quindi ottimale per le fasi applicative del programma sperimentale.

Alle colture di entrambe le specie è stato aggiunto il 10% di CO₂ per sette ore al giorno durante la fase di luce del fotoperiodo di 14:10 ore (luce:buio) (Tabella 2, BRN (CO₂)). L'insufflazione di CO₂ con BRN non ha avuto effetti particolari sulla durata complessiva delle crescite e sulle densità cellulari raggiunte da *T. weissflogii* e *C. cryptica* (Figura 11), ma l'aggiunta di dosi più massicce della fonte di carbonio ha determinato un guadagno significativo in biomassa liofila finale.

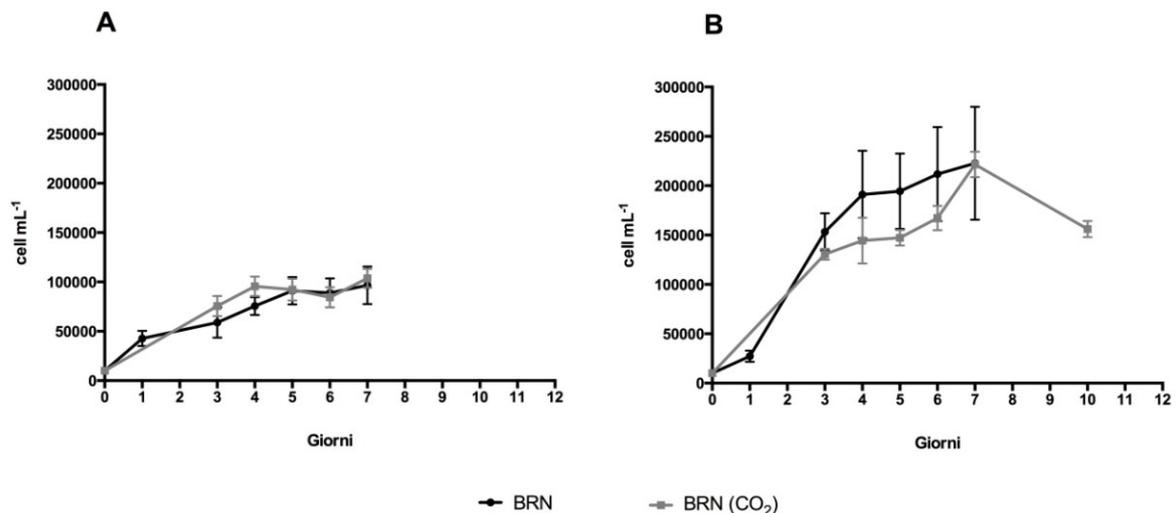


Figura 11 – Curve di crescita con le densità cellulari medie (cell mL⁻¹) giornaliere delle prove a Basso Regime di Nutrienti (BRN) senza e con il 10% di CO₂ per (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica*

I valori dei pesi liofilati sono stati circa 200 mg L⁻¹ per *T. weissflogii* e 250 mg L⁻¹ per *C. cryptica* nelle colture in presenza del 10% di CO₂. Per *C. cryptica*, rispetto alla crescita BRN, l'aggiunta di

anidride carbonica ha determinato quasi il raddoppio della biomassa liofila (mg L⁻¹) e, di conseguenza, anche un significativo aumento della quantità di lipidi prodotti in termini di mg L⁻¹ (Figura 12).

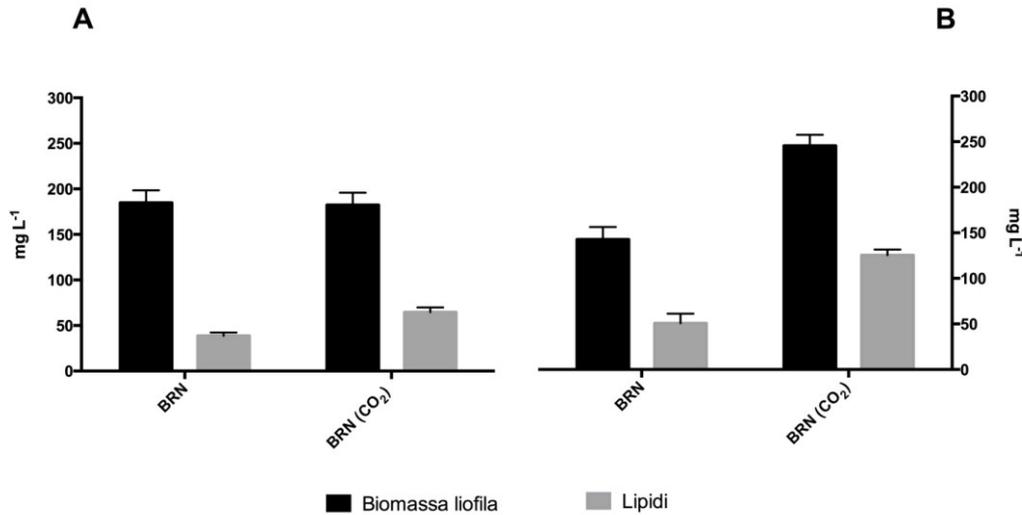


Figura 12 – Rese in biomassa liofila reale (mg L⁻¹) e in lipidi (mg L⁻¹) ottenute per (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica* al termine delle prove a Basso Regime di Nutrienti (BRN) senza e con 10% di CO₂

Per quanto riguarda la produttività di biomassa è pari a circa 26 mg L⁻¹ giorno⁻¹ in entrambe le condizioni di crescita per *T. weissflogii*, mentre quella dei lipidi è quasi raddoppiata in presenza del 10% di CO₂ passando da 5.5 mg L⁻¹ giorno⁻¹ della prova BRN a 9.2 mg L⁻¹ giorno⁻¹ della condizione BRN + CO₂.

In *C. cryptica* le produttività di biomassa sono rimaste invariate nelle due condizioni di crescita (circa 20 mg L⁻¹ giorno⁻¹), mentre si è avuto un aumento di quella dei lipidi che è passata da circa 7.6 mg L⁻¹ giorno⁻¹ a 10.5 mg L⁻¹ giorno⁻¹.

Dall'osservazione dei dati ottenuti dalle analisi biochimiche effettuate nel punto finale della curva di crescita di ognuna delle specie si nota che la componente lipidica è sempre predominante (circa 35% e 50% per *T. weissflogii* e *C. cryptica*, rispettivamente) rispetto a quella proteica (circa 21% e 16% per *T. weissflogii* e *C. cryptica*, rispettivamente) e carboidratica (circa 13% e 4% per *T. weissflogii* e *C. cryptica*, rispettivamente) (Figura 13). In particolare l'insufflazione di CO₂ ha

determinato in entrambe le specie l'aumento della percentuale lipidica a scapito della frazione dei carboidrati, rispetto alle colture ottenute con aria.

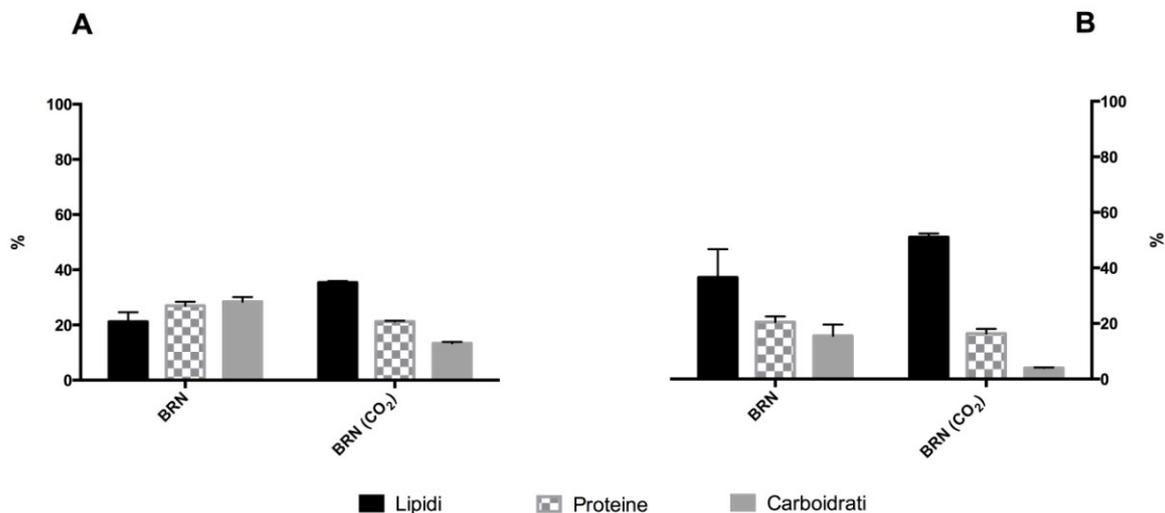


Figura 13 – Valori di lipidi, proteine e carboidrati (%) delle biomasse al giorno finale delle prove a Basso Regime di Nutrienti (BRN) senza e con 10% di CO₂ per (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica*

La ripartizione percentuale delle principali classi di lipidi polari e neutri è rimasta fondamentalmente invariata nelle colture con aria e con il 10% di CO₂ sia per *T. weissflogii* che *C. cryptica*, con la predominanza dei TAG su GL + PL.

Per quanto riguarda il consumo dei macronutrienti principali (Si, N e P), per entrambe le specie sia Si e P sono stati completamente consumati già dopo 3/4 giorni di crescita, analogamente alla prova BRN (Figura 14). I nitrati sono stati completamente metabolizzati in *C. cryptica*, mentre è rimasto un residuo (circa il 30%) nelle colture di *T. weissflogii*. Da questi dati si evince che l'insufflazione del 10% di CO₂ accelera il consumo generale dei macronutrienti rispetto alle crescite di controllo con aria, soprattutto per quanto riguarda i nitrati (Figura 14). Questo potrebbe spiegare l'effetto metabolico sulla mobilizzazione dei pool verso la sintesi di TAG.

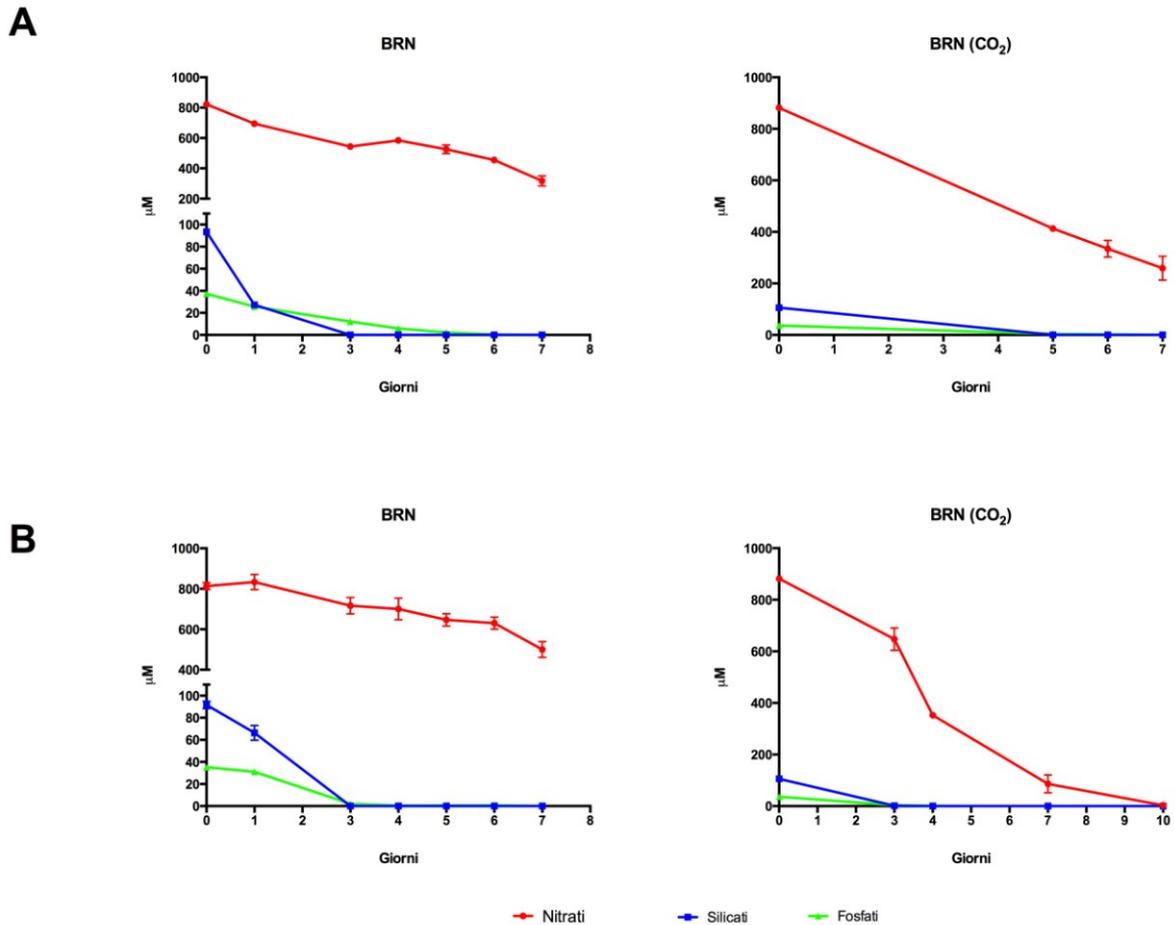


Figura 14 – Andamento delle concentrazioni (µM) di nitrati, silicati e fosfati nelle prove a Basso Regime di Nutrienti (BRN) senza e con il 10% di CO₂ per (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica*

Ricapitolando, in presenza del 10% di CO₂, *T. weissflogii* e *C. cryptica* hanno mostrato valori elevati in quantità assoluta di biomassa e lipidi, alte produttività e bassi tempi di duplicazione. A parità di somministrazione di nutrienti (solo il primo giorno), l'effetto del gas si è manifestato soprattutto con un guadagno nella biomassa ottenuta e nelle produzioni assolute in lipidi.

Da dati di letteratura anche altre diatomee sono risultate tolleranti alle alte concentrazioni di CO₂. La diatomea marina *C. muelleri* è stata cresciuta sotto insufflazione di aria (0.04% di CO₂) e con il 10%, 20% e 30% di CO₂ per valutarne tolleranza e potenziale produzione di biodiesel (Tabella 4). I risultati indicano che *C. muelleri* cresce bene con alte concentrazioni di CO₂ (10 - 20%) (Wang *et al.* 2014).

Tabella 4 – Contenuto in lipidi, carboidrati e proteine di *C. muelleri* cresciuta in presenza di diverse concentrazioni di CO₂ (Wang *et al.* 2014)

CO ₂ concentration	Content in <i>C. muelleri</i> (% DW [*])			
	Lipid	Carbohydrate	Protein	Total
0.03%	27.74 ± 1.20	37.48 ± 2.20	12.16 ± 1.09	77.38 ± 1.50
10%	43.40 ± 2.55	34.16 ± 2.05	16.25 ± 1.94	93.81 ± 2.18
20%	35.59 ± 1.89 ^a	27.78 ± 2.89	19.98 ± 1.16	83.35 ± 1.98
30%	38.51 ± 2.32 ^a	19.58 ± 3.32	22.47 ± 1.19	80.56 ± 2.28

* %DW: the percentage of cell dry weight.

Anche per le microalghe è riportato che concentrazioni del 5% e 10% di CO₂ migliorano la produzione di lipidi e biomassa, per esempio in *Dunaliella* sp.. In questo caso il contenuto lipidico percentuale per cellula diminuisce, ma la quantità totale di lipidi aumenta vista la maggiore biomassa complessiva (Jeon *et al.* 2013).

3.2.3 Crescite di *T. weissflogii* e *C. cryptica* in condizioni caratterizzate da Alto Regime di Nutrienti (ARN)

E' stato studiato il comportamento fisiologico e biochimico delle cellule sia di *T. weissflogii* che *C. cryptica* in condizione di Alto Regime di Nutrienti (ARN), ottenuto mediante somministrazione quotidiana della dose di macro e micronutrienti previsti per la preparazione del mezzo di coltura f/2 (Tabella 2, ARN).

La disponibilità di una elevata quantità di nutrienti nelle colture ha permesso alle cellule di raggiungere densità molto elevate rispetto al controllo BRN. Infatti dopo 14 giorni le concentrazioni cellulari erano aumentato di 10 volte rispetto al controllo, arrivando a 1 x 10⁶ cell mL⁻¹ in *T. weissflogii* e a 3 x 10⁶ cell mL⁻¹ in *C. cryptica* (Figura 15).

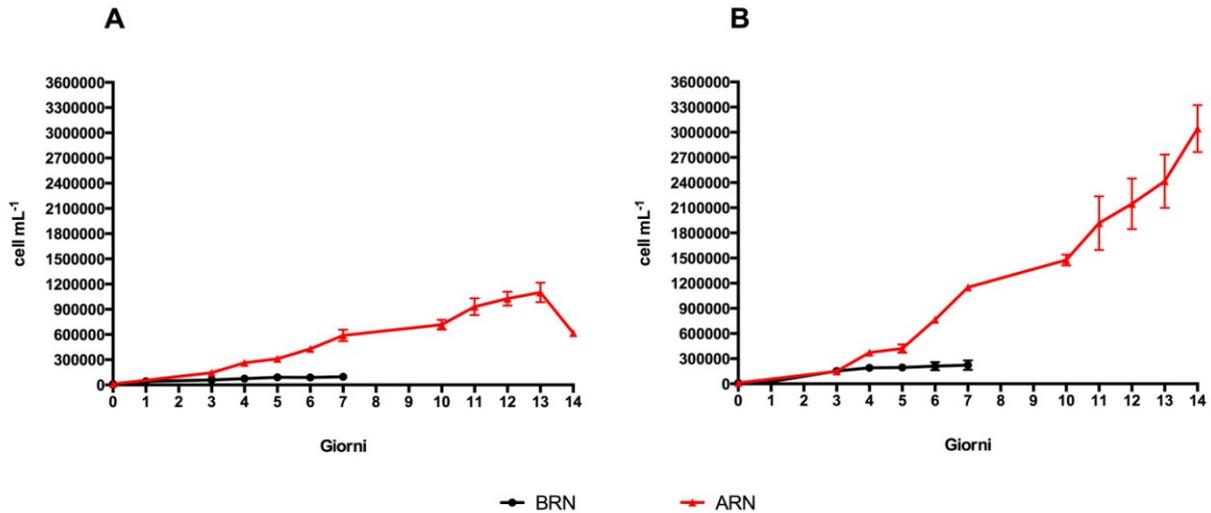


Figura 15 – Curve di crescita con le densità cellulari medie (cell mL⁻¹) giornaliere degli esperimenti a Basso (BRN) e Alto Regime di Nutrienti (ARN) di (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica*

Seguendo l'andamento della biomassa liofila (mg L⁻¹), si osserva che al giorno finale della curva di crescita si sono ottenuti valori di circa 800 - 900 mg L⁻¹, per entrambe le specie, con un quantitativo di circa 200 mg L⁻¹ di lipidi (Figura 16). L'Alto Regime di Nutrienti a cui le due specie sono state sottoposte ha quindi determinato un incremento di circa 5 volte della biomassa liofila e di circa 4 volte per i lipidi totali rispetto alla condizione in Basso Regime di Nutrienti.

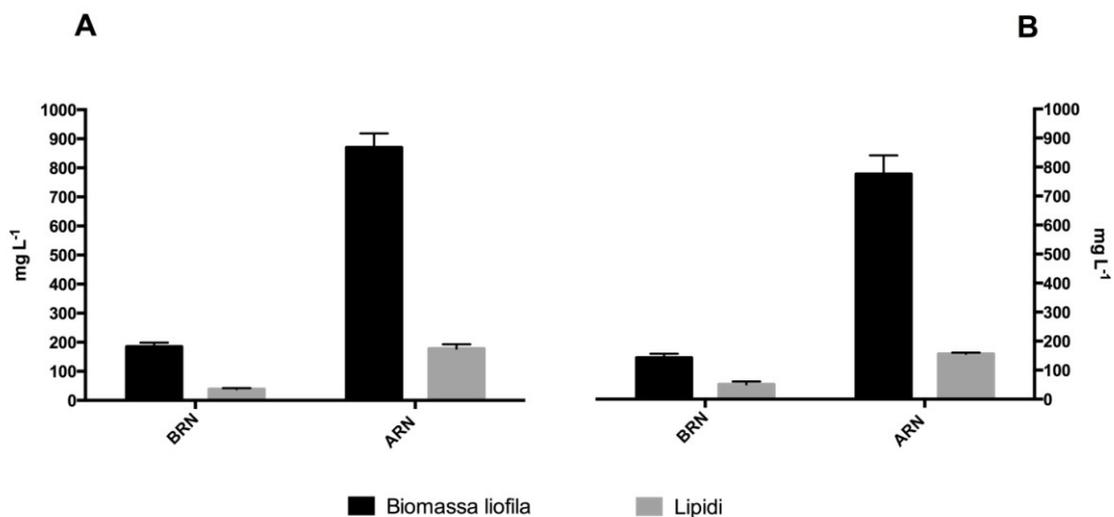


Figura 16 – Valori di biomassa liofila e lipidi, espressi in mg L⁻¹, per (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica* cresciute nelle condizioni a Basso (BRN) e Alto Regime di Nutrienti (ARN)

Le analisi biochimiche sulle produzioni di lipidi, proteine e carboidrati nel giorno finale di raccolta hanno rivelato nella condizione ARN in entrambe le specie un notevole incremento della componente proteica a scapito della componente lipidica e zuccherina (Figura 17), probabilmente a causa delle alte concentrazioni di nitrati disponibili per la sintesi proteica.

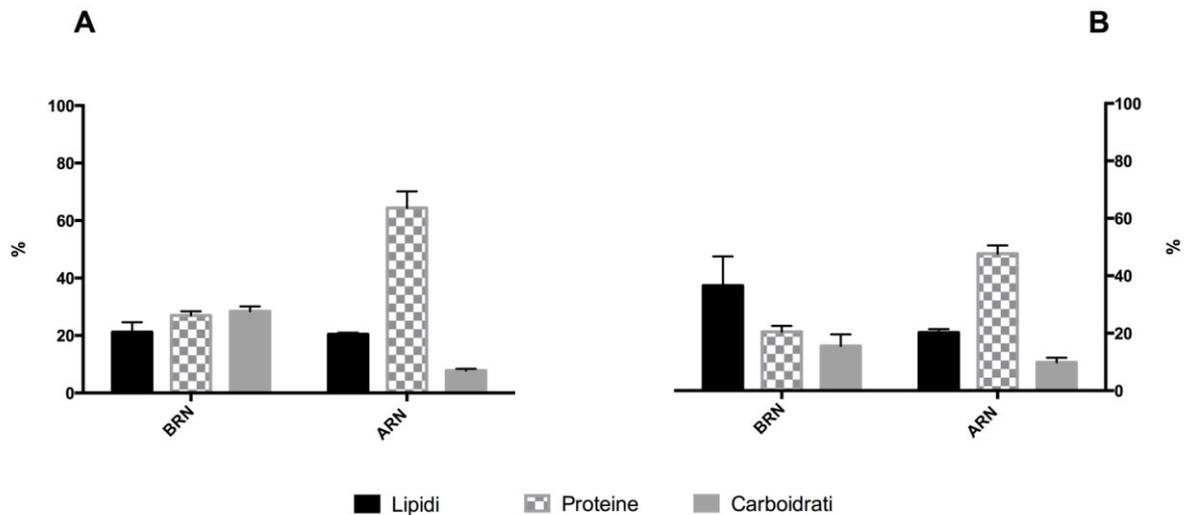


Figura 17 – Ripartizione tra lipidi, proteine e carboidrati (%) nelle biomasse di (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica* recuperate il giorno finale degli esperimenti a Basso (BRN) e Alto Regime di Nutrienti (ARN)

Dall'analisi dei dati NMR sugli estratti lipidici delle cellule cresciute con aggiunta quotidiana dei nutrienti per tutta la durata della curva di crescita si evince che vi è una netta prevalenza dei lipidi polari rispetto ai neutri (GL, PL e TAG: 41.2%, 19.6% e 0.5% per *T. weissflogii* e 38.7%, 28.8% e 2.4% per *C. cryptica*, rispettivamente) (Figura 18). Alimentando le cellule in maniera continua si favorisce la duplicazione e la crescita cellulare. Per questa ragione, si ottengono biomasse molto elevate e alte quantità di GL + PL, ma anche una significativa diminuzione, fino alla quasi completa scomparsa, dei lipidi neutri.

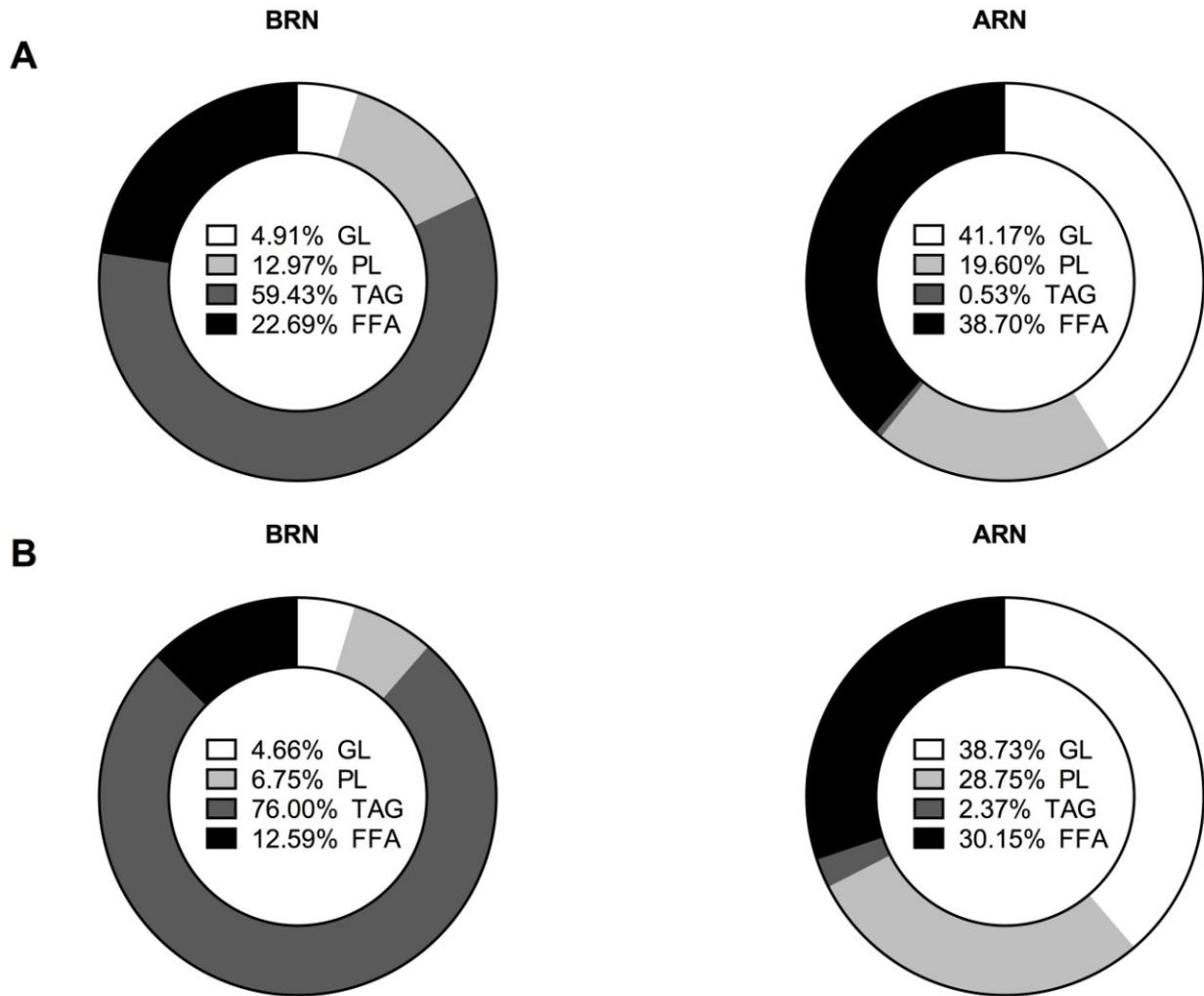


Figura 18 – Ripartizione (%) delle diverse classi lipidiche nella biomassa recuperata il giorno finale delle crescite a Basso (BRN) e Alto Regime di Nutrienti (ARN) di (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica*

L'analisi dei macronutrienti (Si, N e P) effettuata quotidianamente sul mezzo di coltura ha permesso di stimare il tasso di consumo dei silicati, nitrati e fosfati.

Per entrambe le specie di diatomee, il consumo dei silicati è stato totale: considerando gli alti tassi di crescita nelle colture ARN, le aggiunte quotidiane dei silicati in concentrazione pari a 106 μ M venivano completamente metabolizzate nell'arco di 24 ore. Anche per i fosfati, si è osservato un consumo complessivo compreso tra l'80 ed il 90% per entrambe le specie, mentre le aggiunte quotidiane di nitrati (882 μ M) sono risultate largamente in eccesso rispetto al fabbisogno fisiologico delle cellule, in quanto buona parte di questi sali sono rimasti non metabolizzati nel mezzo di crescita.

3.2.4 Crescite di *T. weissflogii* e *C. cryptica* in doppia fase con diverse combinazioni di Alto Regime di Nutrienti (ARN), insufflazione di CO₂ al 10% e Sospensione Aggiunta Nutrienti (SAN)

Dopo aver analizzato le colture a Basso ed Alto Regime di Nutrienti (BRN e ARN), si è pensato di valutare gli effetti combinati di nutrienti e CO₂ al 10% sulle colture di *T. weissflogii* e *C. cryptica*. Per tale motivo la sperimentazione in laboratorio è stata pianificata per seguire il comportamento fisiologico e biochimico delle due specie in condizioni di crescita definite a due fasi. L'idea è stata quella di sviluppare un processo operativamente sostenibile per ottenere contemporaneamente alte produttività in biomassa e lipidi ed alte percentuali di trigliceridi. Nella prima fase le cellule sono state esposte ad ARN per aumentare la densità cellulare e la biomassa, mentre nella seconda fase si lascia che le cellule consumino i nutrienti presenti nel mezzo secondo le loro esigenze fisiologiche, ottenendo una graduale limitazione di nutrienti senza dover cambiare il terreno di coltura. E' stata studiata anche la combinazione con insufflazione di CO₂ al 10% in prima e/o seconda fase. Le condizioni utilizzate sono riassunte nella tabella 5; in breve, le condizioni sperimentali consistevano in:

- somministrazione quotidiana della classica dose di macro e micronutrienti previsti dal mezzo di coltura f/2 per i primi sette giorni della curva di crescita e successiva sospensione dell'aggiunta di nutrienti (Tabella 5, ARN + SAN);
- somministrazione quotidiana della classica dose di macro e micronutrienti previsti dal mezzo di coltura f/2 per i primi sette giorni della curva di crescita e successiva deprivazione completa di nutrienti, ma con insufflazione del 10% di CO₂ per sette ore al giorno durante la fase di luce del fotoperiodo (Tabella 5, ARN + SAN (CO₂));
- somministrazione quotidiana della classica dose di macro e micronutrienti previsti dal mezzo di coltura f/2 per i primi sette giorni della curva di crescita e successiva deprivazione completa di nutrienti, con insufflazione di CO₂ al 10% per sette ore al giorno durante la fase di luce del fotoperiodo per tutta la durata della curva di crescita (Tabella 5, ARN (CO₂) + SAN (CO₂)).

Tabella 5 – Schema riassuntivo delle tre tipologie di crescita a cui sono state sottoposte le specie modello *T. weissflogii* e *C. cryptica*

PROVA	DURATA (Giorni)	TIPO DI ESPERIMENTO	CONDIZIONI ESPERIMENTO	
			Aggiunta Nutrienti	Insufflazione
Alto Regime di Nutrienti + Sospensione Aggiunta Nutrienti (ARN + SAN)	14	Doppia fase	<u>I Fase:</u> Aggiunta quotidiana nutrienti per i primi 7 giorni. <u>II Fase:</u> Sospensione Aggiunta Nutrienti per i secondi 7 giorni	I Fase: Aria - II Fase: Aria
Alto Regime di Nutrienti + Sospensione Aggiunta Nutrienti con CO ₂ [ARN + SAN (CO ₂)]	14	Doppia fase	<u>I Fase:</u> Aggiunta quotidiana nutrienti per i primi 7 giorni. <u>II Fase:</u> Sospensione Aggiunta Nutrienti per i secondi 7 giorni	I Fase: Aria - II Fase: Aria + 10 % di CO ₂
Alto Regime di Nutrienti con CO ₂ + Sospensione Aggiunta Nutrienti con CO ₂ [ARN (CO ₂) + SAN (CO ₂)]	14	Doppia fase	<u>I Fase:</u> Aggiunta quotidiana nutrienti per i primi 7 giorni. <u>II Fase:</u> Sospensione Aggiunta Nutrienti per i secondi 7 giorni	I Fase: Aria + 10% di CO ₂ - II Fase: Aria + 10% di CO ₂

Tutti gli esperimenti, in ciascuna delle condizioni provate, hanno avuto una durata di 14 giorni per entrambe le specie (Figura 19). Si può notare che nei primi 7 giorni si ha un generale aumento della densità cellulare, dovuto al costante apporto di nutrienti, specialmente nelle prove ARN (CO₂) + SAN (CO₂) in cui vi è anche la presenza della CO₂ al 10%. Nei successivi sette giorni di seconda fase le colture hanno avuto leggeri incrementi della densità cellulare fino a raggiungere la fase stazionaria.

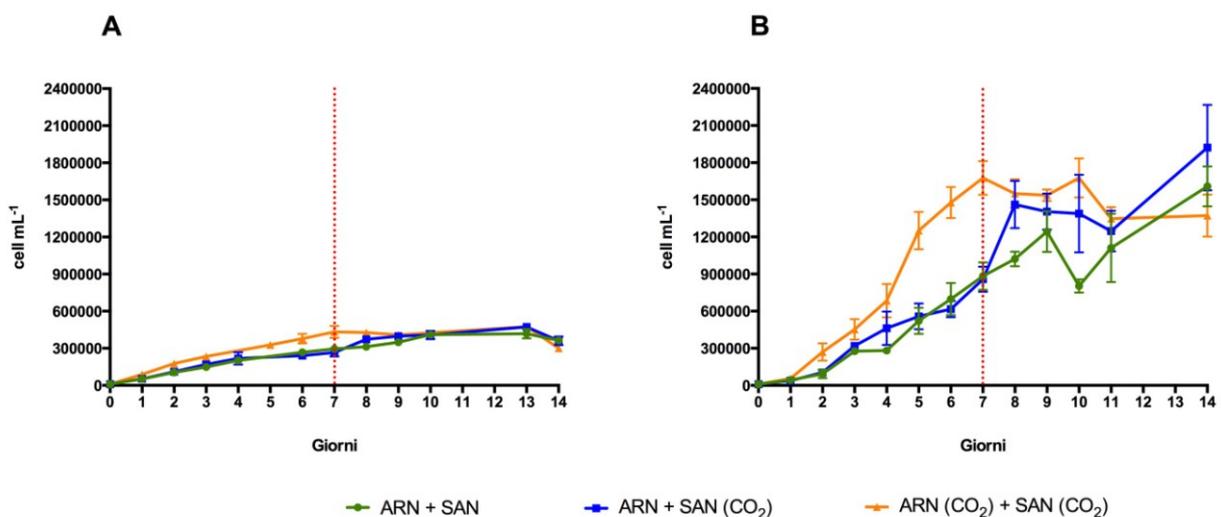


Figura 19 – Curve di crescita con le densità cellulari medie (cell mL⁻¹) giornaliere delle prove ARN + SAN, ARN + SAN (CO₂) e ARN (CO₂) + SAN (CO₂) messe a punto sia per (A) *T. weissflogii* che (B) *C. cryptica*. La linea rossa tratteggiata indica il passaggio dalla prima alla seconda fase con la sospensione dell’aggiunta dei nutrienti

Osservando l'andamento dei pesi liofilati, si osserva che al giorno finale della curva di crescita si sono ottenuti valori di circa 800 - 900 mg L⁻¹, per entrambe le specie, nelle colture effettuate nella condizione ARN + SAN. I dati interessanti sono stati quelli ottenuti negli altri esperimenti con CO₂ in cui le biomasse liofile hanno superato i valori di 1 g L⁻¹. Infatti *T. weissflogii* ha raggiunto circa 1.24 g L⁻¹ e 1.34 g L⁻¹, rispettivamente nelle prove ARN + SAN (CO₂) e ARN (CO₂) + SAN (CO₂), mentre *C. cryptica* ha dato rese di circa 1.25 g L⁻¹ e 1.21 g L⁻¹, rispettivamente (Figura 20).

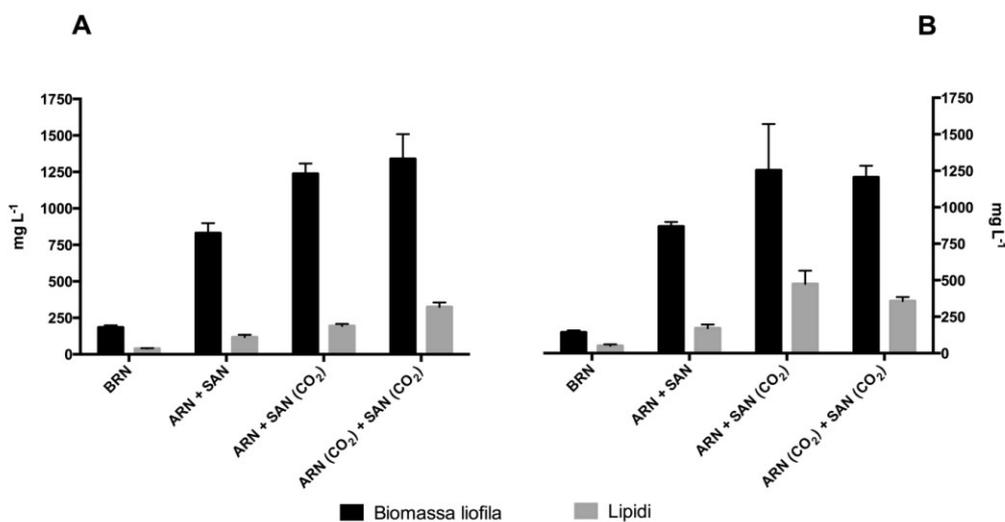


Figura 20 – Valori di biomassa liofila e lipidi, espressi in mg L⁻¹, per le prove di crescita BNR, ARN + SAN, ARN + SAN (CO₂) e ARN (CO₂) + SAN (CO₂) messe a punto sia per (A) *T. weissflogii* che (B) *C. cryptica*

L'azione combinata di CO₂ e nutrienti, portando ad un aumento delle biomasse e influenzando la loro composizione biochimica, ha determinato anche elevate quantità di lipidi (mg L⁻¹) (Figura 20): per *T. weissflogii* il valore massimo di 347.7 mg L⁻¹ si è avuto nell'esperimento ARN (CO₂) + SAN (CO₂), mentre per *C. cryptica* è la condizione ARN + SAN (CO₂) che ha dato il valore più alto pari a 474 mg L⁻¹.

Le analisi biochimiche sulle produzioni di lipidi, proteine e carboidrati sono state effettuate sia a metà che nel punto finale di ciascuna crescita per entrambe le specie. Per quanto riguarda *T. weissflogii* la componente proteica è quella predominante sia nella condizione ARN + SAN che

ARN + SAN (CO₂). Si nota che la somministrazione della CO₂ sia in prima che in seconda fase determina un evidente aumento della componente lipidica a scapito di quella proteica (Figura 21).

Per quanto riguarda *C. cryptica* si nota che quando la CO₂ è somministrata anche solo in seconda fase (ARN + SAN (CO₂)) si osserva un aumento della frazione lipidica a scapito dei carboidrati (Figura 21). Ciò è in accordo a quanto si è già verificato nella condizione BRN e BRN con CO₂ (Figure 13 e 21).

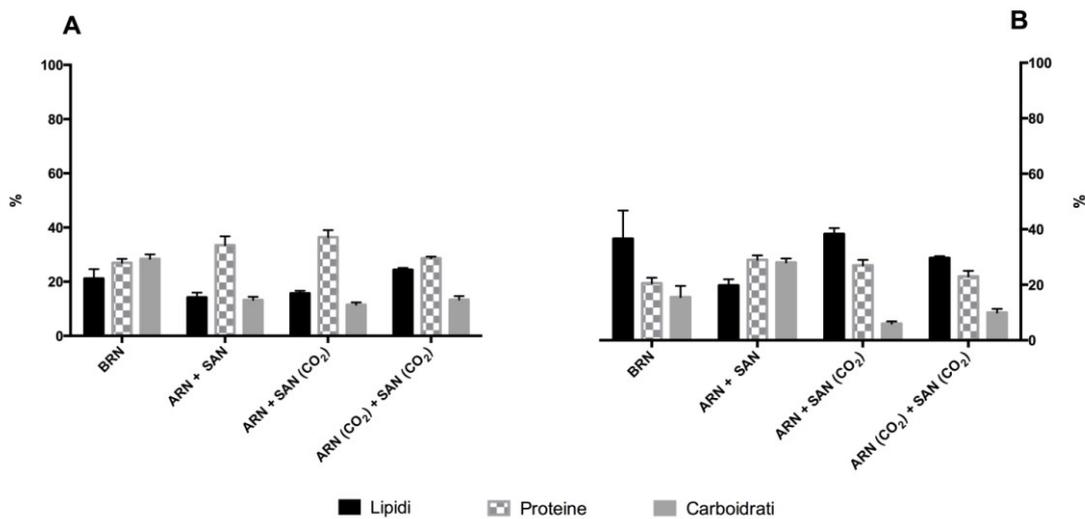


Figura 21 – Ripartizione tra lipidi, proteine e carboidrati (%) nelle biomasse di (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica* recuperate il giorno finale degli esperimenti BNR, ARN + SAN, ARN + SAN (CO₂) e ARN (CO₂) + SAN (CO₂)

Le analisi effettuate sulle biomasse cresciute nella condizione ARN + SAN hanno evidenziato per entrambe le specie una prevalenza di GL e PL contro il circa 16% e 33% dei TAG in *T. weissflogii* e *C. cryptica*, rispettivamente (Figura 22).

Nella condizione ARN + SAN (CO₂) diminuisce il livello di glicolipidi e fosfolipidi, mentre i TAG risultano più elevati, arrivando a rappresentare circa il 42% e il 63% della componente lipidica totale di *T. weissflogii* e *C. cryptica*, rispettivamente. Confrontando queste condizioni di crescita con quella ARN si può notare che sia lo stress da carenza di nutrienti che l'effetto della CO₂ al 10% si manifestano, in modo più marcato nelle colture di *C. cryptica*, nello spostamento del carbonio dai lipidi polari verso i TAG (Figura 22).

Nella condizione ARN (CO₂) + SAN (CO₂) per entrambe le specie si osserva un marcato aumento della frazione dei trigliceridi, arrivando a circa il 66% in *T. weissflogii* e al 79% in *C. cryptica*, con la concomitante riduzione della quantità di GL ed una quasi totale assenza della frazione dei PL: L'insufflazione al 10% di CO₂ per tutta la durata della curva di crescita ha quindi determinato un'ulteriore indirizzamento del carbonio da GL e PL verso i TAG, in maniera analoga a quanto osservato nel passaggio tra la prova ARN + SAN e ARN + SAN (CO₂) (Figura 22).

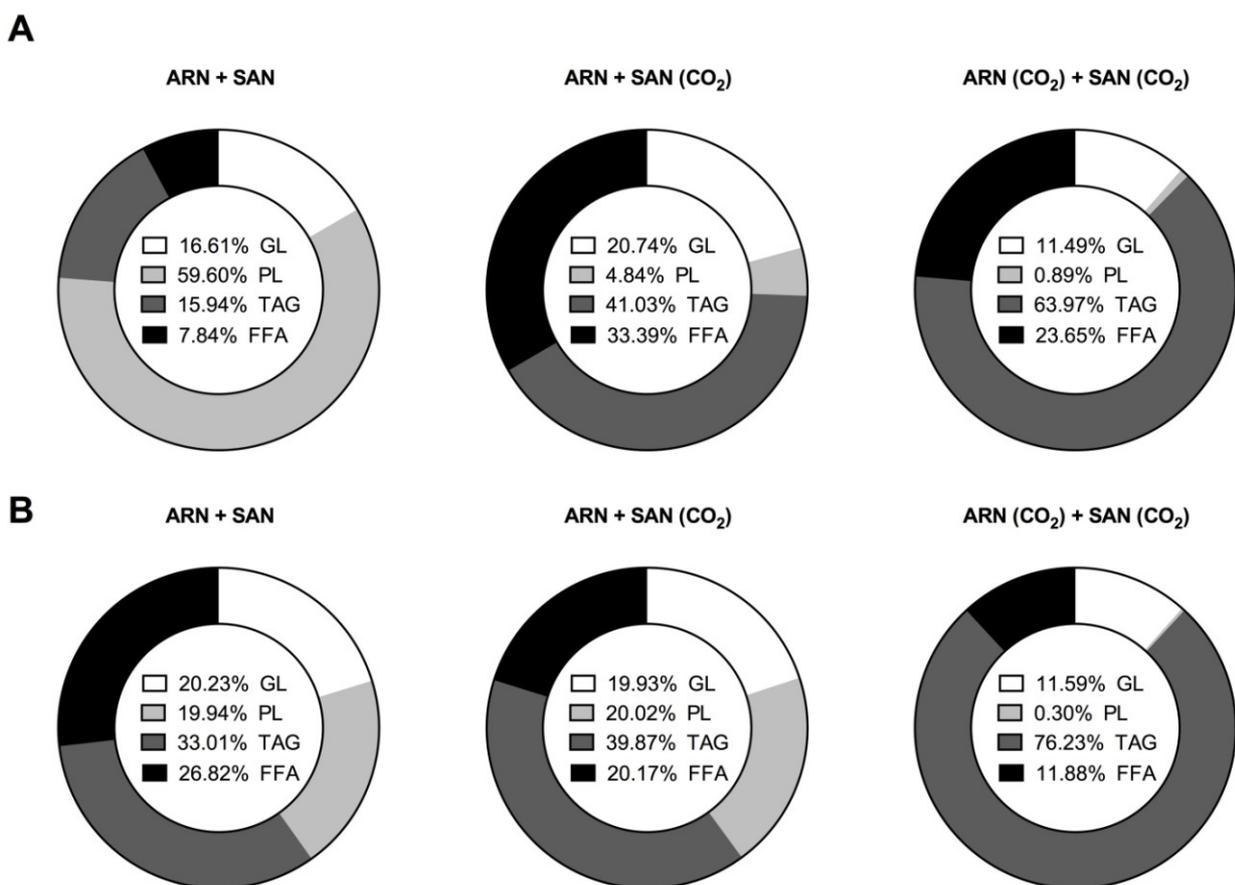


Figura 22 – Ripartizione (%) delle diverse classi lipidiche nella biomassa recuperata il giorno finale degli esperimenti ARN + SAN, ARN + SAN (CO₂) e ARN (CO₂) + SAN (CO₂) di (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica*

L'analisi dei macronutrienti (Si, N e P) effettuata quotidianamente sul mezzo di coltura ha permesso di stimare per entrambe le specie considerate e per tutti gli esperimenti il tasso di consumo dei silicati, nitrati e fosfati.

Come già descritto in precedenza nel paragrafo 3.2.2, quando viene insufflata la CO₂ si ha un generale aumento del tasso di consumo dei nutrienti. Per entrambe le specie, il consumo finale dei silicati e dei fosfati è stato completo; invece per i nitrati il consumo è stato maggiore in presenza della CO₂ al 10% sia in prima che in seconda fase (Figura 23).

Quindi la presenza continua di CO₂ al 10% per tutta la durata della crescita spinge la cellula ad esaurire più rapidamente i componenti del mezzo di crescita, aumentando così il tempo in cui permane in condizioni di stress. Questo dato è particolarmente importante per silicati e fosfati che risultano completamente consumati già intorno al giorno 9. Inoltre, poiché le condizioni in cui si ha un minore metabolismo dei nitrati coincidono con le minori produzione di TAG, probabilmente anche la somministrazione dosata e limitata di questo macronutriente sembra avere effetti positivi sul metabolismo dei lipidi di riserva (Figure 22 e 23).

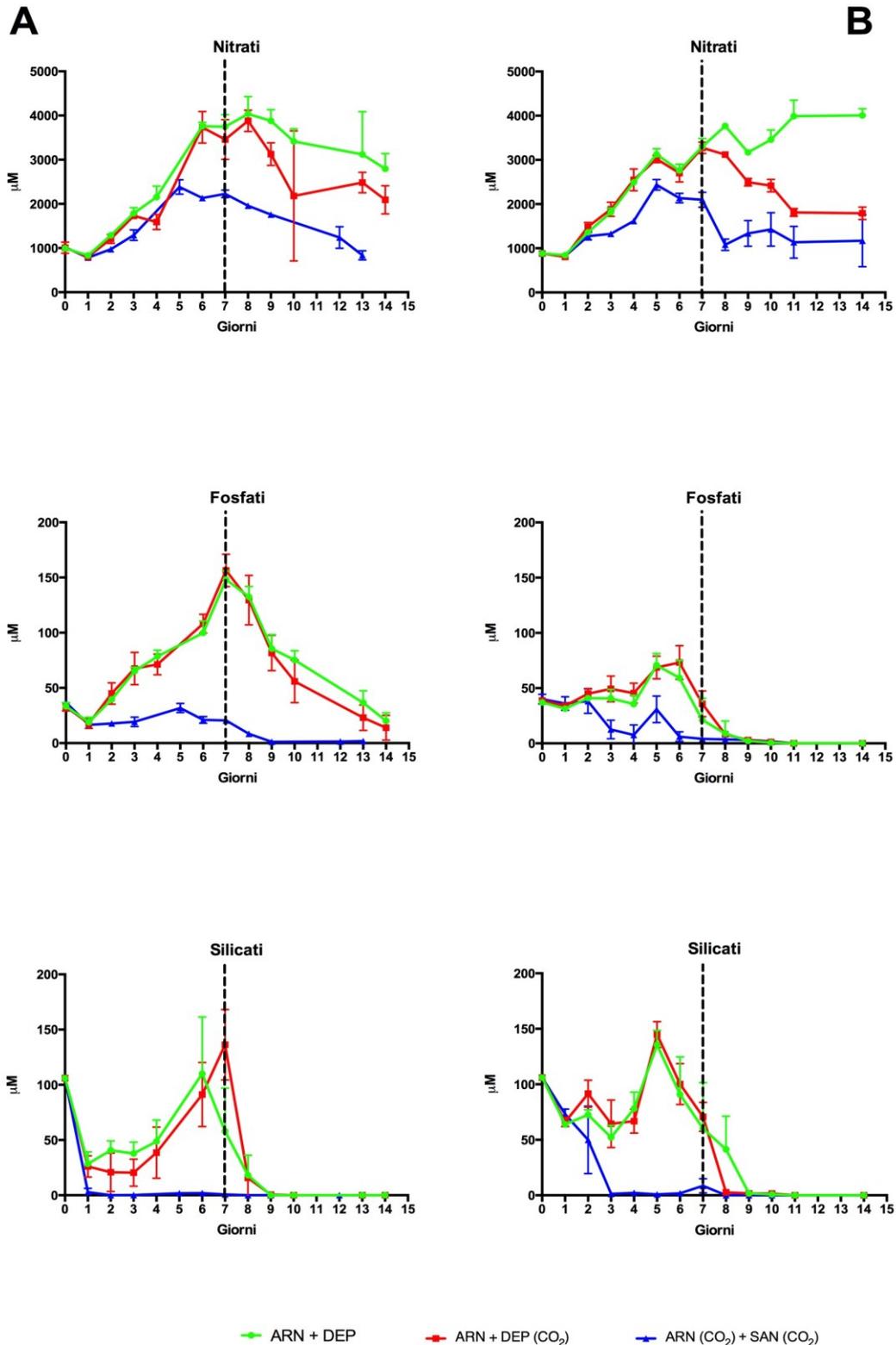


Figura 23 – Confronto del consumo di nitrati, fosfati e silicati negli esperimenti ARN + SAN, ARN + SAN (CO₂) e ARN (CO₂) + SAN (CO₂) sia per (A) *T. weissflogii* che (B) *C. cryptica*. La linea nera tratteggiata indica il passaggio dalla prima alla seconda fase con la sospensione dell'aggiunta dei nutrienti. Per semplificare, i grafici riportano solo le concentrazioni reali di ciascun macronutriente saggiate quotidianamente nel mezzo di crescita. Non sono quindi mostrate le concentrazioni teoriche giornaliere di partenza legate alla somministrazione quotidiana dei nutrienti stessi

In figura 24 sono mostrati gli andamenti dei nutrienti (sia valori teorici legati alla loro aggiunta quotidiana che quelli reali, quindi determinati mediante saggio) nel mezzo di crescita e l'aumento delle percentuali di TAG nella crescita ARN + SAN (CO₂). Si nota come maggiore è lo stress da carenza di silicati e fosfati, maggiore è l'incremento dei livelli dei lipidi neutri. Questo mette in evidenza la rapida capacità che le diatomee hanno di accumulare lipidi in risposta a stress da carenza di nutrienti e suggeriscono la presenza di un sistema di trasduzione del segnale che coordina l'accumulo dei lipidi in maniera dipendente dai nutrienti.

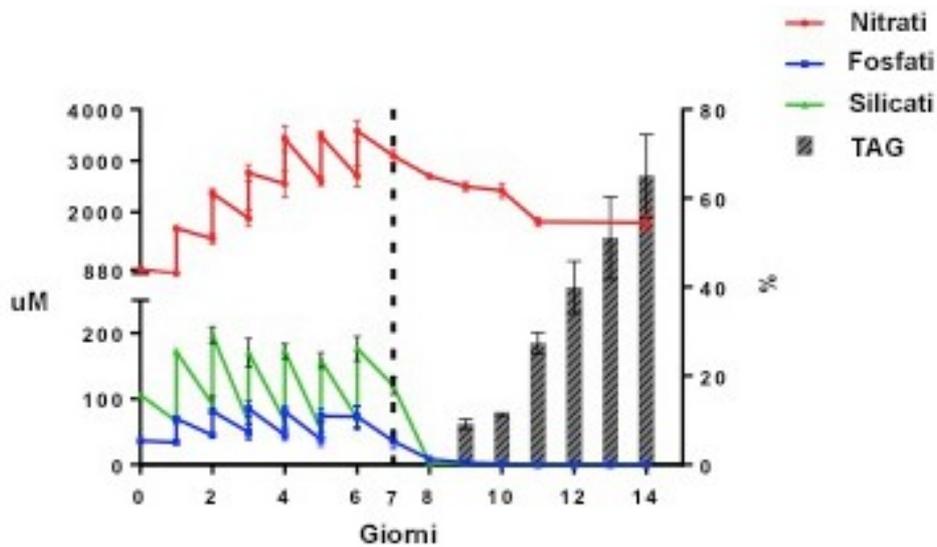


Figura 24 – Il grafico mostra la relazione tra il consumo dei principali macronutrienti e le percentuali di TAG nella prova ARN + SAN (CO₂)

3.2.5 Confronto riassuntivo per *T. weissflogii* e *C. cryptica* tra le varie combinazioni di Basso e Alto Regime di Nutrienti, Sospensione Aggiunta Nutrienti e CO₂ al 10%

Allo scopo di confrontare e analizzare le più importanti caratteristiche delle varie condizioni di crescita, sono messe a paragone le produttività di biomassa e lipidi e le percentuali delle varie classi lipidiche ottenute durante le prove delle due specie modello.

Nelle tabelle 6 e 7 sono riepilogati i valori di produttività di biomassa liofila e lipidica e le percentuali delle principali classi lipidiche nelle varie condizioni di crescita sia per *T. weissflogii* che per *C. cryptica*.

Tabella 6 - Valori di produttività di biomassa e lipidica con le percentuali relative delle diverse classi lipidiche per le differenti prove sperimentali di *T. weissflogii*. Tutte le analisi sono state effettuate in triplicato

Prova	Biomassa liofila (mg L⁻¹ giorno⁻¹)	Lipidi (mg L⁻¹ giorno⁻¹)	Lipidi (%)	TAG (%)	GL (%)	PL (%)	FFA (%)
BRN	26.4 ± 1.9	5.5 ± 0.5	21.1 ± 3.5	59.4 ± 3.1	4.9 ± 1.2	13.0 ± 1.8	22.7 ± 3.7
BRN (CO₂)	26.0 ± 1.9	9.2 ± 0.8	35.4 ± 0.5	69.3 ± 3.6	5.3 ± 0.4	14.2 ± 0.3	11.2 ± 3.0
ARN	62.2 ± 3.4	12.7 ± 1.0	20.4 ± 0.6	0.5 ± 0.7	41.2 ± 2.4	19.6 ± 3.4	38.7 ± 1.7
ARN + SAN	59.3 ± 4.8	8.4 ± 1.2	14.2 ± 1.8	15.9 ± 2.2	16.6 ± 1.5	59.6 ± 11.1	7.8 ± 2.9
ARN + SAN (CO₂)	88.4 ± 5.0	13.9 ± 1.0	15.7 ± 0.9	41.9 ± 6.0	21.2 ± 4.3	4.9 ± 3.6	34.1 ± 7.8
ARN (CO₂) + SAN (CO₂)	103.0 ± 13.0	25.0 ± 2.4	24.3 ± 0.7	65.9 ± 7.5	11.7 ± 1.6	0.9 ± 1.2	24.1 ± 3.9

Tabella 7 - Valori di produttività di biomassa e lipidica con le percentuali relative delle diverse classi lipidiche per le differenti prove sperimentali di *C. cryptica*. Tutte le analisi sono state effettuate in triplicato

Prova	Biomassa liofila (mg L⁻¹ giorno⁻¹)	Lipidi (mg L⁻¹ giorno⁻¹)	Lipidi (%)	TAG (%)	GL (%)	PL (%)	FFA (%)
BRN	20.4 ± 2.0	7.3 ± 1.5	36.6 ± 10.2	76.0 ± 3.8	4.7 ± 1.2	6.7 ± 1.8	12.6 ± 1.1
BRN (CO₂)	20.5 ± 1.0	10.4 ± 0.5	51.1 ± 1.3	78.0 ± 2.4	3.4 ± 0.3	7.7 ± 1.1	10.9 ± 2.2
ARN	55.4 ± 4.6	11.1 ± 0.3	20.2 ± 1.2	2.4 ± 1.9	38.7 ± 0.5	28.8 ± 4.3	30.2 ± 2.9
ARN + SAN	62.0 ± 2.2	12.3 ± 1.7	19.7 ± 2.3	33.0 ± 5.1	20.2 ± 6.7	19.9 ± 7.4	26.8 ± 6.3
ARN + SAN (CO₂)	89.6 ± 22.6	33.9 ± 6.5	38.3 ± 2.1	63.1 ± 6.6	13.1 ± 7.1	0	25.9 ± 9.3
ARN (CO₂) + SAN (CO₂)	86.1 ± 5.6	25.5 ± 1.9	29.7 ± 0.6	78.7 ± 2.1	12.0 ± 6.8	0.3 ± 0.4	12.3 ± 1.8

E' interessante notare come ci sia stato un aumento di 4 volte sia per la produttività di biomassa liofila che di lipidi per entrambe le specie passando da una condizione iniziale a Basso Regime di Nutrienti ad una crescita in doppia fase con Alto Regime di Nutrienti seguito da uno stress da carenza di nutrienti, con la presenza costante di CO₂ al 10%. Infatti in entrambe le specie la condizione ARN (CO₂) + SAN (CO₂) combina alte produttività di biomassa, alte quantità di lipidi, in particolare TAG. Questo è un importante risultato in vista di una possibile applicazione biotecnologica.

Un'analisi più dettagliata dei risultati ottenuti dimostra che un regime elevato di nutrienti (quindi assenza di condizioni di stress cellulare) determina l'accumulo di alte percentuali di lipidi strutturali

a discapito di quelli di riserva, mentre condizioni di carenza di nutrienti, meglio se in presenza di CO₂ al 10%, portano all'inversione del fenomeno fino ad ottenere quantità di oli davvero molto significative per entrambe le specie studiate (Figura 25).

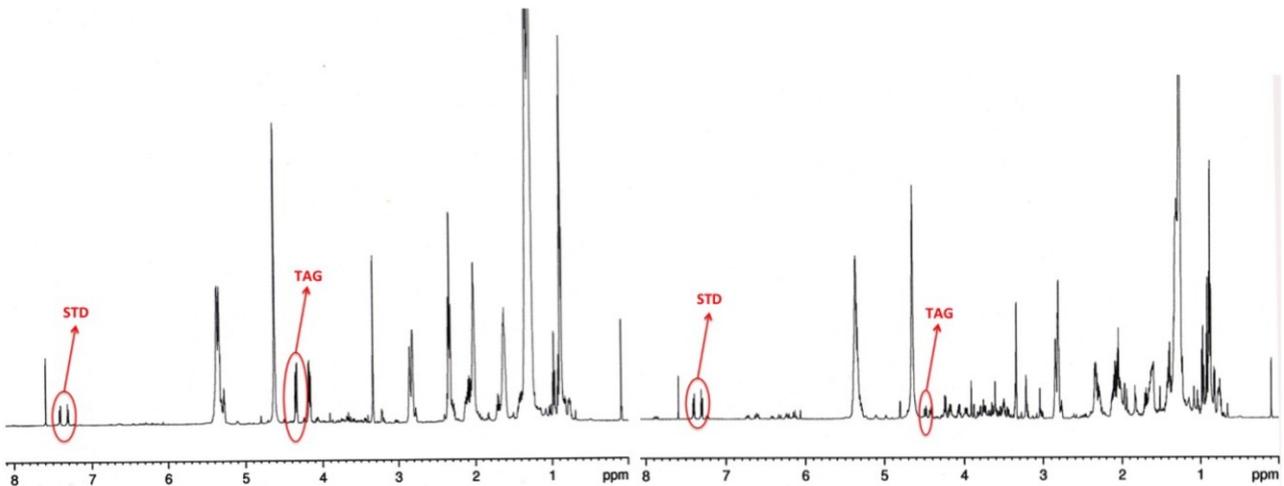


Figura 25 – Spettri ¹H-NMR di estratti lipidici di colture nella condizione ARN (CO₂) + SAN (CO₂) e ARN, rispettivamente. A parità di intensità del segnale dello standard, si può osservare come nella condizione di stress da carenza di nutrienti e alte concentrazioni di CO₂ sia in prima che in seconda fase (a sinistra) il segnale caratteristico dei TAG sia notevolmente più significativo

Quindi le prove sperimentali fin qui effettuate hanno permesso di ottenere in laboratorio sia per *T. weissflogii* che per *C. cryptica* una prima condizione a due fasi (Tabella 2, ARN (CO₂) + SAN (CO₂)): nella prima fase grazie all'aggiunta quotidiana dei nutrienti tipici dell'*f/2* e di CO₂ al 10% si ottengono elevate biomasse con ottime percentuali lipidiche; nella seconda fase grazie all'applicazione di condizioni di stress da carenza di nutrienti e alla somministrazione di CO₂ al 10% si ha un aumento della componente dei triacilgliceroli, che raggiungono percentuali molto alte.

PARTE II – EFFETTO DEPRIVAZIONE SELETTIVA*3.2.6 Effetto combinato della CO₂ e della limitazione selettiva di nutrienti (silicati, nitrati o fosfati) nelle colture delle specie selezionate*

Gli esperimenti illustrati nei paragrafi precedenti dimostrano che i metaboliti ed il metabolismo delle microalghe può essere modulato ed indirizzato attraverso la variazione delle condizioni di crescita. In vista di una applicazione biotecnologica dei processi di coltivazione delle diatomee, è stato studiato un programma di coltivazione a due fasi, con insufflazione continua di CO₂ al 10%, somministrazione controllata di nutrienti in prima fase in base al consumo quotidiano di ciascun macronutriente ed una seconda fase di deprivazione selettiva di Si o N o P (Tabella 8). Le condizioni provate sono:

- aggiunta quotidiana dosata dei macro e micronutrienti previsti dal mezzo di coltura f/2 per i primi sette giorni della curva di crescita e successiva sospensione dell'aggiunta solo di NaH₂PO₄ per i secondi sette giorni di crescita (Tabella 8, -P);
- aggiunta quotidiana dosata dei macro e micronutrienti previsti dal mezzo di coltura f/2 per i primi sette giorni della curva di crescita e successiva sospensione dell'aggiunta solo di NaNO₃ per i secondi sette giorni di crescita (Tabella 8, -N);
- aggiunta quotidiana dosata dei macro e micronutrienti previsti dal mezzo di coltura f/2 per i primi sette giorni della curva di crescita e successiva sospensione dell'aggiunta solo di Na₂SiO₃ per i secondi sette giorni di crescita (Tabella 8, -Si).

Le colture sono state insufflate con il 10% di CO₂ per sette ore al giorno per tutto il periodo di crescita.

Tabella 8 – Schema riassuntivo delle tre tipologie di crescita con deprivazione selettiva a cui sono state sottoposte le specie modello *T. weissflogii* e *C. cryptica*

PROVA	DURATA (Giorni)	TIPO DI ESPERIMENTO	PROCEDURA ESPERIMENTO	
			Aggiunta Nutrienti	Insufflazione
Deprivazione selettiva (- P)	14	Doppia Fase	<u>I Fase:</u> Aggiunta dosata dei nutrienti per i primi 7 giorni. <u>II Fase:</u> Sospensione Aggiunta NaH ₂ PO ₄ per i secondi 7 giorni	<u>I Fase:</u> Aria + 10% di CO ₂ - <u>II Fase:</u> Aria + 10% di CO ₂
Deprivazione selettiva (- N)	14	Doppia Fase	<u>I Fase:</u> Aggiunta dosata dei nutrienti per i primi 7 giorni. <u>II Fase:</u> Sospensione Aggiunta NaNO ₃ per i secondi 7 giorni	<u>I Fase:</u> Aria + 10% di CO ₂ 10% - <u>II Fase:</u> Aria + 10% di CO ₂
Deprivazione selettiva (- Si)	14	Doppia Fase	<u>I Fase:</u> Aggiunta dosata dei nutrienti per i primi 7 giorni. <u>II Fase:</u> Sospensione Aggiunta Na ₂ SiO ₃ per i secondi 7 giorni	<u>I Fase:</u> Aria + 10% di CO ₂ - <u>II Fase:</u> Aria + 10% di CO ₂ 10%

3.2.6.1 Andamento delle curve di crescita e analisi biochimiche della biomassa di *T. weissflogii* e *C. cryptica*

Tutti gli esperimenti hanno avuto una durata di 14 giorni per entrambe le specie. Gli andamenti delle conte cellulari, espresse come cell mL⁻¹, sono mostrati in figura 26. Si può osservare come le curve sono pressocchè identiche nelle prima fase in tutte e tre le condizioni, indicando una buona riproducibilità biologica. Nella II fase le deprivazioni selettive di fosfati e nitrati non risultano essere limitanti per la crescita cellulare, in quanto le cellule hanno continuato a crescere, raggiungendo alte densità. Invece la deprivazione di silice influenza in maniera drastica e significativa la crescita arrestando la divisione cellulare di entrambe le specie, in accordo con il ruolo essenziale svolto da questo elemento nella formazione della teca silicea (Figura 26).

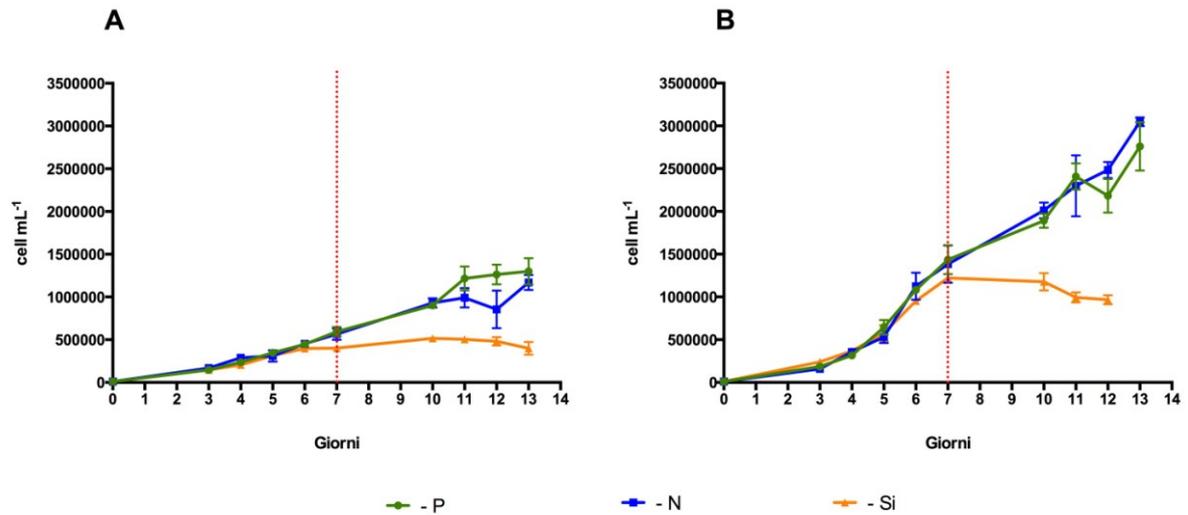


Figura 26 – Andamento delle curve di crescita nelle condizioni di deprivazione selettiva di silicati, fosfati o nitrati sia per (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica*. La linea rossa tratteggiata indica il giorno in cui è iniziata la deprivazione selettiva di un singolo macronutriente

Nel giorno finale della curva di crescita, i pesi liofilati ottenuti in deprivazione selettiva di fosforo (-P) e azoto (-N) sono circa 1.4 g L⁻¹ e 1.6 g L⁻¹ per *T. weissflogii* e 1.1 g L⁻¹ e 1.0 g L⁻¹ per *C. cryptica*, rispettivamente. In linea con le curve di crescita, biomasse minori sono state ottenute per entrambe le specie nelle prove in deprivazione di silicio (-Si), ottenendo valori pari a 763 mg L⁻¹ per *T. weissflogii* e 664 mg L⁻¹ per *C. cryptica* (Figura 27).

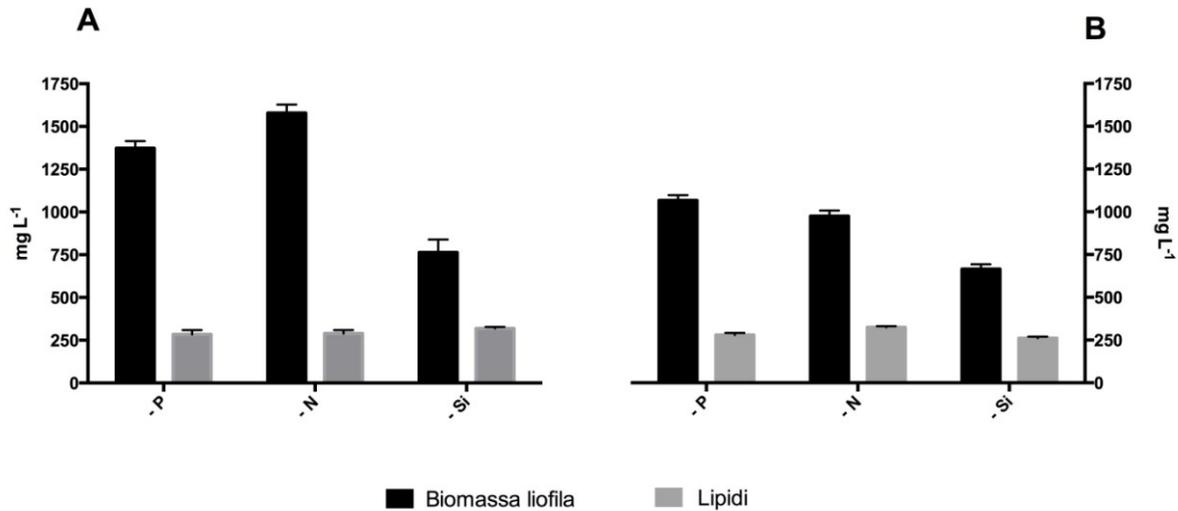


Figura 27 – Valori in biomassa liofila e produzione lipidica (mg L⁻¹) ottenute negli esperimenti di deprivazione selettiva di silicati, fosfati o nitrati sia per (A) *T. weissflogii* che (B) *C. cryptica*

Per quanto riguarda i lipidi (Figura 27), è interessante notare che la quantità media rimane più o meno nello stesso ordine di grandezza in tutte le condizioni, sia per *T. weissflogii* che per *C. cryptica*. In carenza di silicati, nonostante si siano ottenute biomasse molto più basse, la quantità di lipidi risulta uguale a quella ottenuta in -P e -N, indicando quindi un aumento percentuale all'interno delle cellule.

Dall'analisi dei dati biochimici è possibile osservare come vi sia una prevalenza della componente proteica, seguita da quella lipidica e dai carboidrati sia per *T. weissflogii* che per *C. cryptica* nell'esperimento in deprivazione selettiva di fosfati (Figura 28).

La deprivazione selettiva di nitrati ha determinato invece una differenziazione nella risposta tra *T. weissflogii* e *C. cryptica*: nella prima specie predomina la componente dei carboidrati su quelle lipidica e proteica (circa il 60%, il 18% e il 9% rispettivamente), mentre in *C. cryptica* prevale la componente lipidica su carboidrati e proteine (circa il 33%, il 18% e il 12% rispettivamente) (Figura 28).

Le analisi effettuate sulle biomasse recuperate al termine della deprivazione selettiva di silicati hanno evidenziato un'analogia nel comportamento di *T. weissflogii* e *C. cryptica*, mostrando la prevalenza percentuale della componente dei lipidi su proteine e carboidrati (Figura 28). Purtroppo

però la carenza di questo elemento ha l'effetto negativo di limitare la divisione cellulare delle diatomee, determinando rese della biomassa liofila più basse in termini assoluti.

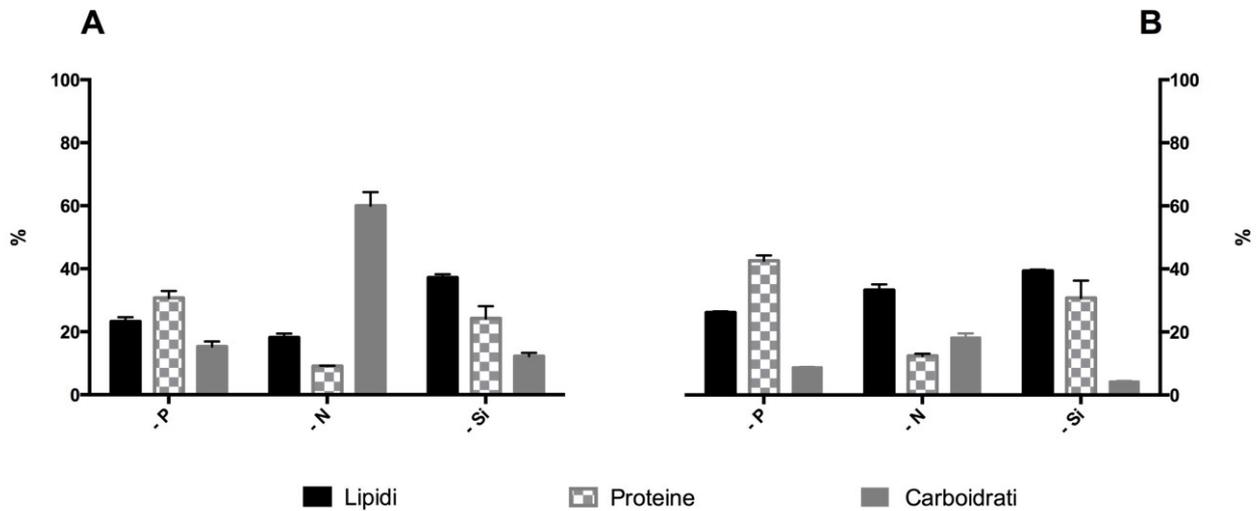


Figura 28 – Andamento percentuale di lipidi, proteine e carboidrati nell'ambito della biomassa recuperata alla fine della curva di crescita per (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica* negli esperimenti in deprivazione selettiva di silicati, fosfati o nitrati

Anche Hildebrand *et al.* (2012) ha riportato che quando *C. cryptica* è cresciuta in batch con differenti concentrazioni iniziali di Si, la crescita si arresta il giorno 7 e la densità cellulare è in proporzione alla quantità iniziale di Si aggiunta nel mezzo di coltura. Una situazione analoga non vale invece per gli altri nutrienti, come i nitrati.

Una possibile ragione per spiegare il differente comportamento delle cellule in situazioni di limitazione di Si o N potrebbe essere legata alle differenze nello stoccaggio intracellulare di questi elementi. L'azoto è conservato nella cellula in varie forme a cui si può accedere nel corso del tempo, con conseguente continua crescita cellulare anche dopo che le cellule sono poste in privazione del macronutriente. Invece il Si non è immagazzinato nelle cellule in modo significativo e quindi porre le cellule in deprivazione causa un rapido arresto della crescita cellulare e un conseguente accumulo di TAG. Le diatomee inoltre sono in grado di ridurre lo spessore dei frustuli

per mantenere una certa velocità di divisione cellulare anche in carenza di Si (Napoleon *et al.* 2013).

Inoltre la differenza nelle risposte cellulari ai livelli di N e P può essere spiegata nell'ambito del rapporto di Redfield, ossia N:P uguale a 16:1 (Redfield *et al.* 1963). La risposta fisiologica alla limitazione di fosfato (cioè un limitato accumulo di lipidi) è diversa da quella in limitazione di azoto a causa delle differenti esigenze fisiologiche e dei percorsi metabolici per la conservazione di questi elementi (per esempio, proteine rispetto a nucleotidi). Infatti anche in specie come *P. tricornutum* la risposta alle due deprivazioni è stata diversa nell'accumulo lipidico, con un aumento di cinque volte della fluorescenza specifica (usando il Nile Red) osservata quando le cellule sono state cresciute in carenza di nitrato rispetto alle cellule in deprivazione di fosfato (Valenzuela *et al.* 2013).

3.2.6.2 Analisi elementare (CHNS) e TOC (Carbonio Organico Totale) delle biomasse

Parallelamente alle analisi biochimiche, sono state effettuate analisi per quantificare i principali elementi (CHNS) presenti nelle biomasse liofile da esperimenti in deprivazione selettiva di silicati, fosfati o nitrati. Per il carbonio è stata ottenuta anche l'analisi del Carbonio Organico Totale (TOC). Nelle tabelle 9 e 10 si possono osservare i valori percentuali dei singoli elementi. In entrambe le specie e in tutte le condizioni saggiate l'H e lo S sono presenti in concentrazioni paragonabili comprese tra il 5 - 7% e 0 - 1%, rispettivamente. Lo zolfo viene incorporato principalmente nei sulfolipidi, negli amminoacidi contenenti zolfo (quali metionina, cisteina e cistina) e nelle proteine (Benning *et al.* 2008; Stonik e Stonik 2015).

Diverso il discorso per quanto concerne l'N e il C. Il primo è sempre presente in concentrazioni che oscillano intorno al 5 - 6%, tranne nelle biomasse finali delle prove in deprivazione selettiva di azoto, in cui le percentuali sono dimezzate. In questo caso l'aumento nel rapporto C/N indica che c'è stato consumo dei composti azotati (di cui può essere la causa principale la diminuzione delle proteine) e l'aumento della sintesi di prodotti di riserva, come i lipidi. Un generale aumento

dell'attività proteasica è stata riscontrata in *D. tertiolecta* sotto limitazione di N (Hildebrand *et al.* 2012).

Per quanto riguarda il C, le analisi hanno dimostrato percentuali simili per le due specie (comprese tra il 30% e il 40% circa) con oscillazioni che dipendono dalle condizioni di crescita e che mostrano un leggero incremento nel C fissato tra le biomasse analizzate in prima fase e in seconda fase.

I risultati ottenuti hanno mostrato che i valori percentuali dei campioni analizzati con e senza trattamento con acido cloridrico (HCl, analisi TOC) sono simili, per cui i valori della biomassa liofila sono reali perché non alterati in eccesso dalla presenza di precipitati di bicarbonato.

Tabella 9 – Risultati delle analisi CHNS che mostrano il contenuto percentuale dei vari elementi nelle biomasse di *T. weissflogii* provenienti dagli esperimenti in deprivazione selettiva: i dati del carbonio sono quelli derivanti dall'analisi TOC. n. r. = non rilevabile. Tutte le analisi sono state effettuate in triplicato

	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
-Si (G7)	26.6 ± 2.1	4.7 ± 0.01	4.8 ± 0.3	n. r.
-P (G7)	29.5 ± 0.4	4.8 ± 0.03	4.8 ± 0.08	0.5 ± 0.1
-N (G7)	29.8 ± 1.3	4.9 ± 0.2	4.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
-Si (G14)	37.4 ± 3.7	6.2 ± 0.1	4.1 ± 0.07	0.8 ± 0.3
-P (G14)	35.8 ± 0.9	7.0 ± 1.6	5.8 ± 1.6	0.9 ± 0.3
-N (G14)	36.8 ± 0.3	5.7 ± 0.4	1.7 ± 0.03	0.3 ± 0.1

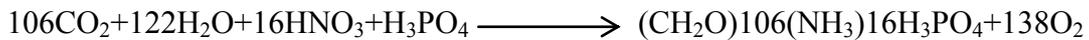
Tabella 10 – Risultati delle analisi CHNS che mostrano il contenuto percentuale dei vari elementi nelle biomasse di *C. cryptica* provenienti dagli esperimenti in deprivazione selettiva: i dati del carbonio sono quelli derivanti dall'analisi TOC. n. r. = non rilevabile. Tutte le analisi sono state effettuate in triplicato

	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
-Si (G7)	34.5 ± 0.8	5.2 ± 0.2	6.2 ± 0.3	n. r.
-P (G7)	32.9 ± 0.5	5.3 ± 0.4	6.2 ± 0.2	n. r.
-N (G7)	32.2 ± 0.4	5.0 ± 0.2	5.5 ± 0.1	n. r.
-Si (G14)	39.5 ± 1.2	6.2 ± 0.2	5.3 ± 0.2	n. r.
-P (G14)	39.7 ± 0.5	5.8 ± 0.02	6.5 ± 0.1	n. r.
-N (G14)	37.2 ± 1.2	6.1 ± 0.1	2.1 ± 0.08	n. r.

In seconda istanza si è osservato che la composizione elementare cellulare è in linea con il rapporto

atomico medio teorizzato da Redfield di 106C:16N:1P (Redfield *et al.* 1963):

PRODUZIONE DI MATERIA ORGANICA FITOPLANCTONICA



Secondo questa proporzione il rapporto C/N nella biomassa fitoplanctonica è di circa 6.6, che è in linea con i risultati delle crescite in prima fase in cui i rapporti C/N sono in media intorno a 6. Diversi sono i risultati nelle situazioni di deprivazione selettiva, in modo particolare quella di N, in cui si osserva un aumento del rapporto C/N.

In tabella 11 sono indicate le composizioni elementari medie di uno zucchero di base, di un classico lipide e di una generica proteina: conoscendo quindi qual è il peso percentuale del C nelle diverse classi biochimiche e come queste a loro volta sono ripartite nelle cellule cresciute nelle diverse condizioni, è possibile stabilire i flussi del C. I pesi percentuali del C in un diacilglicerolo (C₄₀H₇₄O₅, 15:0), in una proteina generica (C_{3.83}H_{6.05}O_{1.25}N) e in uno zucchero semplice (C₆H₁₀O₅, unità di D-glucosio che costituisce la cellulosa), sono 34%, 32% e 29%, quindi grossomodo paragonabili come 1:1:1 (w/w/w).

Tabella 11 – Composizione elementare media dei metaboliti primari (carboidrati, lipidi, proteine e acidi nucleici) del fitoplancton marino (Anderson 1995)

<i>Organic Matter Component</i>	<i>Composition</i>	<i>H/C_{org} ratio</i>	<i>C_{org}/O ratio</i>
Carbohydrate	C ₆ H ₁₀ O ₅	1.67	1.2
Lipid	C ₄₀ H ₇₄ O ₅ (C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	1.85	8.0
Protein	C _{3.83} H _{6.05} O _{1.25} N (C ₁₀₆ H ₁₆₈ O ₃₄ N ₂₈ S)	1.58	3.1
Nucleic acid	C _{9.625} H ₁₂ O _{6.5} N _{3.75} P	1.25	1.5

La ripartizione tra la componente lipidica, proteica e carboidratica dopo i primi sette giorni di coltura delle prove in deprivazione selettiva è grossomodo simile sia per *T. weissflogii* che *C. cryptica*: le proteine sono quasi il doppio rispetto a lipidi e carboidrati, che sono presenti in quantità

quasi uguali tra di loro. Quindi considerando i valori di biomassa liofila (mg L⁻¹), le percentuali delle ripartizioni biochimiche e la percentuale di carbonio organico totale derivante dall'analisi elementare (Tabelle 9 e 10) è possibile dire che circa 45 - 50 mg L⁻¹ di carbonio sono fissati nelle proteine, circa 20 mg L⁻¹ nei lipidi e circa 20 - 25 mg L⁻¹ nei carboidrati per *T. weissflogii* e *C. cryptica*, rispettivamente (Figura 29, Tabelle 12 e 13).

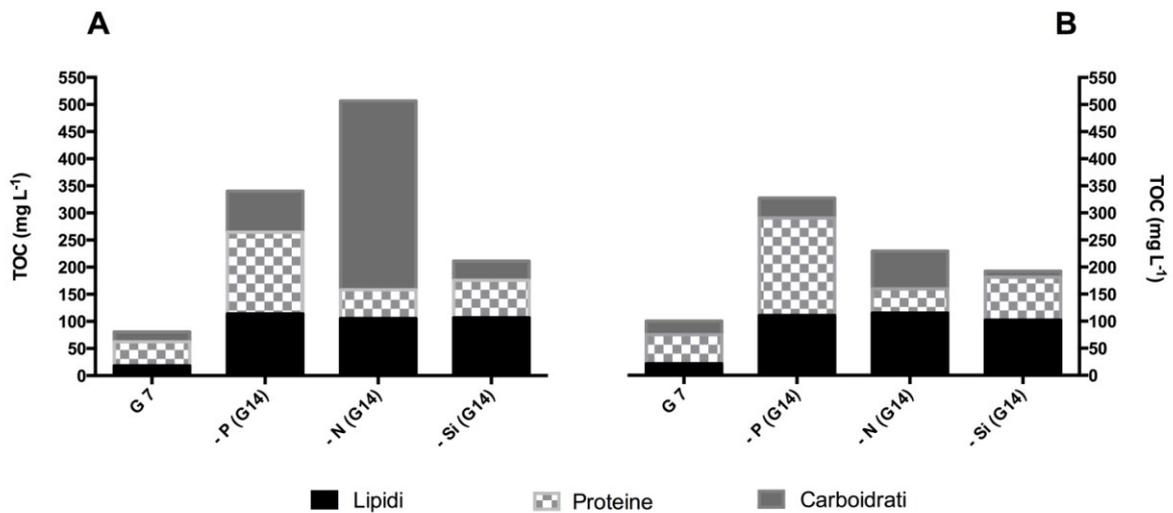


Figura 29 – Distribuzione quantitativa (mg L⁻¹) del carbonio tra lipidi, proteine e carboidrati in (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica* nelle crescite in condizione di deprivazione selettiva

Le analisi effettuate sulle biomasse finali cresciute in deprivazione selettiva di fosfati hanno mostrato una condizione unica ed analoga tra *T. weissflogii* e *C. cryptica* per il fatto che le proteine sono più abbondanti di lipidi e carboidrati (Figura 28). Di conseguenza il C è presente con circa 150 - 180 mg L⁻¹ nelle proteine, con circa 110 mg L⁻¹ nei lipidi e con circa 75 - 37 mg L⁻¹ nei carboidrati per *T. weissflogii* e *C. cryptica*, rispettivamente. Si può affermare che la deprivazione di P ha determinato un cambiamento nel destino finale del carbonio fissato dai carboidrati verso le proteine (Figura 29, Tabelle 12 e 13).

Le analisi effettuate sulle biomasse finali cresciute in deprivazione selettiva di nitrati hanno evidenziato una differenza di comportamento tra *T. weissflogii* e *C. cryptica*. Nella prima specie predomina la componente dei carboidrati su quella lipidica e proteica, invece in *C. cryptica* prevale

la componente lipidica su carboidrati e proteine (Figura 28). Quindi in *T. weissflogii* il C è presente con circa 348.2 mg L⁻¹ nei carboidrati, con circa 105.5 mg L⁻¹ nei lipidi e con circa 52.8 mg L⁻¹ nelle proteine, mentre in *C. cryptica* possiamo stimare circa 115 mg L⁻¹, 70 mg L⁻¹ e 45 mg L⁻¹ di carbonio nei lipidi, carboidrati e proteine, rispettivamente. I dati suggeriscono che la deprivazione di N causa in *T. weissflogii* un cambiamento nel destino finale del carbonio fissato soprattutto dalle proteine verso i carboidrati, mentre in *C. cryptica* dalle proteine verso i lipidi (Figura 29, Tabelle 12 e 13).

Le analisi effettuate sulle biomasse recuperate al termine della deprivazione selettiva di silicati hanno evidenziato un'analogia nel comportamento di *T. weissflogii* e *C. cryptica*, mostrando la prevalenza della componente dei lipidi su proteine e carboidrati (Figura 28). Quindi in *T. weissflogii* il C è presente per circa 100 mg L⁻¹ nei lipidi, per 70 - 80 mg L⁻¹ nelle proteine e per 35 -11 mg L⁻¹ per *T. weissflogii* e *C. cryptica*, rispettivamente. Quindi la deprivazione di Si ha provocato sia in *T. weissflogii* che in *C. cryptica* un cambiamento nel destino finale del carbonio fissato da proteine e carboidrati verso i lipidi, in accordo con quanto riportato anche da Fu *et al.* 2015 (Figura 29, Tabelle 12 e 13).

Tabella 12 – Distribuzione quantitativa (mg L⁻¹) del carbonio tra lipidi, proteine e carboidrati in *T. weissflogii* nelle crescite in condizione di deprivazione selettiva. Tutte le analisi sono state effettuate in triplicato

	Carbonio (mg L ⁻¹)		
	Lipidi	Proteine	Carboidrati
G7	18.2 ± 2.8	44.2 ± 3.4	18.3 ± 1.1
-Si (G14)	106.8 ± 18.2	69.1 ± 14.9	35.5 ± 8.8
-P (G14)	114.1 ± 2.9	150.6 ± 3.6	75.5 ± 10.6
-N (G14)	105.4 ± 7.1	52.8 ± 1.3	348.2 ± 30.8

Tabella 13 – Distribuzione quantitativa (mg L⁻¹) del carbonio tra lipidi, proteine e carboidrati in *C. cryptica* nelle crescite in condizione di deprivazione selettiva. Tutte le analisi sono state effettuate in triplicato

	Carbonio (mg L ⁻¹)		
	Lipidi	Proteine	Carboidrati
G7	21.3 ± 3.4	79.7 ± 18.9	11.3 ± 0.9
-Si (G14)	102.0 ± 5.1	69.1 ± 14.9	35.5 ± 8.8
-P (G14)	110.7 ± 6.3	180.3 ± 10.6	37.0 ± 1.4
-N (G14)	115.0 ± 6.0	45.0 ± 6.0	70.0 ± 5.0

Anche in colture in condizioni standard di *P. tricornutum* circa il 45% del carbonio è presente nelle proteine, solo il 9% del carbonio cellulare è presente nei lipidi, e in particolare solo circa l'1% è presente nei TAG. In condizioni di deprivazione di azoto una frazione del carbonio si sposta dalle proteine cellulari e viene reindirizzata nei TAG. *P. tricornutum* in condizioni di deprivazione di N cannibalizza e mobilizza le proteine dei plastidi e i lipidi polari verso forme di riserva come i TAG (Levitan *et al.* 2015).

3.2.6.3 Osservazioni al microscopio ottico, marcatura delle gocce lipidiche con il reattivo fluorescente BODIPY e analisi NMR per la determinazione lipidica

Per verificare eventuali differenze nelle dimensioni o nell'aspetto delle cellule cresciute nelle diverse condizioni sono state fatte foto in chiaro al microscopio ottico. Nell'ambito della specie non ci sono state grosse variazioni nella taglia delle cellule, anche se quelle in deprivazione di azoto mostrano maggiore trasparenza alla luce (Figure 30 e 31).

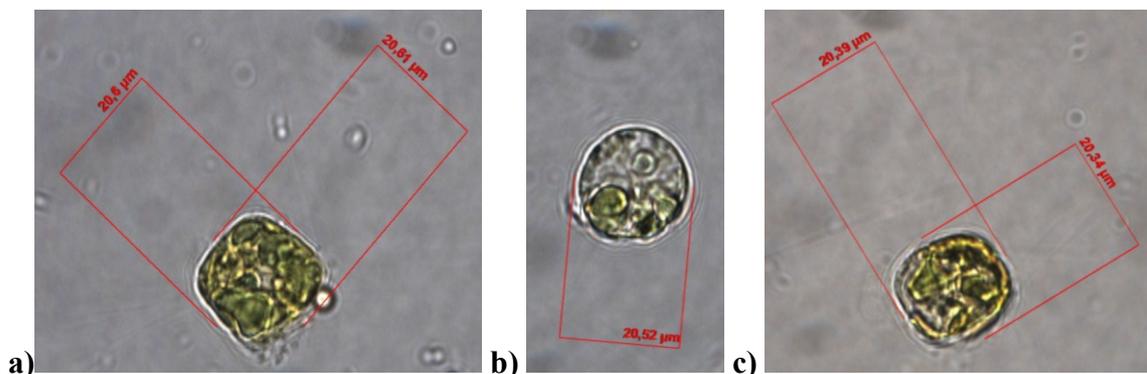


Figura 30 – Fotografie al microscopio ottico (100x) delle cellule di *T. weissflogii* cresciute in deprivazione selettiva di: a) silicati, b) nitrati, c) fosfati

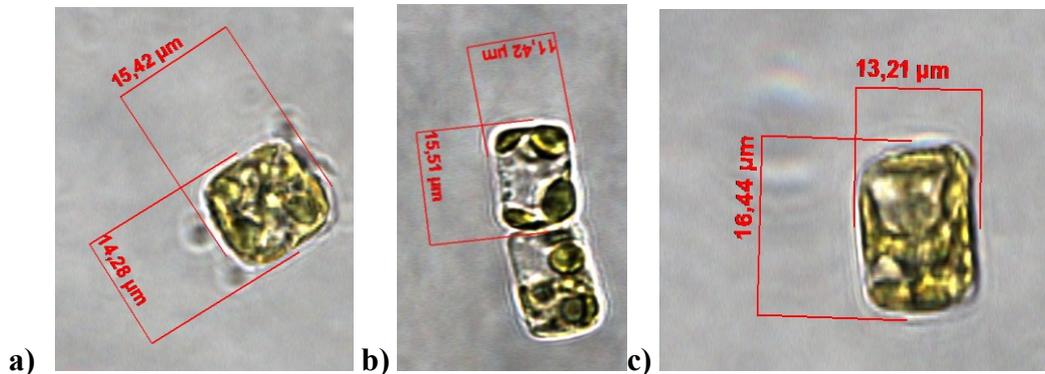


Figura 31 – Fotografie al microscopio ottico (100x) delle cellule di *C. cryptica* cresciute in deprivazione selettiva di: a) silicati, b) nitrati, c) fosfati

Le analisi ¹H-NMR degli estratti lipidici delle cellule di entrambe le specie sottoposte ad un regime costante di alimentazione per i primi sette giorni di crescita seguito da una condizione di stress come la deprivazione da singolo macronutriente con insufflazione di CO₂ al 10% hanno mostrato alte percentuali di triacilgliceroli. In particolare, come mostrato in figura 32, in *T. weissflogii* la carenza di silicati e nitrati ha dato risultati simili, con percentuali di TAG che si aggirano intorno al 64% e 70%, rispettivamente. In *C. cryptica*, l'effetto della deprivazione di nitrati è stata ancor più marcato rispetto ai silicati, in quanto i TAG arrivano al 75%. Per quanto riguarda la risposta alla deprivazione dei fosfati, in entrambe le specie si è notato un effetto meno marcato rispetto alla deprivazione di N e Si, con percentuali di TAG pari a circa 44% e 26% in *T. weissflogii* e *C. cryptica*, rispettivamente.

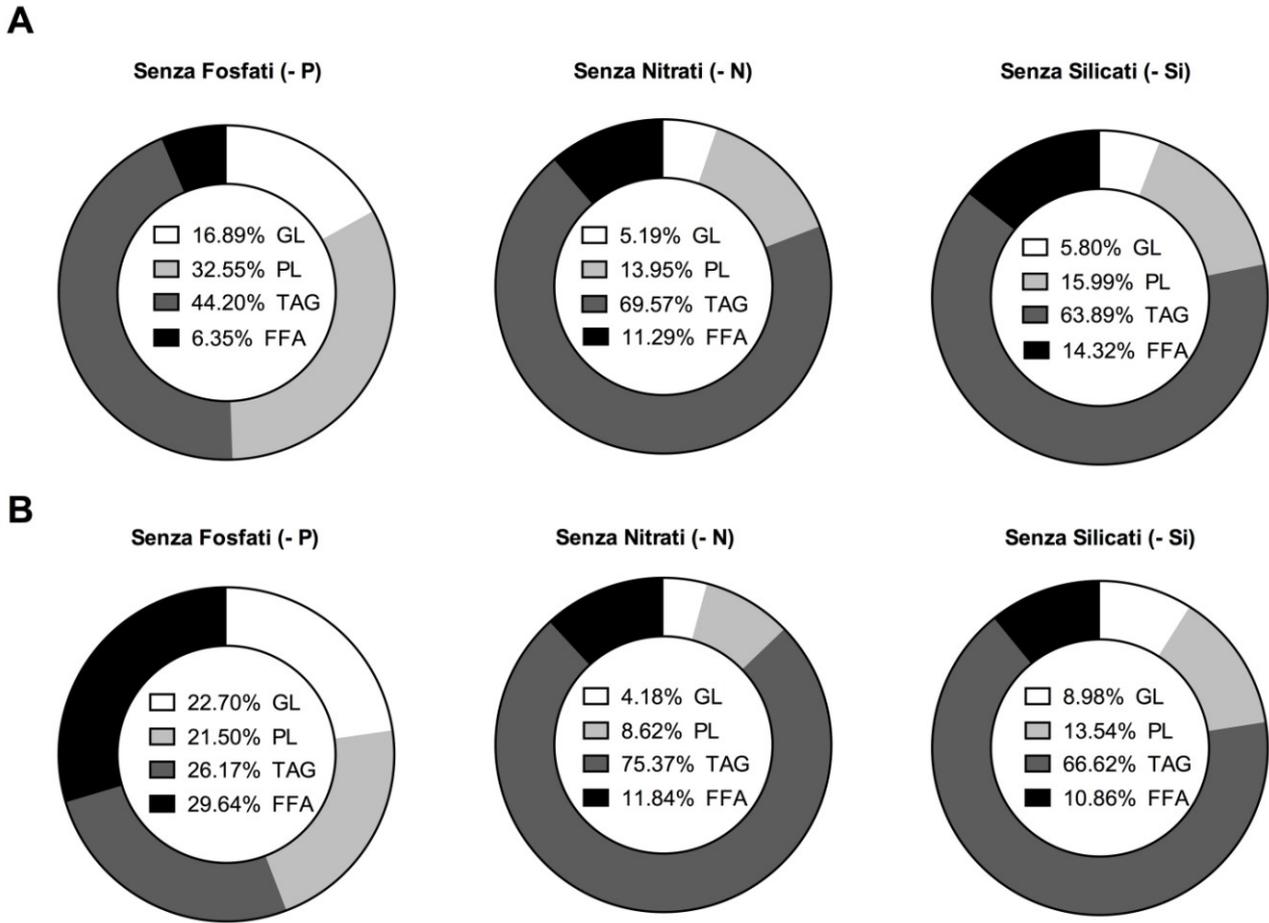


Figura 32 – Ripartizione delle diverse classi lipidiche (%) per (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica* nelle prove di deprivazione selettiva

I dati ottenuti nelle nostre condizioni sperimentali sono migliori rispetto a quelli attualmente riportati in letteratura, secondo cui cellule di *C. cryptica* in deprivazione di silice raggiungono livelli di lipidi neutri (meno del 60% di TAG) rispetto a colture non in deprivazione (Hu *et al.* 2008; Stonik e Stonik 2015).

Il contenuto di silice nelle diatomee può variare dal 22% al 47% del peso secco (Lewin e Guillard 1963; Hildebrand *et al.* 2012) Se si considerasse anche questa componente nel calcolo del peso secco delle cellule, il contenuto di lipidi nelle diatomee rispetto al contenuto di carbonio totale delle cellule sarebbe ancora più alto di quanto attualmente riportato in letteratura. Per tale motivo le diatomee sono almeno alla pari, se non superiori, alle altre classi di microalghe in termini di capacità di accumulare lipidi (Lewin e Guillard 1963; Hildebrand *et al.* 2012).

In generale le dimensioni del vacuolo influenzano la capacità di immagazzinamento dei nutrienti: per esempio, le Clorofite, comprese le varie specie di *Chlorella*, *Chlamydomonas reinhardtii* e *D. salina*, hanno vacuoli piccoli (3 - 14% del volume del loro protoplasto) rispetto alle diatomee (45 - 90% del volume del loro protoplasto). In termini di produttività lipidica, le cellule con grandi vacuoli necessitano di più tempo rispetto alle cellule con vacuoli più piccoli per andare in carenza di nutrienti, vista la loro maggiore capacità di immagazzinamento (Hildebrand *et al.* 2012).

Anche nella diatomea marina *P. tricornutum* si verifica un aumento dell'accumulo di lipidi sotto limitazione di N e P. Tuttavia, colture di *P. tricornutum* esclusivamente in limitazione di N hanno mostrato un aumento più significativo dei TAG rispetto a colture che sono state limitate solo in P. Quindi la limitazione combinata sia N e P potrebbe portare a concentrazioni lipidiche più alte che in deprivazione da singolo nutriente (Fields *et al.* 2014).

Le risposte fisiologiche alla carenza dei vari nutrienti sono comunque ancora poco note e possono avere effetti diversi a seconda della specie considerata e delle condizioni di crescita. Tra le microalghe esiste una grande variabilità di risposta alla riduzione di azoto nel medium di crescita. *Chlorella pyrenoidosa* aumenta la produzione di lipidi neutri, mentre *Dunaliella* sp. e *Tetraselmis suecica* mostrano una diminuzione nella biosintesi dei lipidi. Il caso estremo è quello del genere *Chlorella* per la quale è stato riportato che in limitazione di azoto alcuni strain accumulano amido mentre altri sintetizzano prevalentemente lipidi neutri (Hu 2004).

Per esempio forti deprivazioni da azoto sono necessari in alcune specie, come *Neochloris oleoabundans* e *Scenedesmus dimorphus* per aumentare la produttività lipidica, mentre limitazioni più blande sono state efficaci per *Chlorella vulgaris* e *Chlorococcum oleofaciens*. La produttività dei lipidi può anche essere influenzata dalla concentrazione di CO₂: livelli tra 0.5 - 1% hanno dimostrato migliorare il contenuto di lipidi in *C. vulgaris* e *N. salina* (Razeghifard 2013).

L'incremento dei livelli intracellulari di TAG sono stati evidenziati non solo dagli spettri ¹H-NMR, ma anche grazie alla marcatura con un colorante fluorescente, il BODIPY, e successiva osservazione al microscopio ottico a fluorescenza, dei depositi lipidici all'interno delle cellule in

forma di vere e proprie gocce lipidiche. Nella foto di figura 33 è possibile osservare come gli accumuli di TAG siano pochi e di dimensioni molto ridotte nella crescita in condizione di Alto Regime di Nutrienti (ARN) e come invece siano numerosi e grandi nelle prove in deprivazione selettiva di nitrati o silicati (-N e -Si).

Recenti studi hanno dimostrato che le gocce lipidiche non sono solo semplici depositi di energia, ma vere e proprie strutture dinamiche coinvolte in numerosi processi cellulari di omeostasi, traffico e sintesi di lipidi (Traller e Hildebrand 2013; Goold *et al.* 2015).

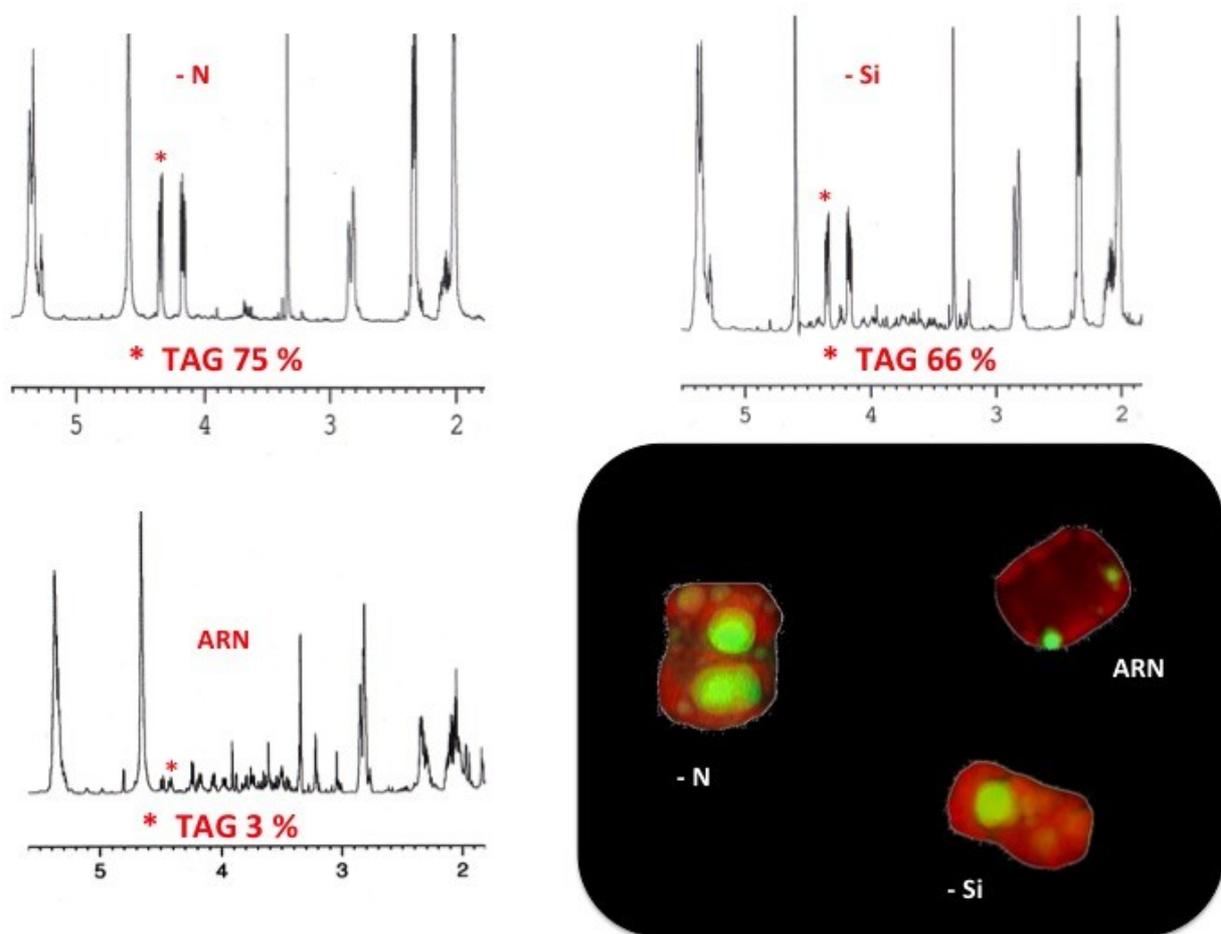


Figura 33 – Spettri ¹H-NMR degli estratti lipidici di colture di *C. cryptica* cresciute in presenza di CO₂ al 10% e deprivazione di N o Si (-N, -Si) rispetto a colture con Alto Regime di Nutrienti in presenza di aria (CO₂ allo 0.04%) (ARN): sono indicati i segnali diagnostici dei TAG e la loro percentuale relativa nell'ambito dell'estratto lipidico. Nel riquadro sono riportate le foto ottenute con un microscopio ottico a fluorescenza delle cellule cresciute nelle stesse condizioni e nelle quali è possibile vedere verdi fluorescenti le gocce lipidiche contenenti TAG e marcate con BODIPY, mentre il rosso è dovuto all'autofluorescenza della clorofilla. Analoga è la situazione anche per le colture di *T. weissflogii*

Dopo essere stati sintetizzati, i TAG sono immagazzinati in corpi lipidici situati nel citoplasma delle cellule eucariotiche, sebbene in alcune microalghe verdi come *Dunaliella bardawil* la formazione e l'accumulo di questi corpi lipidici si verifica nello spazio intertilacoide dei cloroplasti: in quest'ultimo caso questi corpi prendono il nome di plastoglobuli (Hu *et al.* 2008).

In condizioni non limitanti di nutrienti nelle microalghe sono presenti generalmente uno o due corpi lipidici per cellula, ma sia il numero che le dimensioni delle goccioline lipidiche aumentano man mano che le cellule sono esposte a condizioni di stress. Una volta che le condizioni di crescita ridiventano favorevoli, le gocce lipidiche che si sono accumulate scompaiono rapidamente come sono state sintetizzate (di solito nell'arco di 48 ore). L'attuale modello strutturale di una goccia lipidica prevede che questa sia costituita da un core lipidico neutro (solitamente TAG), che è circondato da un monostrato di lipidi polari (PL) con proteine in superficie; non sono mai stati trovati zuccheri associati alle gocce lipidiche. Il rapporto tra proteine, lipidi e altri componenti minoritari è specie-specifico. La funzione principale dei lipidi polari è la formazione di una membrana monostrato che separi i TAG dall'ambiente acquoso intracellulare. Oltre al ruolo strutturale, i PL presenti nelle gocce lipidiche possono essere utilizzati anche come substrato per fornire catene aciliche per la sintesi dei TAG (Figura 34) (Goold *et al.* 2015).

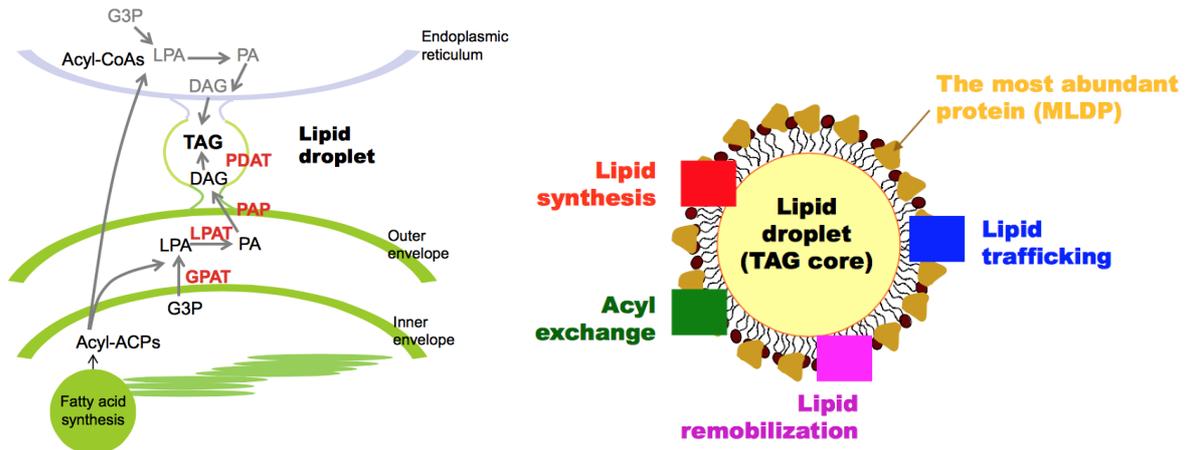


Figura 34 – A sinistra è mostrato il modello di formazione delle gocce lipidiche in *C. reinhardtii* che coinvolge sia i cloroplasti che il reticolo endoplasmatico. In rosso sono mostrati gli enzimi coinvolti nella biosintesi dei TAG e in nero i loro substrati. I precursori degli acidi grassi sono sintetizzati *de novo* nel cloroplasto, utilizzando il carbonio fissato durante la fotosintesi; gli acidi grassi liberi sono esportati dal cloroplasto e poi convertiti in TAG nel reticolo endoplasmatico (RE), da cui vengono rilasciati nel citoplasma in forma di gocce lipidiche. ACP, proteina trasportatrice degli acili; CoA, coenzima A; DAG, diacilgliceroli; G3P, glicerolo-3-fosfato; GPAT, glicerolo-3-fosfato aciltransferasi; LPA, acido lisofosfatidico; LPAT, acido lisofosfatidico aciltransferasi; PA, acido fosfatidico; PAP, acido fosfatidico fosfatasi; PDAT, fosfolipide:diacilglicerolo aciltransferasi, TAG, triacilgliceroli. A destra è mostrata la struttura di una tipica goccia lipidica e le principali funzioni cellulari nella quale è coinvolta (Goold *et al.* 2015)

3.3 CONCLUSIONI

Il confronto tra le produttività di biomassa, lipidi e carboidrati è mostrato in figura 35. Per entrambe le specie considerate in questo studio, rispetto alle condizioni standard, si rileva un incremento significativo per le produttività di biomassa e lipidi (anche fino a 5 volte) in seguito ad insufflazione con il 10% di CO₂ e carenza selettiva di nutrienti.

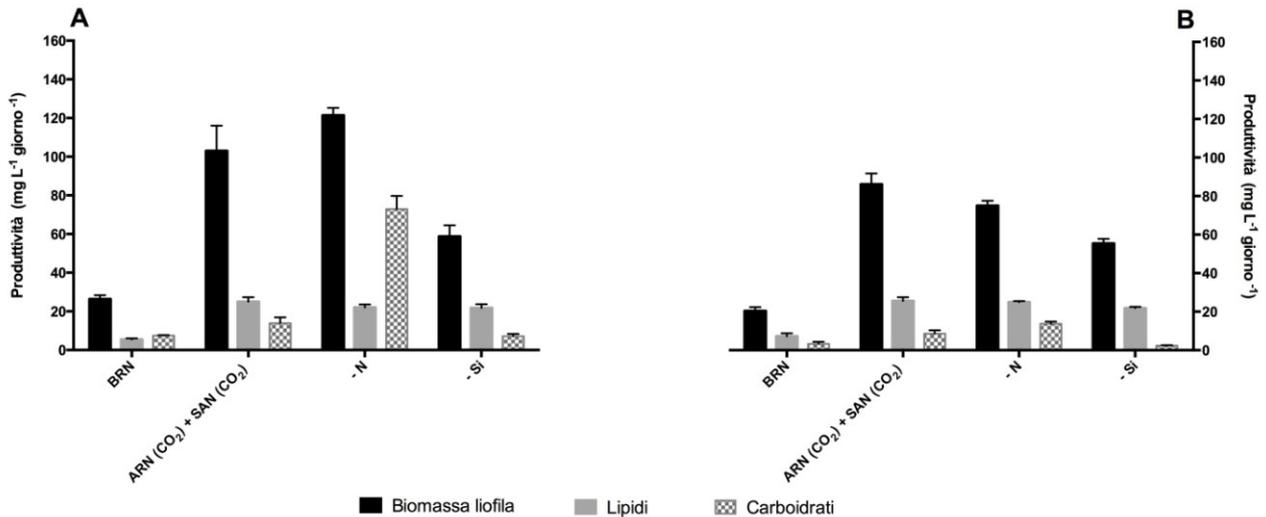


Figura 35 – Produttività di biomassa, lipidi e carboidrati (mg L⁻¹ giorno⁻¹) per (A) *T. weissflogii* e (B) *C. cryptica* cresciute nelle condizioni BRN, ARN (CO₂) + SAN (CO₂) e in deprivazione selettiva

Possiamo affermare che la composizione biochimica delle biomasse delle diatomee e, in particolare, della frazione lipidica dipende dalla specie presa in considerazione, dalle condizioni ambientali, di temperatura, di intensità luminosa e dalla disponibilità di nutrienti. A parità di somministrazione di nutrienti (Basso e Alto Regime di Nutrienti), l'effetto della CO₂ al 10% rispetto alle crescite con aria determina un incremento della biomassa e quindi della produzione di olio.

Le prove sperimentali effettuate hanno permesso di mettere a punto in laboratorio sia per *T. weissflogii* che per *C. cryptica* un protocollo di crescita a due fasi in cui inizialmente si ottengono elevate biomasse con buone percentuali lipidiche e successivamente si verifica una parziale conversione di vari composti chimici in triacilgliceroli.

Questa strategia di crescita si presenta operativamente più applicabile in campo rispetto ad altre metodiche che richiedono il recupero delle cellule e la sostituzione del mezzo esausto con mezzo di coltura fresco deprivato selettivamente di un elemento (Rodolfi *et al.* 2009).

Una strategia di crescita a due fasi con un primo stadio iniziale in presenza di nutrienti sufficienti (per quattro giorni) seguito da una deprivazione di nutrienti (la coltura è centrifugata e il mezzo sostituito con uno stesso volume privo di fonte di azoto) e con, a intermittenza, anche la presenza di CO₂ al 4% è stata provata anche in colture di *Chlorella minutissima*, portando a elevate biomasse

(124 mg L⁻¹) con un alto contenuto di olio (50%) (Tang *et al.* 2011). Ma tali valori, soprattutto di biomassa liofila, sono circa 10 volte più bassi rispetto a quelli ottenuti nelle condizioni migliori messe a punto in questo lavoro di tesi.

Sebbene ulteriori studi su larga scala siano necessari per valutare la produttività in campo di *T. weissflogii* e *C. cryptica*, questi risultati mettono in evidenza le potenzialità delle diatomee per finalità produttive e dimostrano la plasticità del metabolismo di queste microalghe in grado di passare facilmente da una condizione di assenza di olio a un contenuto molto elevato di triacilgliceroli.

4. STUDI METABOLICI – ANALISI LIPIDOMICA

4.1 INTRODUZIONE

4.1.1 Caratteristiche delle componenti lipidiche di base: gli acidi grassi

I lipidi sono una componente essenziale di tutte le cellule dove assolvono funzioni strutturali (membrane biologiche), di regolazione (mediatori e signaling) e, come già discusso in precedenza, funzioni di tipo energetico e di immagazzinamento del carbonio (oli). Per definizione, sono composti insolubili in acqua e possono essere estratti dalle cellule con solventi organici non polari. A differenza degli altri costituenti cellulari (proteine, carboidrati, acidi nucleici) i lipidi sono spesso differenziati sulla base delle loro proprietà fisiche piuttosto che della loro struttura chimica.

Gli acidi grassi sono composti formati da lunghe catene alchiliche che terminano con un residuo carbossilico polare. Per la loro struttura chimica sono molecole anfifiliche e sono costituenti essenziali dei lipidi complessi. Le catene possono essere sature o insature; in questo secondo caso i doppi legami hanno configurazione *cis* e possono variare in numero e posizione (Figura 1) (Nelson e Cox 2014).

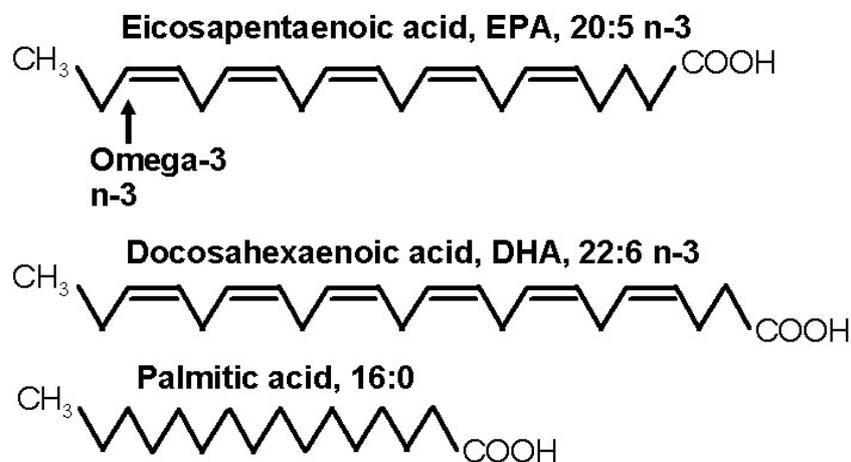


Figura 1 – Esempi di un acido grasso saturo (acido palmitico) e acidi grassi polinsaturi (acido eicosapentaenoico e acido docosaesaenoico)

La nomenclatura più comune richiede di indicare un acido grasso riportando il numero di atomi di carbonio da cui è formato e il numero di insaturazioni. Per esempio, l'acido oleico è indicato come C18:1, mentre l'acido eicosapentaenoico (EPA) è identificato come C20:5. La posizione delle insaturazioni viene detta "n – X" oppure "ω X" in funzione della distanza del carbonio del doppio legame distale (più lontano dal gruppo carbossilico) dal carbonio metile terminale (Nelson e Cox 2014).

Negli organismi fotosintetici, gli acidi grassi più abbondanti sono C16:0 e C16:1 nelle *Bacillariophyceae*; C16:0 e C18:1 nelle *Chlorophyceae*; C16:0 e C18:1 nelle *Euglenophyceae*; C16:0, C16:1 e C18:1 nelle *Chrysophyceae*; C16:0 e C20:1 nelle *Cryptophyceae*; C16:0 e C18:1 nelle *Eustigmatophyceae*; C16:0 e C18:1 nelle *Prasinophyceae*; C16:0 nelle *Dinophyceae*; C16:0, C16:1 e C18:1 nelle *Prymnesiophyceae*; C16:0 nelle *Rhodophyceae*; C14:0, C16:0 e C16:1 nelle *Xanthophyceae* e C16:0, C16:1 e C18:1 nei Cianobatteri (Hu *et al.* 2008).

Gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) contengono due o più doppi legami e, in base al numero, si definiscono dienoici (due doppi legami), trienoici (tre doppi legami), tetraenoici (quattro doppi legami), pentaenoici (cinque doppi legami) ed esaenoici (sei doppi legami). I principali PUFA sono 16:3ω4, 16:4ω1, C20:5ω3 e C22:6ω3 nelle *Bacillariophyceae* (d'Ippolito *et al.* 2005); C18:2 e C18:3ω3 nelle *Chlorophyceae*; C18:2 e C18:3ω3 nelle *Euglenophyceae*; C20:5, C22:5 e C22:6 nelle *Chrysophyceae*; C18:3ω3, 18:4 e C20:5 nelle *Cryptophyceae*; C20:3 e C20:4ω3 nelle *Eustigmatophyceae*; C18:3ω3 e C20:5 nelle *Prasinophyceae*; C18:5ω3 e C22:6ω3 nelle *Dinophyceae*; C18:2, C18:3ω3 e C22:6ω3 nelle *Prymnesiophyceae*; C18:2 e C20:5 nelle *Rhodophyceae*; C16:3 e C20:5 nelle *Xanthophyceae* e C16:0, C18:2 e C18:3ω3 nei Cianobatteri (Hu *et al.* 2008).

Nelle cellule gli acidi grassi non si trovano quasi mai sotto forma di acidi grassi "liberi", ma si trovano esterificati con il glicerolo (glicerolipidi) o con la sfingosina (sfingolipidi). Quando tutte e tre le posizioni sul glicerolo sono esterificate con acidi grassi, come nel caso dei triacilgliceroli,

queste strutture risultano non idonee per le membrane, ma costituiscono invece la principale forma di accumulo di energia nei semi o in altre strutture cellulari. I tre acidi grassi legati al glicerolo possono essere tutti diversi, tutti uguali o solo in parte uguali (Ohlrogge e Browse 1995).

Invece all'interno delle membrane si trovano due classi di lipidi in cui gli acidi grassi si trovano esterificati al glicerolo in posizione *sn*-1 ed *sn*-2, mentre una testa polare è legata alla posizione *sn*-3: sono i glicolipidi e i fosfolipidi di membrana (Figura 2) (Ohlrogge e Browse 1995).

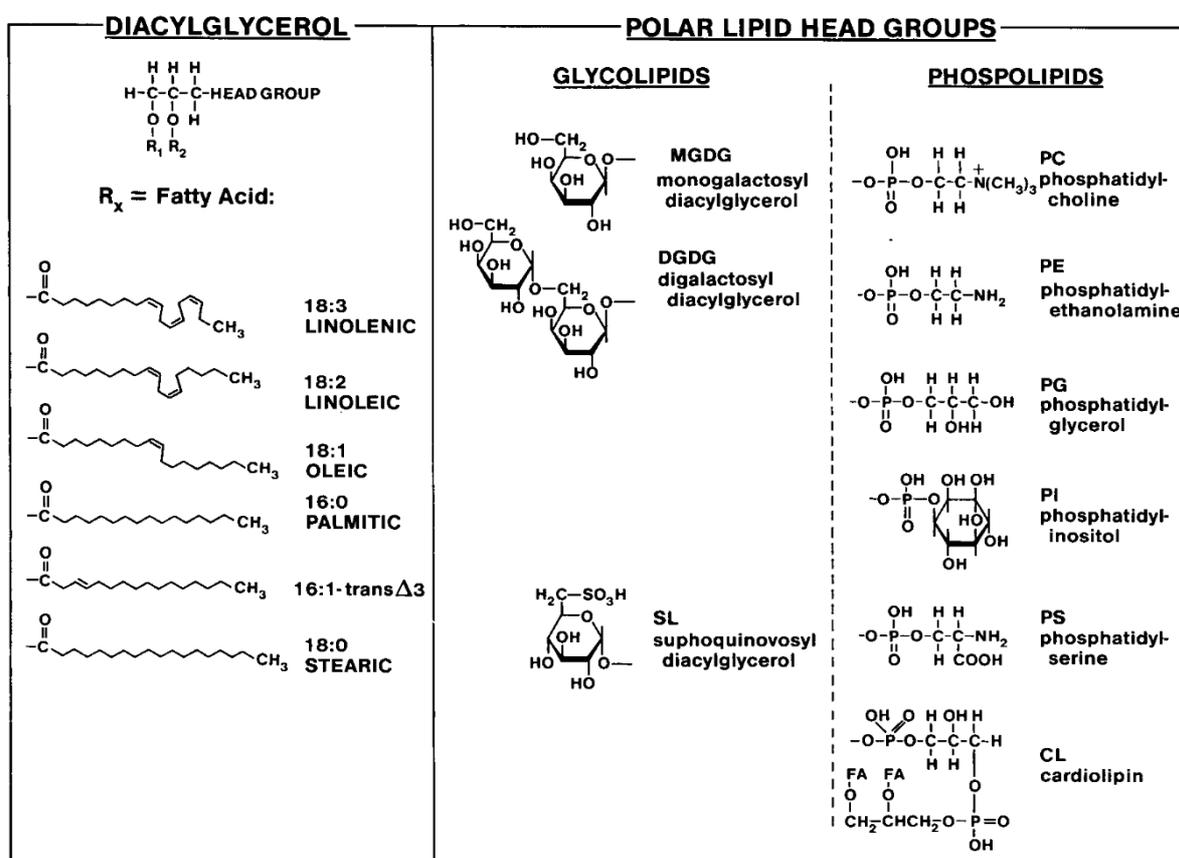


Figura 2 – Caratteristiche strutturali dei diacilgliceroli (Ohlrogge e Browse 1995)

4.1.2 Biosintesi degli acidi grassi

Gran parte delle attuali conoscenze sui geni che codificano per gli enzimi coinvolti nel metabolismo dei lipidi negli organismi fotosintetici si basa sugli studi condotti su *Arabidopsis thaliana*. L'adattamento di queste conoscenze alle microalghe fornisce comunque un quadro approssimato dei processi biochimici che sono coinvolti nel metabolismo lipidico (Liu e Benning 2013).

Anche se senza dubbio *A. thaliana* è il sistema di studio attualmente più diffuso, l'alga verde unicellulare eucariotica *Chlamydomonas reinhardtii* è diventata anch'essa un consolidato modello di riferimento nell'ambito delle microalghe, in quanto il suo genoma è noto, è facilmente manipolabile a livello genico e quindi molti enzimi coinvolti nel metabolismo lipidico in questa specie sono stati identificati sulla base di rapporti di omologia con i più noti enzimi di funghi e piante terrestri. Sono quindi disponibili un gran numero di dati biologici e fisiologici su quest'alga, sebbene non sia tra le migliori specie per la produzione di biocarburanti (Merchant *et al.* 2012; Liu e Benning 2013).

La sintesi degli acidi grassi *de novo* avviene nei cloroplasti. Dal momento che nessuno dei passaggi dell'acetil-coenzima A (acetil-CoA) tra i compartimenti subcellulari può essere dimostrato nelle cellule vegetali, l'acetil-CoA plastidiale è probabilmente l'unico usato per la produzione degli acidi grassi (Li-Beisson *et al.* 2010).

Nelle diatomee le informazioni biosintetiche per l'assemblaggio degli acidi grassi sono ancora limitate e i pochi dati disponibili sono derivati dagli studi sulle poche specie di cui è noto il genoma, ad esempio *T. pseudonana* e *P. tricornutum*. Si ritiene che la sintesi *de novo* degli acidi grassi avvenga principalmente nel cloroplasto con la formazione di composti a 16 e/o 18 atomi di carbonio attraverso un processo iterativo schematicamente rappresentato in Figura 3 (Hu *et al.* 2008).

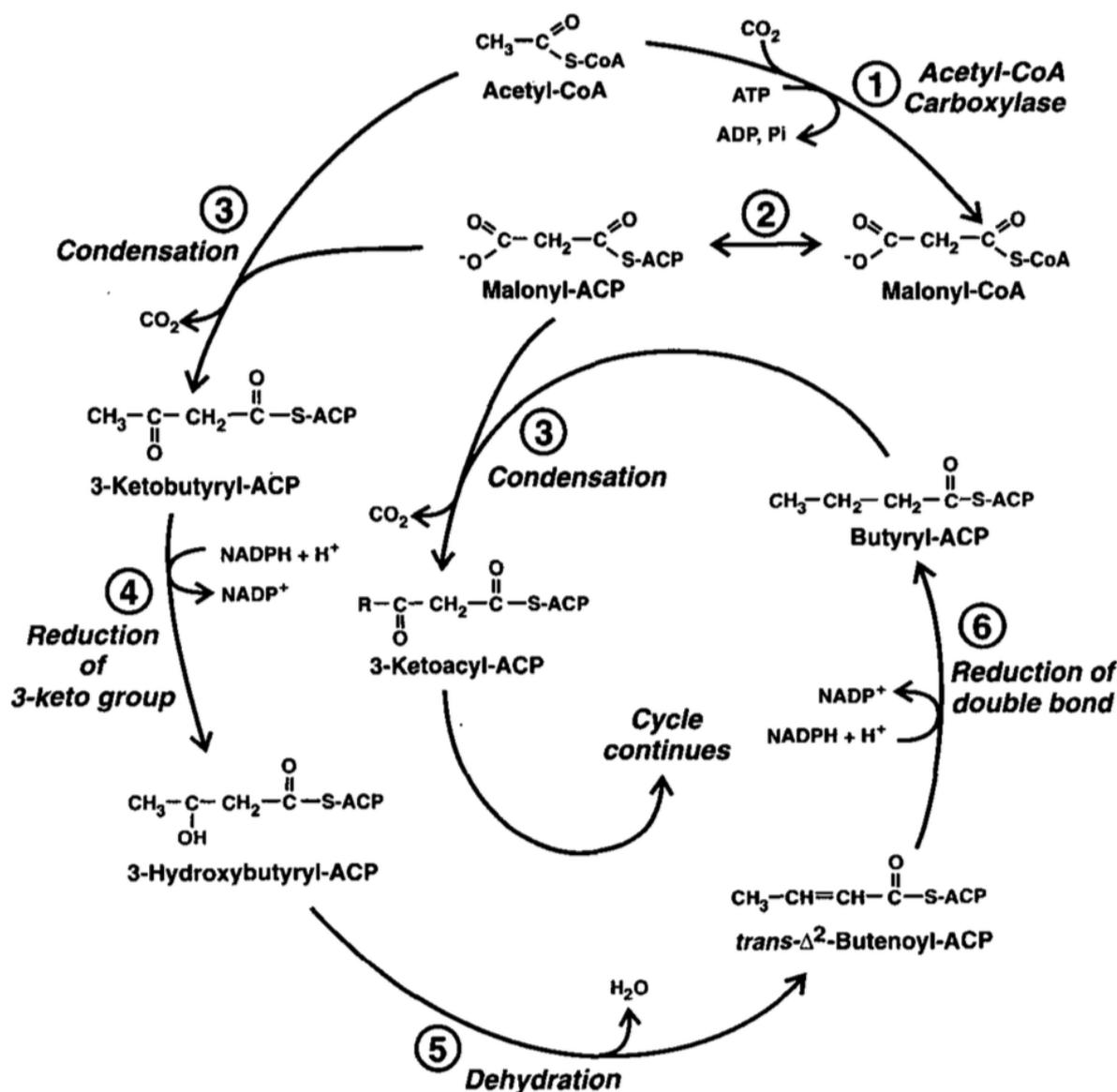


Figura 3 – Schema del susseguirsi delle reazioni di condensazione, riduzione, disidratazione e riduzione tipiche della sintesi e dell’allungamento delle catene degli acidi grassi saturi (Ohlrogge e Browse 1995)

All’interno del loro pathway biosintetico, gli acidi grassi si allungano per condensazione sequenziale di unità a due atomi di carbonio. Come detto precedentemente, durante ogni ciclo di allungamento avvengono quattro reazioni: condensazione, riduzione, disidratazione e riduzione; la sintesi di un acido grasso C16 richiede che il ciclo si ripeta sette volte. Nello specifico, durante il primo passaggio del ciclo la reazione di condensazione è catalizzata dalla chetoacil-ACP sintasi (KAS) III (EC 2.3.1.41). Per gli altri sei giri del ciclo, la reazione di condensazione è catalizzata

dall'isoforma I di KAS; infine, KAS II viene utilizzata durante la conversione da 16:0 a 18:0 (Figura 4) (Li-Beisson *et al.* 2010).

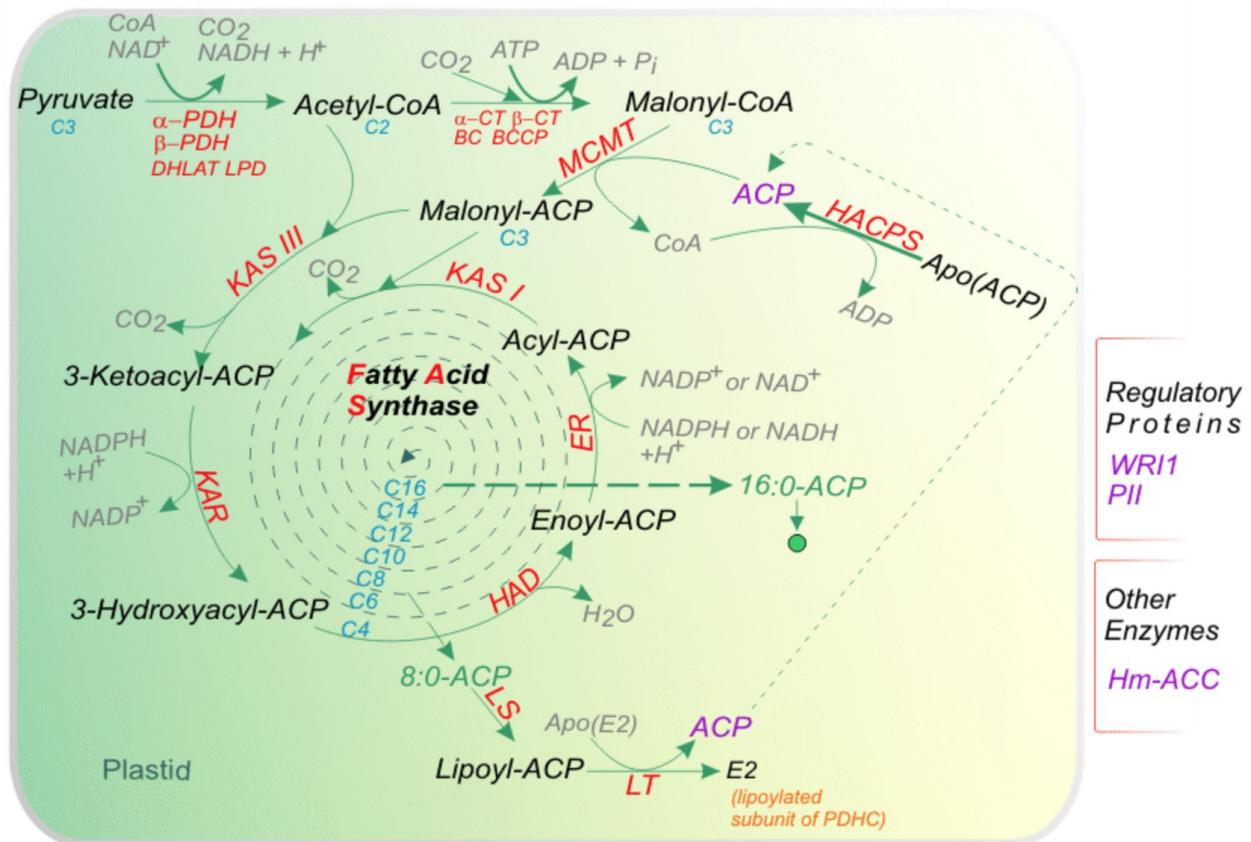


Figura 4 – Schema della sintesi *de novo* e dell'allungamento degli acidi grassi nei plastidi di *A. thaliana*. La piruvato deidrogenasi plastidiale (EC 1.2.4.1) genera l'acetil-coenzima A, che viene utilizzato come unità di base per la costruzione degli acidi grassi. L'ACP (proteina trasportatrice degli acili) è un cofattore in tutte le reazioni (Li-Beisson *et al.* 2010)

4.1.3 Biosintesi dei glicerolipidi di membrana

Le principali vie coinvolte nel metabolismo dei glicerolipidi di membrana sono apparentemente conservate tra *C. reinhardtii* e *A. thaliana* (Ohlrogge e Browse 1995; Li-Beisson *et al.* 2010). Le prime tappe della sintesi dei glicerolipidi polari sono le stesse della via della sintesi dei triacilgliceroli, in quanto vengono esterificati due acidi grassi ai gruppi ossidrilici sugli atomi C-1 e C-2 del glicerolo-3-fosfato (per formare acido fosfatidico).

In generale, i glicerolipidi delle piante possono essere sintetizzati attraverso due vie note come pathway procariotico ed eucariotico. Nel pathway procariotico, acidi 18:1 o 16:1 prodotti nel cloroplasto e legati a un galattolipide sono desaturati con un processo a step fino a formare acidi 16:3 o 18:3 (Figura 5) (Ohlrogge e Browse 1995; Li-Beisson *et al.* 2010). Nel pathway eucariotico, gli acidi 18:1 sono trasportati dal cloroplasto al citoplasma e, dopo esser stati legati alla fosfatidilcolina (PC), sono desaturati a 18:2 e 18:3 in maniera simile a quanto avviene nell'altra via (Figura 6) (Ohlrogge e Browse 1995; Li-Beisson *et al.* 2010). La parte del diacilglicerolo della PC può essere ritrasferita nel cloroplasto per essere legata ad un residuo di galattosio e formare galattolipidi di origine eucariotica. I glicerolipidi procariotici contengono generalmente acidi grassi C16 e C18 legati rispettivamente alle posizioni *sn*-2 e *sn*-1 del glicerolo, mentre i composti eucariotici sono caratterizzati dalla presenza esclusiva di C18 alla posizione *sn*-2. I pathway algali che producono composti simili si ritiene che possano funzionare in maniera analoga anche se la presenza di composti C20 polinsaturi richiede delle variazioni significative rispetto a quanto riportato nelle piante.

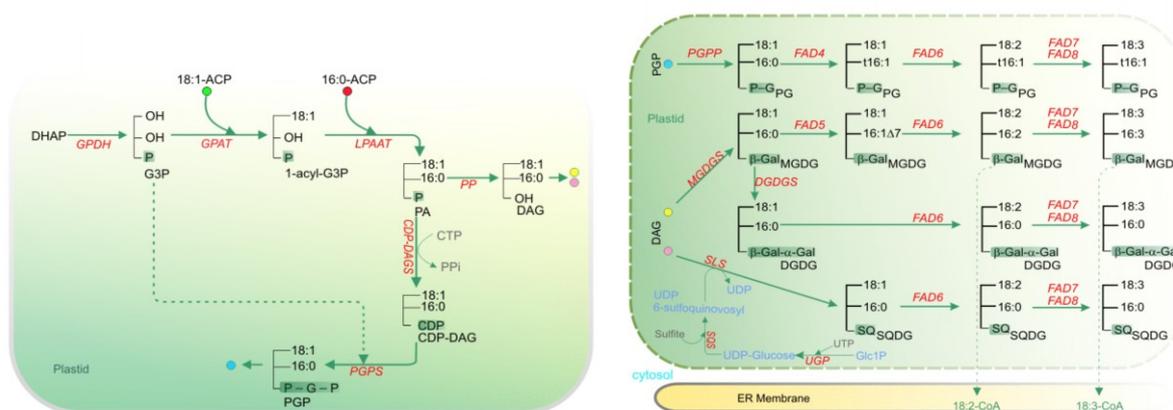


Figura 5 – Sintesi procariotica di galattolipidi, sulfolipidi e fosfolipidi. Abbreviazioni: CDP-DAG, CDP-DAG sintasi; DAG, diacilglicerolo; DHAP, diidrossiacetone fosfato; G3P, glicerolo 3-fosfato; GPAT, glicerolo-3-fosfato aciltransferasi (EC 2.3.1.15); LPA, acido lisofosfatidico; LPAAT, acido lisofosfatidico aciltransferasi (EC 2.3.1.51); PA, acido fosfatidico; PP, PA fosfatasi (EC 3.1.3.4); PGP, fosfatidilglicerolo fosfato; PG, fosfatidilglicerolo (Li-Beisson *et al.* 2010)

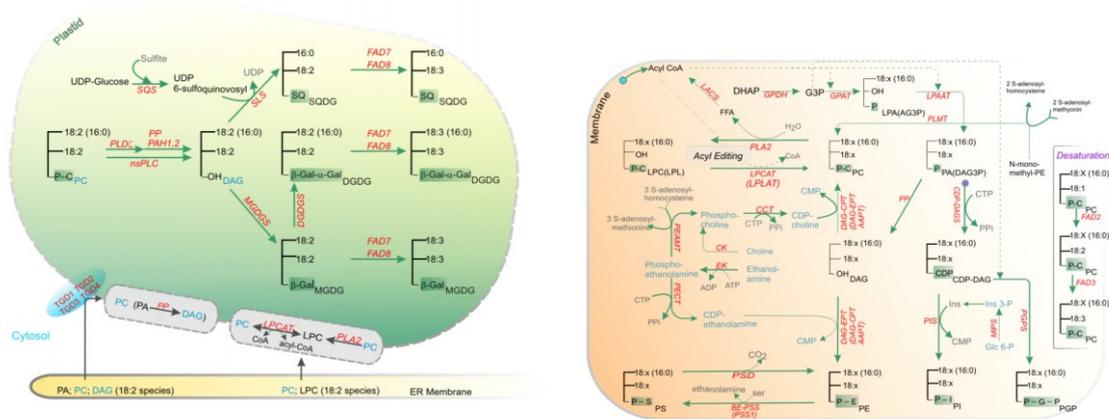


Figura 6 - Pathway eucariotico per la sintesi dei galattolipidi e dei sulfolipidi. Abbreviazioni: DAG, diacilglicerolo; FAD, acido grasso desaturasi (EC 1.14.19.1); LPCAT, lisofosfatidilcolina aciltransferasi (EC 2.3.1.23); nsPLC, fosfolipasi C aspecifiche; PC, fosfatidilcolina; PLD ζ , fosfolipasi D (EC 3.1.-.-); PA, acido fosfatidico; PP, PA fosfatasi (EC 3.1.3.4); PLA2, fosfolipasi A2 (EC 3.1.-.-); TGD1, permeasi della membrana interna del cloroplasto (Li-Beisson *et al.* 2010)

4.1.4 Biosintesi dei lipidi neutri in microalghe e diatomee

Nelle piante la sintesi di grandi quantità di TAG avviene nel reticolo endoplasmatico (RE): acil-CoA di nuova sintesi (in verde in figura 7) sono esportati dal cloroplasto alla membrana del reticolo endoplasmatico (RE). A valle di una serie di reazioni necessarie per aggiungere gli acidi grassi al glicerolo e formare triacilgliceroli (TAG), questi si uniscono per formare goccioline di olio che sono poi rilasciate fuori della membrana del RE. Altre reazioni integrano la sintesi dei TAG con quella della fosfatidilcolina (PC), un importante lipide di membrana (Figura 7) (Li-Beisson *et al.* 2010).

EC 2.3.1.51), da una acido fosfatidico fosfatasi (PAP, EC 3.1.3.4) e da una diacilglicerolo aciltransferasi (DGAT, EC 2.3.1.20). Gli enzimi del pathway Kennedy sono spesso codificati da più copie di geni o sono proteine distinte negli eucarioti (Figura 8) (Coleman e Lee 2004; Hu *et al.* 2008).

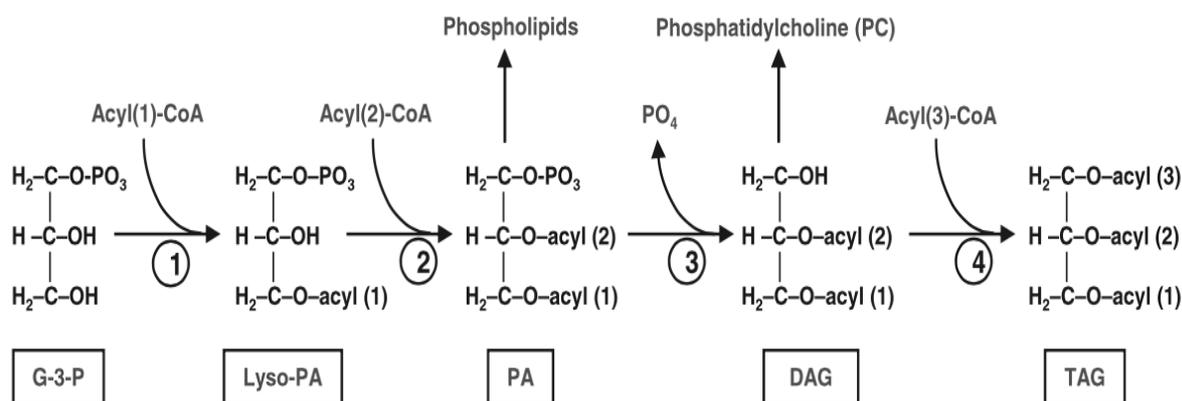


Figura 8 – Schematizzazione dei passaggi enzimatici che portano alla sintesi dei triacilgliceroli: (1) glicerolo-3-fosfato aciltransferasi (EC 2.3.1.15); (2) acido lisofosfatidico aciltransferasi (EC 2.3.1.51); (3) acido fosfatidico fosfatasi (EC 3.1.3.4); (4) diacilglicerolo aciltransferasi (EC 2.3.1.20) (Hu *et al.* 2008)

Nella figura 9 è descritta la via alternativa in *C. reinhardtii*: (1) nel loro insieme l'acetil-CoA carbossilasi (EC 6.4.1.2) e il complesso dell'acido grasso sintasi (FAS, EC 2.3.1.85) sono responsabili della sintesi degli acil-CoA dall'acetil-CoA sia nei cloroplasti che nel citosol; (2) la sintesi dei DAG da glicerolo-3-fosfato e acil-CoA richiede due aciltransferasi e una fosfatasi: le prime due sono la glicerolo-3-fosfato aciltransferasi (GPAT, EC 2.3.1.15) e la lisofosfatidil aciltransferasi (LPAT, EC 2.3.1.23). Anche questo insieme di reazioni può verificarsi nei cloroplasti e nel citosol; (3) la diacilglicerolo aciltransferasi di tipo 1 e tipo 2 (EC 2.3.1.20) è presente in *C. reinhardtii*; (4) al pathway di transesterificazione per la sintesi dei TAG contribuisce anche la fosfolipide:diacilglicerolo aciltransferasi (PDAT, EC 2.3.1.158); (5) i lipidi di membrana possono essere convertiti in TAG (Merchant *et al.* 2012).

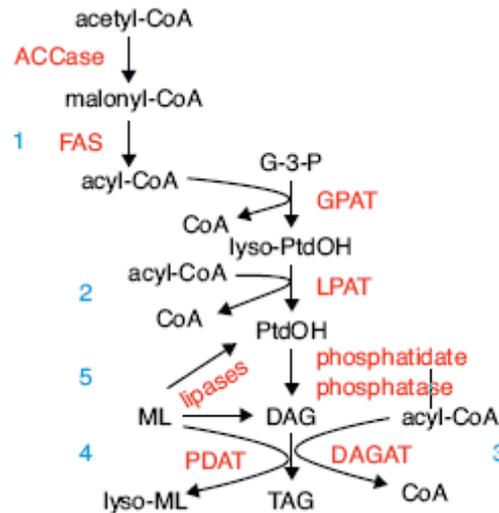


Figura 9 - Metabolismo alternativo per la sintesi dei TAG in *C. reinhardtii* (Merchant *et al.* 2012)

In un recente studio su *C. reinhardtii*, cresciuta in deprivazione di azoto, è stato ipotizzato che una grande frazione dei TAG sia assemblata *de novo* in pathway presenti all'interno del cloroplasto. A conferma di questo processo, è stato osservato che, a seguito di un trattamento dei triacilgliceroli con lipasi, la posizione *sn*-2 del TAG è in gran parte occupata da acidi grassi a 16 atomi di carbonio in accordo con la via biosintetica procariotica (Figura 10). Inoltre, immagini al microscopio elettronico delle cellule di *C. reinhardtii* mostrano l'accumulo di grandi gocce lipidiche all'interno dei cloroplasti (Liu e Benning 2013).

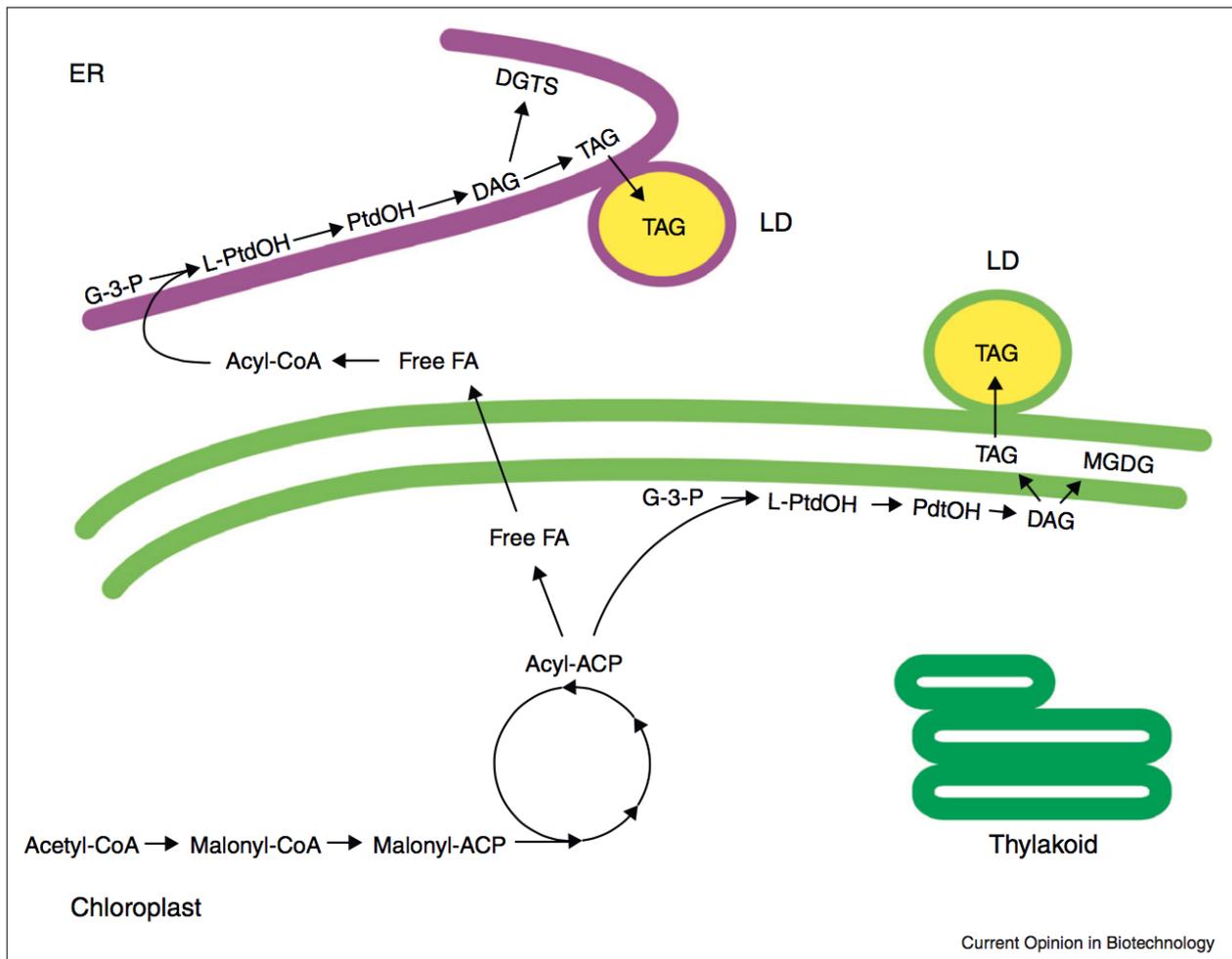


Figura 10 - Ipotesi per la biosintesi dei TAG in *C. reinhardtii*. Abbreviazioni: ACP, proteina trasportatrice degli acili; CoA, coenzima A; DAG, diacilglicerolo; DGDG, digalattosildiilglicerolo; DGTS, diacilgliceril-N,N,N-trimetil omoserina; FA, acido grasso; G-3-P, glicerolo-3-fosfato; LD, goccia lipidica; L-PtdOH, acido lisofosfatidico; MGDG, monogalattosildiilglicerolo; PtdGro, fosfatidilglicerolo; PtdOH, acido fosfatidico; SQDG, sulfoquinosildiilglicerolo; TAG, triacilglicerolo (Liu e Benning 2013)

Nella maggior parte delle alghe i TAG sono composti principalmente da acidi grassi C14-C18 saturi o monoinsaturi. Acidi grassi polinsaturi a catena molto lunga (>C20) (PUFA) sono comunque ricorrenti in molte microalghe verdi come *Nannochloropsis oculata* (*Eustigmatophyceae*) e nelle diatomee (*Bacillariophyceae*) (Hu *et al.* 2008).

Come riportato nel capitolo 3, anche se la produzione dei TAG è una caratteristica intrinseca delle specie, le microalghe hanno una spiccata plasticità metabolica e le quantità di TAG possono essere influenzate da fattori abiotici e biotici.

Le conoscenze attuali sulla risposta delle diatomee a questi stimoli sono molto ridotte e per lo più limitate ad osservazioni fenomenologiche.

Yu *et al.* (2009) ha osservato che il contenuto dei TAG nelle cellule di *T. pseudonana* poste in deprivazione da silice è risultato maggiore (24%) rispetto al contenuto cellulare della stessa specie cresciuta in carenza di nitrati, anche se le specie molecolari dei TAG prodotti sono simili.

Yongmanitchai e Ward (1991) invece hanno riportato che nella diatomea *P. tricornutum* una leggera condizione di deprivazione da silicio stimola una diminuzione del contenuto di EPA, mentre la produzione di questo acido grasso risulta aumentata da alte concentrazioni di nitrati.

Un altro studio ha dimostrato che l'arresto del ciclo cellulare di *P. tricornutum* mediante un inibitore delle chinasi ciclina-dipendente 1 e 2 aumenta il contenuto cellulare di TAG di circa quattordici volte (Levitan *et al.* 2014). Anche *T. pseudonana* mostra un rapido accumulo di lipidi in presenza di un inibitore della formazione dei microtubuli (Levitan *et al.* 2014).

4.1.5 Obiettivi dell'attività sperimentale: analisi qualitativa e quantitativa delle varie classi lipidiche mediante Cromatografia Liquida ad Ultra Alta Prestazione/Spettrometria di Massa ad Alta Risoluzione (UHPLC/HRMS)

La specie utilizzata per approfondire gli studi metabolici è stata *C. cryptica*. Gli estratti lipidici sono stati analizzati mediante Cromatografia Liquida ad Ultra Alta Prestazione/Spettrometria di Massa ad Alta Risoluzione (UHPLC/HRMS) al fine di valutarne la specifica composizione in acidi grassi, i loro accoppiamenti ed eventuali variazioni all'interno delle singole classi lipidiche nelle diverse condizioni di crescita. La condizione di insufflazione con sola aria è stata usata come controllo per la condizione CO₂, al fine di verificare l'effetto di questo gas sui pool lipidici. A sua volta la condizione CO₂ è stata usata come controllo per i campioni -Si e -N, per valutare l'effetto delle deprivazioni selettive, sempre in presenza di CO₂, sulle varie specie lipidiche.

Le quattro condizioni di crescita utilizzate sono quelle qui di seguito descritte (Tabelle 1 e 2):

- unica fase di crescita con aggiunta dosata e quotidiana dei nutrienti e insufflazione con aria (CO₂ allo 0.04%) (condizione definita a Regime Controllato di Nutrienti, Aria);
- unica fase di crescita con aggiunta dosata e quotidiana dei nutrienti e insufflazione con CO₂ al 10% per sette ore al giorno durante la fase luminosa del fotoperiodo per tutta la durata della curva di crescita (condizione definita a Regime Controllato di Nutrienti con CO₂ al 10%, CO₂);
- doppia fase di crescita in cui nella prima fase (7 giorni) è stato applicato il protocollo con aggiunta dosata e quotidiana dei nutrienti e nella seconda fase di deprivazione selettiva (7 giorni) è stato eliminato un solo macroelemento del mezzo di crescita (silicio). Le colture sono state insufflate con CO₂ al 10% per sette ore al giorno per tutto il periodo di crescita (condizione definita –Si);
- doppia fase di crescita in cui nella prima fase (7 giorni) è stato applicato il protocollo con aggiunta dosata e quotidiana dei nutrienti e nella seconda fase di deprivazione selettiva (7 giorni) è stato eliminato un solo macroelemento del mezzo di crescita (azoto). Le colture sono state insufflate con CO₂ al 10% per sette ore al giorno per tutto il periodo di crescita (condizione definita –N).

Gli estratti lipidici sono stati ottenuti dalle biomasse recuperate sia a metà (G7) che alla fine della curva di crescita (G14).

Tabella 1 - Schema riassuntivo delle tipologie di crescita a cui è stata sottoposta la specie modello *C. cryptica* per i successivi studi di lipidomica: la condizione Aria è usata come controllo per la prova CO₂. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato

PROVA	DURATA (Giorni)	TIPO DI ESPERIMENTO	PROCEDURA ESPERIMENTO	
			Aggiunta Nutrienti	Insufflazione
Regime Controllato dei Nutrienti (Aria) <u>Controllo</u>	14	Unica Fase	Aggiunta dosata dei nutrienti tutti i giorni	Aria
Regime Controllato di Nutrienti + CO ₂ (CO ₂)	14	Unica Fase	Aggiunta dosata dei nutrienti tutti i giorni	Aria + 10% di CO ₂

Tabella 2 - Schema riassuntivo delle tipologie di crescita a cui è stata sottoposta la specie modello *C. cryptica* per i successivi studi di lipidomica: la condizione CO₂ è usata come controllo per le prove di deprivazione selettiva -N e -Si. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato

PROVA	DURATA (Giorni)	TIPO DI ESPERIMENTO	PROCEDURA ESPERIMENTO	
			Aggiunta Nutrienti	Insufflazione
Regime Controllato di Nutrienti + CO ₂ (CO ₂) <u>Controllo</u>	14	Unica fase	Aggiunta dosata dei nutrienti tutti i giorni	Aria + 10% di CO ₂
Deprivazione selettiva (- N)	14	Doppia Fase	I Fase: Aggiunta dosata dei nutrienti per i primi 7 giorni. II Fase: Sospensione Aggiunta NaNO ₃ per i secondi 7 giorni	I Fase: Aria + 10% di CO ₂ - II Fase: Aria + 10% di CO ₂
Deprivazione selettiva (- Si)	14	Doppia Fase	I Fase: Aggiunta dosata dei nutrienti per i primi 7 giorni. II Fase: Sospensione Aggiunta Na ₂ SiO ₃ per i secondi 7 giorni	I Fase: Aria + 10% di CO ₂ - II Fase: Aria + 10% di CO ₂

4.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

PARTE I – CONFRONTO CO₂ vs ARIA

4.2.1 *Analisi degli andamenti e della composizione biochimica delle biomasse di C. cryptica nelle condizioni di crescita Aria e CO₂*

4.2.1.1 *Andamento delle curve di crescita e analisi biochimiche della biomassa*

Per poter valutare l'effetto della CO₂ sulla distribuzione dei pool lipidici, le cellule sono state cresciute in un Regime Controllato di Nutrienti per 14 giorni, con insufflazione di aria (Controllo) e con insufflazione di CO₂ al 10% (CO₂). Gli andamenti delle conte cellulari, espresse come cell mL⁻¹, sono mostrati in figura 11. In presenza di una maggiore quantità di C da fissare (CO₂ al 10%) sono state raggiunte densità cellulari maggiori rispetto alla crescita in presenza di sola aria (CO₂ allo 0.04%).

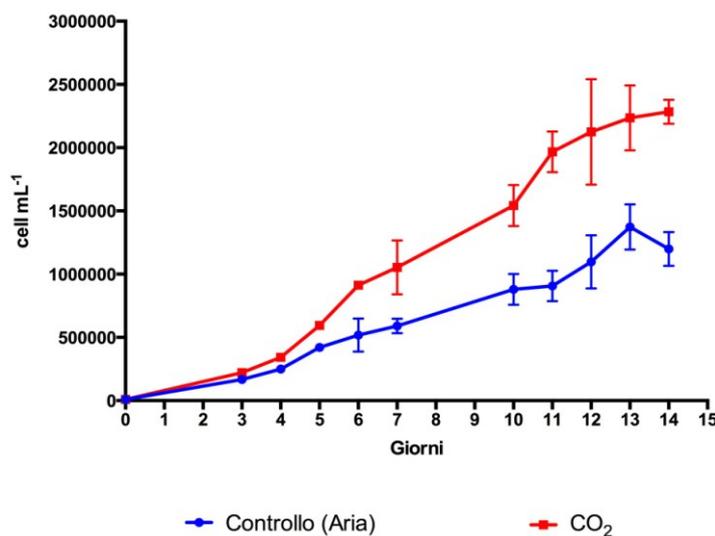


Figura 11 – Andamento delle curve di crescita nelle condizioni Aria e CO₂

L'analisi dell'andamento della produzione di biomassa e lipidi ha mostrato che i valori più alti sono stati ottenuti nella prova CO₂, che ha raggiunto valori di biomassa liofila pari al doppio di quelli del

controllo con aria (Figura 12); analogamente, anche la produzione di lipidi (mg L^{-1}) è più che raddoppiata in presenza del 10% di CO_2 rispetto al controllo con aria (Figura 12).

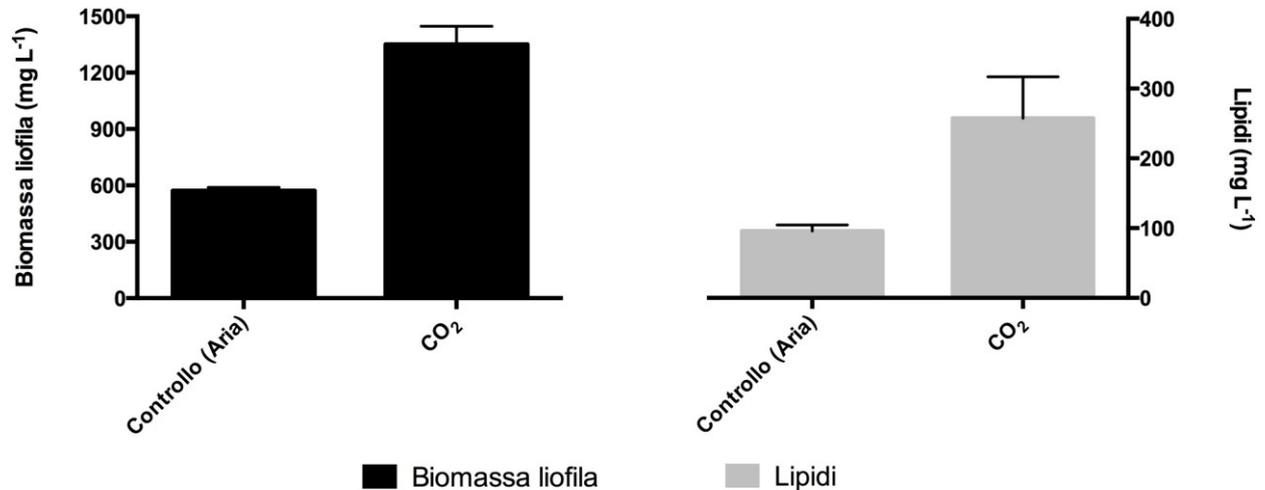


Figura 12 – Valori in biomassa liofila e produzione lipidica (mg L^{-1}) ottenute nelle condizioni di crescita definite Aria e CO_2

Dall'analisi dei dati biochimici è possibile osservare come nel caso delle condizioni di crescita Aria e CO_2 la ripartizione biochimica si sia mantenuta tendenzialmente costante, con una predominanza di proteine su lipidi e carboidrati, sia a metà delle curve (G7) che a fine crescita (G14) (Figura 13). Inoltre al termine della curva di crescita si ottiene un ulteriore incremento delle percentuali di lipidi e proteine a scapito dei carboidrati (Figura 13).

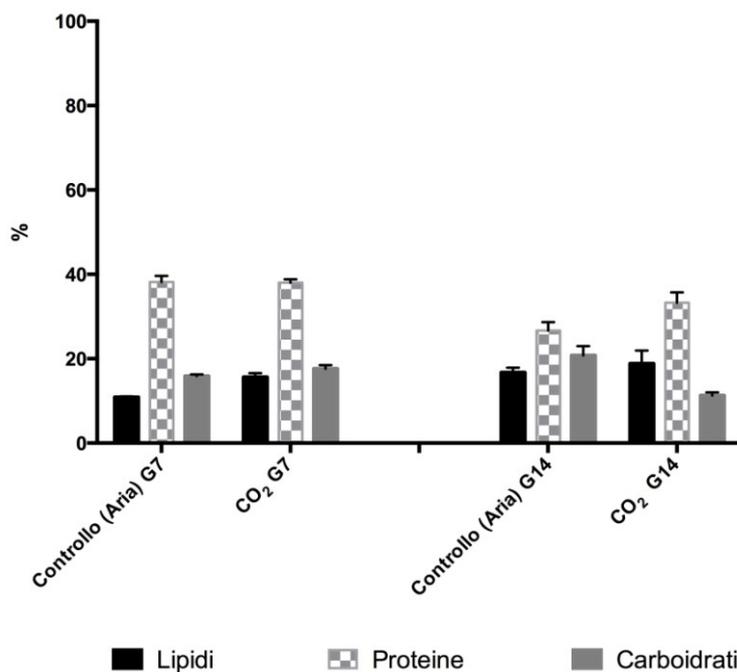


Figura 13 – Andamento percentuale di lipidi, proteine e carboidrati nell’ambito della biomassa recuperata a metà e alla fine delle crescite delle condizioni descritte in Tabella 1

4.2.1.2 Analisi elementare (CHNS), TOC (Carbonio Organico Totale) e Tasso di fissazione della CO₂ (P_{CO_2})

Parallelamente alle analisi biochimiche, sono state effettuate analisi per quantificare i principali elementi (CHNS) presenti nelle biomasse liofile; per il carbonio è stata fatta anche l’analisi del Carbonio Organico Totale (TOC), analogamente a quanto fatto per le prove descritte nel capitolo 3. Nella tabella 3 si possono osservare i valori percentuali degli elementi analizzati: nelle condizioni saggate N, H e S sono presenti in concentrazioni paragonabili che variano tra 4 - 5% per N e H e circa 1% per S.

Per quanto riguarda il C, i risultati ottenuti hanno mostrato che i valori percentuali dei campioni analizzati con e senza trattamento con acido cloridrico (HCl, analisi TOC) sono simili, per cui i valori della biomassa liofila sono reali perché non alterati in eccesso dalla presenza di precipitati di bicarbonato.

Le analisi hanno mostrato percentuali di carbonio comprese tra il 24% e il 40% circa con variazioni che dipendono dalle condizioni di crescita e che mostrano un leggero incremento alla fine della

curva di crescita. Da notare come le percentuali di C nella biomassa siano più basse nella prova effettuata con la sola insufflazione di aria (CO₂ allo 0.04%) rispetto alla prova condotta con insufflazione di CO₂ al 10%.

Tabella 3 – Risultati delle analisi CHNS che mostrano il contenuto percentuale dei vari elementi nelle biomasse di *C. cryptica* provenienti dalle condizioni di crescita definite Aria e CO₂; i dati del carbonio sono quelli derivanti dall'analisi TOC. P_{CO2} (mg L⁻¹ giorno⁻¹) è un parametro che indica il tasso di fissazione della CO₂. Tutte le prove sono state effettuate in triplicato

	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	P _{CO2} (mg L ⁻¹ giorno ⁻¹)
Aria (G14)	30.9 ± 1.3	5.1 ± 0.1	4.4 ± 0.2	0.8 ± 0.01	46.8 ± 2.9
CO₂ (G14)	37.3 ± 1.1	5.2 ± 0.8	5.2 ± 1.4	0.8 ± 0.08	133.3 ± 12.0

L'insufflazione di CO₂ ha portato ad ottenere quantità di C fissato (P_{CO2}) tre volte maggiori rispetto ai corrispettivi campioni con aria (Tabella 3), in accordo con il notevole incremento di biomassa che si ottiene in presenza di CO₂ al 10%.

4.2.1.3 Analisi NMR per la determinazione lipidica

Nelle condizioni Aria e CO₂ al 10% le percentuali di TAG sono state di circa 28% e 49%, rispettivamente. In tutte le prove i livelli di lipidi strutturali (GL + PL) sono stati significativi, con una generale predominanza dei PL sui GL.

I dati quantitativi espressi in nmoli ottenuti dall'analisi ¹H-NMR sono stati utilizzati per determinare il quantitativo complessivo di ciascuna classe lipidica per cellula (Figura 14). Come si può osservare, nei vari campioni le classi più abbondanti sono rappresentate dai PL in crescite con aria e dai TAG in presenza di CO₂, confermando come questo gas climalterante sia in grado di stimolare l'aumento dello storage lipidico. I livelli in ciascuna cellula di MGDG, DGDG e SQDG rimangono invece pressochè inalterati.

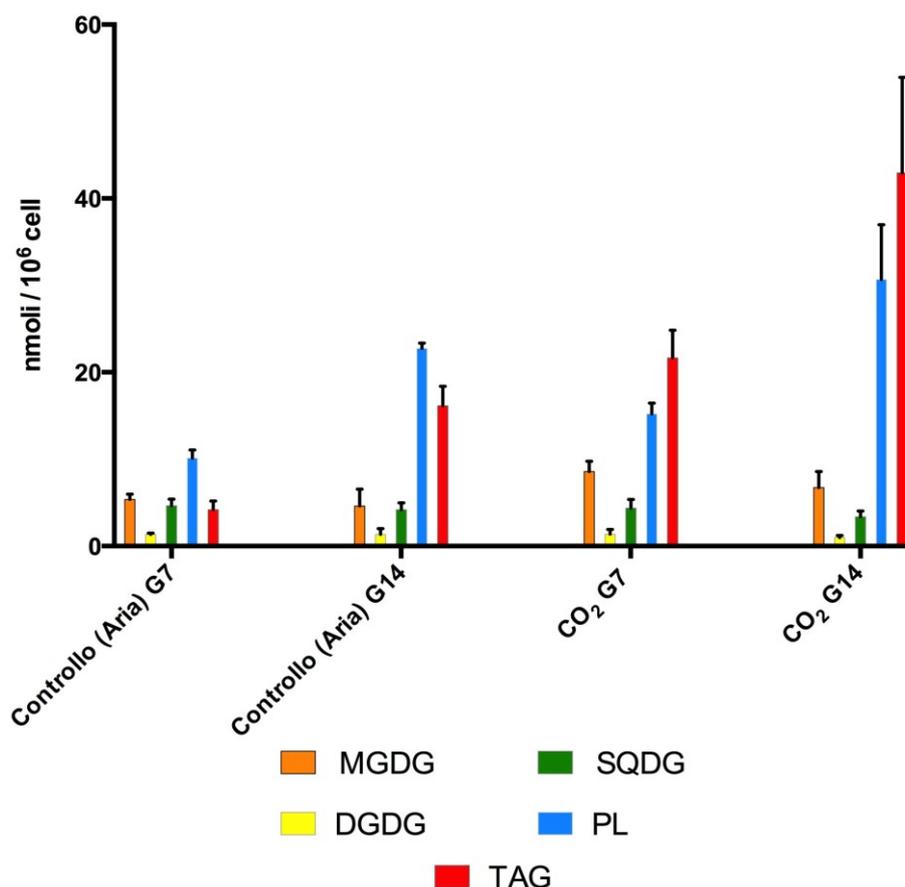


Figura 14 – Quantità di ciascuna classe lipidica (MGDG, DGDG, SQDG, PL e TAG) presente negli estratti di *C. cryptica* cresciuta nelle condizioni Aria e CO₂. I dati sono espressi in nmoli x 10⁶ cell⁻¹

4.2.2 Analisi lipidomica: determinazione della composizione e della variazione in acidi grassi delle singole specie delle varie classi lipidiche di *C. cryptica*

La tecnica applicata è la Cromatografia Liquida ad Ultra Alta Prestazione accoppiata con Spettrometria di Massa ad Alta Risoluzione (UHPLC/HRMS). La tecnica combina la separazione cromatografica con l'analisi di massa e massa/massa per l'identificazione dei composti. Nel corso dello studio, i galattolipidi, i triacilgliceroli e gran parte dei fosfolipidi sono stati osservati in modalità positiva (ESI⁺), mentre gli SQDG e i fosfatidilgliceroli sono stati analizzati come ioni negativi (ESI⁻). La figura 15 riporta la distribuzione di queste forme sul cromatogramma di eluizione.

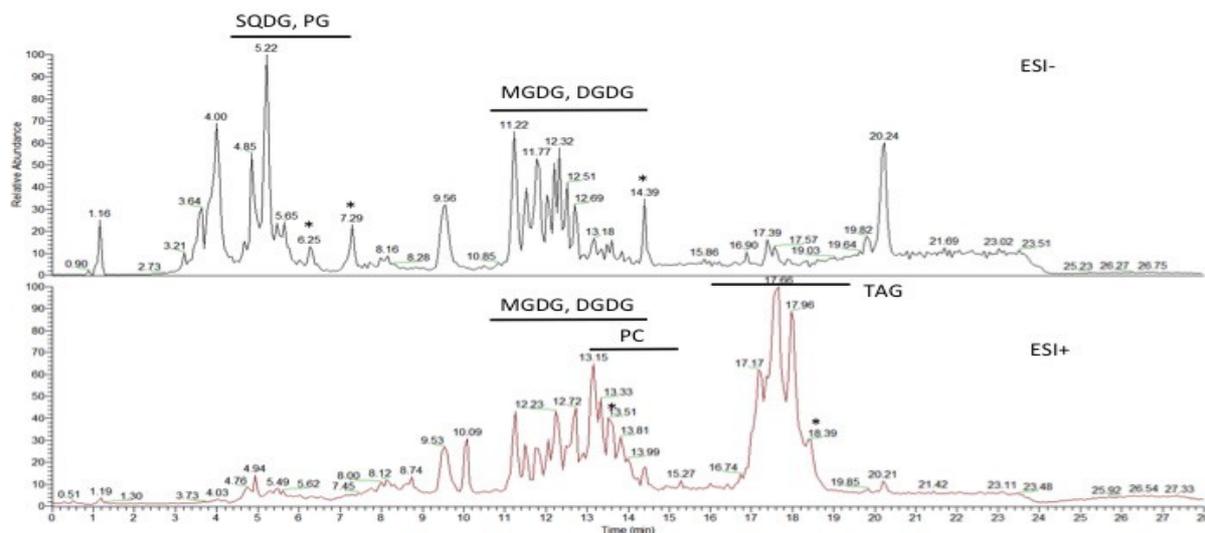


Figura 15 – Tipico spettro di analisi di massa che mostra che gli MGDG, DGDG, SQDG e PG sono stati individuati in modalità ESI⁻; invece la modalità ESI⁺ serve per individuare MGDG, DGDG, PC e TAG (Cutignano *et al.*, sottomesso)

Sono stati analizzati gli estratti lipidici, contenenti quantità note di standard interno, di biomasse di *C. cryptica* cresciuta nelle condizioni descritte nelle tabelle 1 e 2 e recuperate sia a metà che al termine della curva di crescita. Questa tecnica di indagine ha permesso di identificare le singole specie chimiche che compongono le differenti classi lipidiche (SQDG – DGDG – MGDG – PC – PG – TAG), definendo la composizione degli acidi grassi e le assegnazioni regiochimiche ottenute mediante analisi dei picchi di frammentazione.

Un totale di 92 specie lipidiche maggioritarie sono state assegnate e ripartite tra le varie classi come mostrato in tabella 4.

Tabella 4 – Specie lipidiche individuate per ciascuna classe lipidica e indicate con il numero di atomi di carbonio e di insaturazioni totali delle catene aciliche

<u>CLASSE</u>	<u>FA</u>
<u>SQDG</u>	30:0 - 30:1 - 32:1 - 32:2
<u>MGDG</u>	30:1 - 30:3 - 32:1 - 32:2 32:3 - 32:4 - 32:5 - 32:6 32:7 - 34:4 - 34:5 - 34:6 34:7 - 34:8 - 36:6 - 36:7 36:8 - 36:9 - 40:10
<u>DGDG</u>	30:1 - 32:1 - 32:2 - 32:3 32:4 - 36:6 - 36:7 - 36:8 38:9
<u>PC</u>	32:1 - 32:6 - 34:1 - 34:2 34:5 - 36:2 - 36:5 - 38:6 38:7 - 38:8 - 40:9 - 40:10 42:11
<u>PG</u>	30:0 - 30:1 - 32:0 - 32:1 32:2 - 34:1 - 34:2 - 36:2 36:5 - 36:6 - 38:9
<u>TAG</u>	44:1 - 46:1 - 46:2 - 46:3 46:4 - 48:1 - 48:2 - 48:3 48:4 - 48:6 - 50:1 - 50:2 50:3 - 50:4 - 50:6 - 50:7 52:2 - 52:4 - 52:5 - 52:6 52:7 - 52:8 - 54:6 - 54:7 54:8 - 54:9 - 54:10 - 56:1 56:2 - 56:9 - 56:11 - 58:11 58:12 - 58:13 - 58:14 62:16

L'analisi dei dati di spettrometria di massa è stata abbinata ad un approccio statistico al fine di valutare la significatività delle variazioni ottenute tra le varie catene aciliche nelle quattro condizioni di crescita a cui *C. cryptica* è stata sottoposta. A questo fine è stata condotta una Cluster Analysis (una tecnica di analisi multivariata) attraverso la quale è stato possibile raggruppare le unità statistiche (specie lipidiche) in modo da minimizzare la “lontananza logica” interna a ciascun gruppo e di massimizzare quella tra i gruppi. La “lontananza logica” è stata quantificata definendo opportune metriche come misure di similarità/dissimilarità definite tra le unità statistiche.

Nello specifico, i valori di \log_2 fold change sono stati calcolati come il \log_2 del rapporto delle percentuali relative di ciascuna specie all'interno della sua classe lipidica. I confronti sono stati fatti o nell'ambito della singola tipologia di crescita a tempi diversi (G14 in confronto a G7) o tra tutte le condizioni sperimentali al giorno finale della curva di crescita, considerando la condizione Aria di riferimento per quella CO₂ e quest'ultima di controllo per le deprivazioni selettive (-N e -Si). La significatività ($*p < 0.05$ e $**p < 0.001$) per ogni valore è stata calcolata effettuando un *t* test su ciascun misura ottenuta nelle diverse condizioni di crescita con i relativi controlli.

La figura 16 è la heatmap che mostra le variazioni, espresse come \log_2 fold change, delle varie componenti lipidiche sia come confronto in ciascuna coltura (Aria e CO₂) tra il proprio giorno finale della curva e il giorno intermedio che tra i giorni finali delle due condizioni di crescita. Le specie lipidiche sono raggruppate in modo da minimizzare la loro “lontananza logica” interna e massimizzare quella tra i gruppi.

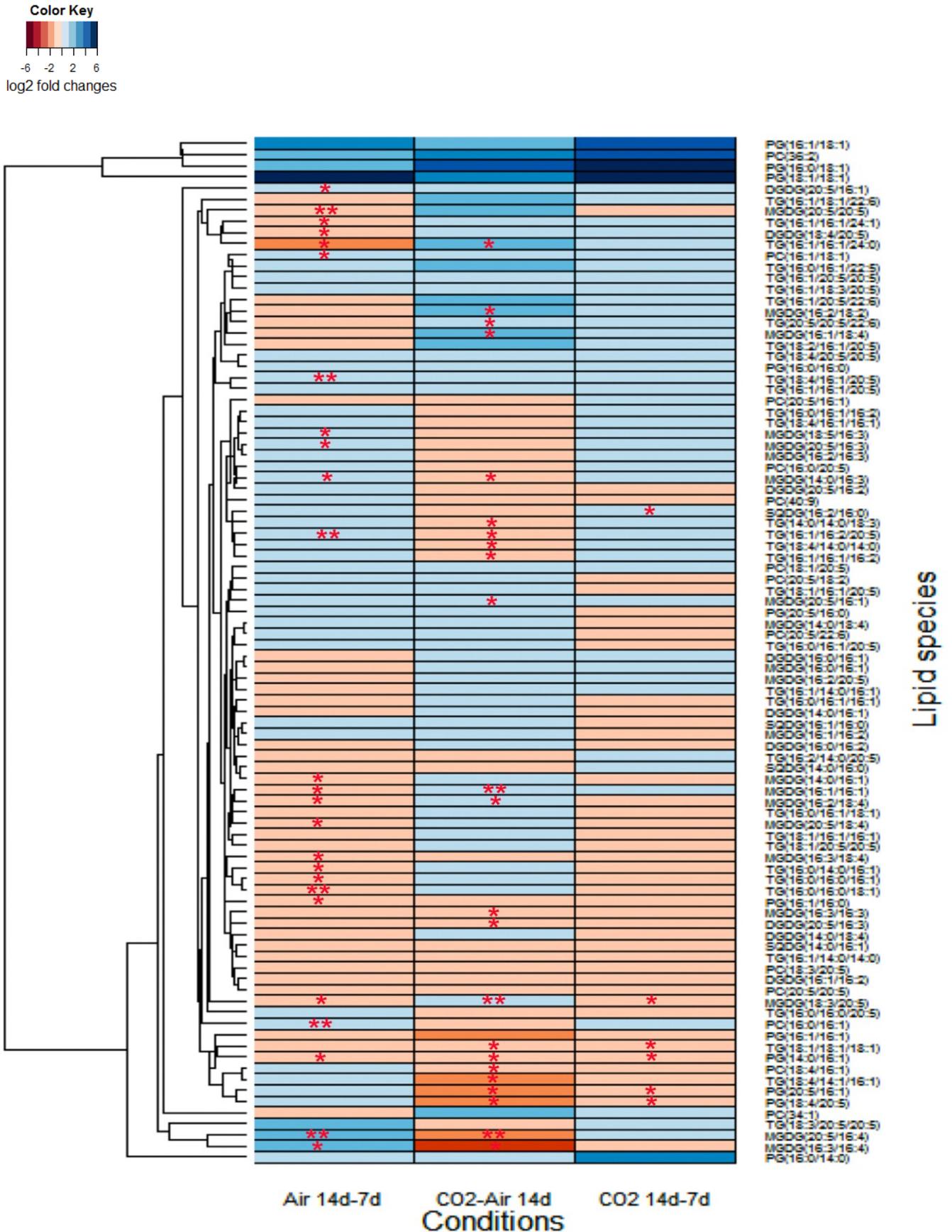


Figura 16 – Heatmap basata sui valori di log₂ fold change per le condizioni sperimentali Aria e CO₂. La singola stellina indica valori di significatività da *t*-test con *p*-value < 0.05; due stelline indicano *p*-value < 0.001

I dati di lipidomica confermano i risultati precedenti e dimostrano un aumento quantitativo di tutte le componenti lipidiche in presenza di CO₂ rispetto alle prove in presenza di sola aria. Dalle analisi è anche evidente che queste variazioni riguardano selettivamente alcune specie chimiche e specifiche catene aciliche. In generale, in tutte le prove, le classi lipidiche maggiormente influenzate da un punto di vista qualitativo nelle variazioni sono state i lipidi di membrana, in particolare MGDG e i PG, sui quali ci siamo di seguito maggiormente soffermati.

Confrontando le condizioni con insufflazione di aria e CO₂ al giorno finale delle loro condizioni di crescita (G14), è possibile osservare alcune variazioni qualitative presumibilmente attribuibili all'effetto dell'anidride carbonica. In particolare per quanto riguarda la classe degli MGDG si nota un aumento delle insaturazioni totali ed un incremento delle specie chimiche con C18 in posizione *sn*-2 (quindi percorso di sintesi di tipo eucariotico) (Figura 17) (Ohlrogge e Browse 1995; Li-Beisson *et al.* 2010). Quest'ultima caratteristica è osservabile anche con i fosfatidilgliceroli, una delle due specie di fosfolipidi maggioritarie in *C. cryptica*, in cui si nota anche la riduzione della lunghezza delle catene aciliche e delle insaturazioni totali (Figura 18).

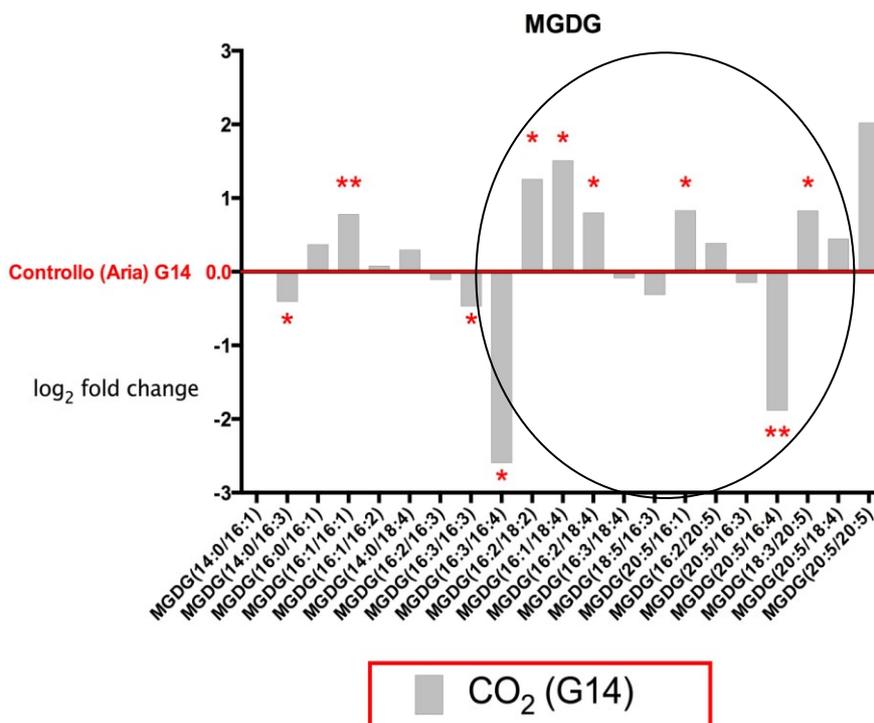


Figura 17 – Grafico che mostra le variazioni, sia in aumento che diminuzione, espresse con i log₂ fold change, dei livelli percentuali delle singole specie all'interno degli MGDG nelle condizioni CO₂ e Aria, usata come controllo. Le stelline indicano le variazioni statisticamente significative e riportate anche nella heatmap

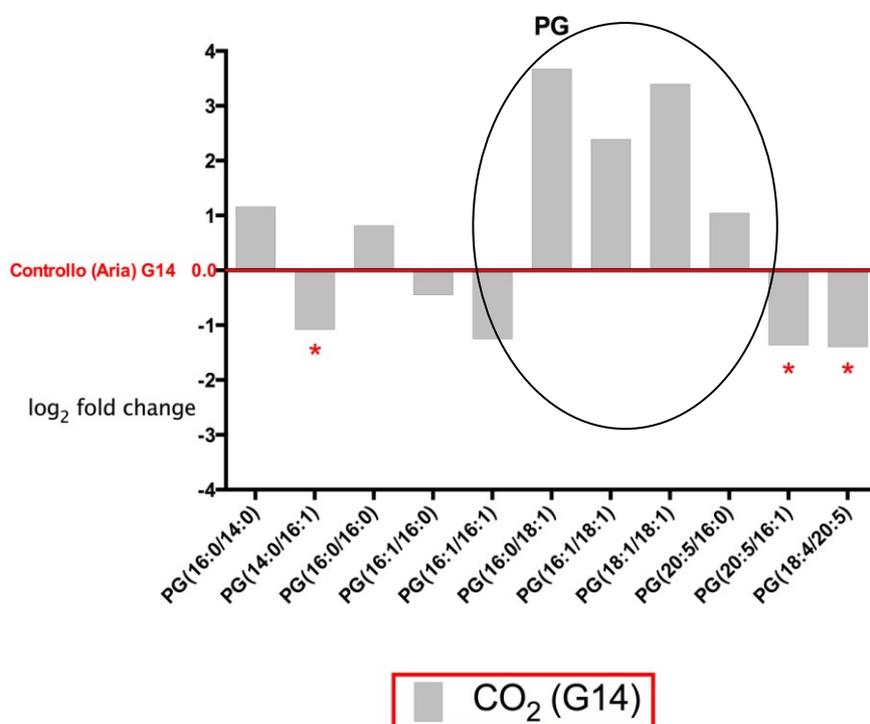


Figura 18 – Grafico che mostra le variazioni, sia in aumento che diminuzione, espresse con i log₂ fold change, dei livelli percentuali delle singole specie all'interno dei PG nelle condizioni CO₂ e Aria, usata come controllo. Le stelline indicano le variazioni statisticamente significative e riportate anche nella heatmap

Per quanto riguarda i TAG, l'analisi dei dati LC-MS dimostra un aumento quantitativo di tutte le specie molecolari alla fine della curva di crescita con CO₂ rispetto alla prova con aria. In generale la composizione dei triacilgliceroli mostra una variabilità di specie più alta rispetto a quella dei lipidi strutturali con catene di acidi grassi che vanno da specie chimiche con catene aciliche come 16:1/14:0/14:0 (44:1) a 20:5/20:5/22:6 (62:16). A differenza dei fosfolipidi, si osserva la tendenza ad un aumento di specie con catene aciliche più lunghe e un maggior numero di insaturazioni maggiore (Figura 19).

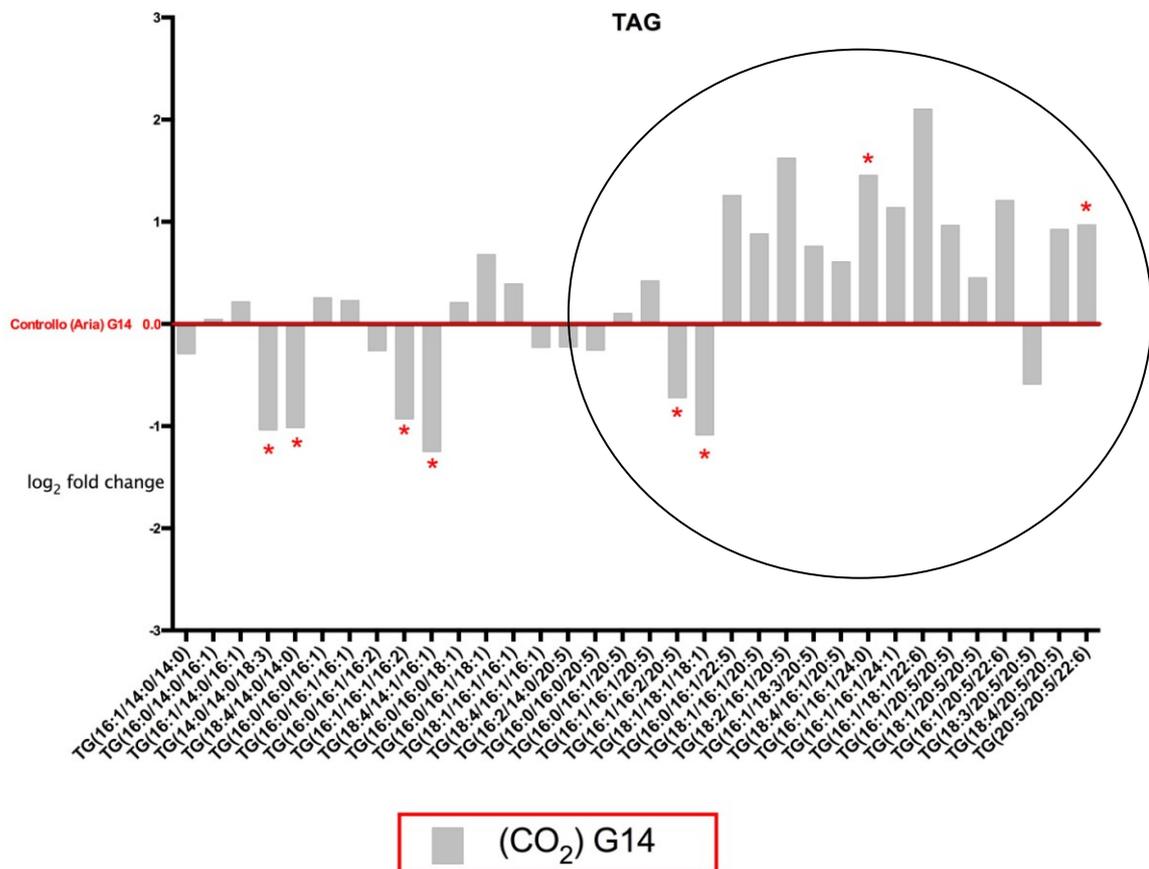


Figura 19 – Grafico che mostra le variazioni, sia in aumento che diminuzione, espresse con i log₂ fold change, dei livelli percentuali delle singole specie all'interno dei triacilgliceroli nelle condizioni CO₂ e Aria, usata come controllo. Le stelline indicano le variazioni statisticamente significative e riportate anche nella heatmap

Il confronto dei dati provenienti dalle stesse condizioni di crescita al giorno 7 (G7) e al giorno 14 (G14) mostra una predominanza di acidi C16 nella posizione *sn*-2 dei glicolipidi (in particolare gli MGDG), suggerendo la sintesi procariotica di questi composti (Figura 20).

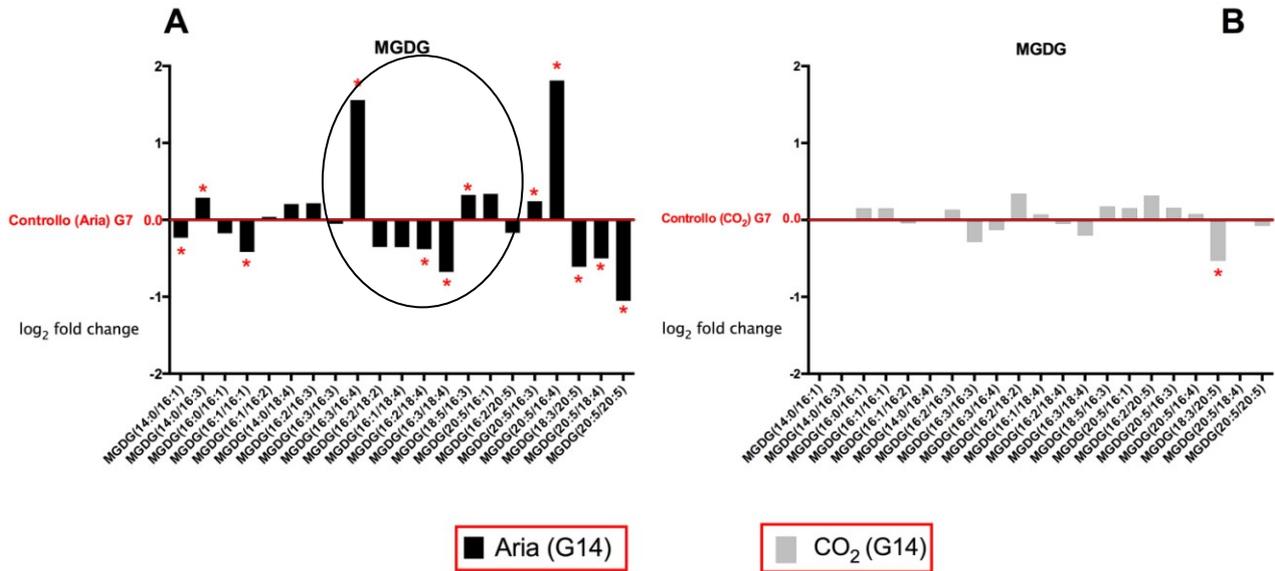


Figura 20 – Grafico che mostra le variazioni, sia in aumento che diminuzione, espresse con i log₂ fold change, dei livelli percentuali delle singole specie all'interno degli MGDG nella condizione (A) Aria e (B) CO₂ confrontando il giorno finale col il giorno intermedio della stessa curva di crescita, usato come controllo. Le stelline indicano le variazioni statisticamente significative e riportate anche nella heatmap

La conclusione opposta può essere raggiunta per il fosfatidilglicerolo (PG) in base all'accumulo di C18:1 in posizione *sn*-2 nelle principali specie che si accumulano sia con insufflazione di aria che di CO₂ (Figura 21).

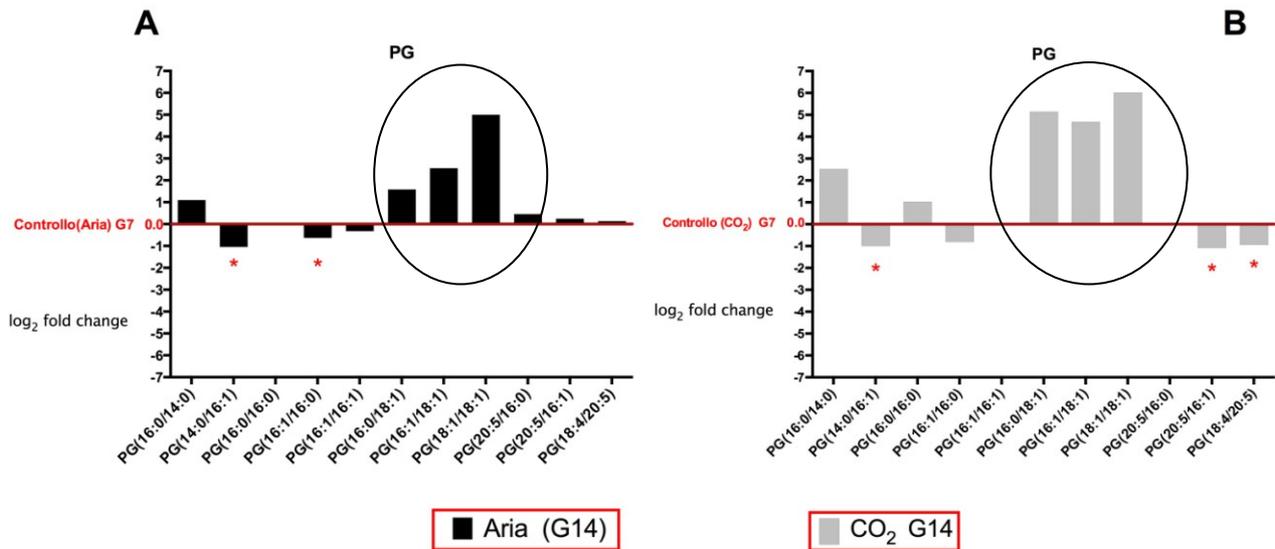


Figura 21 – Grafico che mostra le variazioni, sia in aumento che diminuzione, espresse con i log₂ fold change, dei livelli percentuali delle singole specie all'interno dei PG nella condizione (A) Aria e (B) CO₂ confrontando il giorno finale col il giorno intermedio della stessa curva di crescita, usato come controllo. Le stelline indicano le variazioni statisticamente significative e riportate anche nella heatmap

PARTE II – CONFRONTO –N e –Si vs CO₂

4.2.3 Analisi degli andamenti e della composizione biochimica delle biomasse di *C. cryptica* nelle condizioni di crescita –N e –Si

4.2.3.1 Andamento delle curve di crescita e analisi biochimiche della biomassa

Per poter valutare l'effetto delle deprivazioni selettive sulla distribuzione dei pool lipidici, le cellule sono state cresciute in un Regime Controllato di Nutrienti con insufflazione di CO₂ al 10% (v/v) e successiva seconda fase di deprivazione di solo azoto o silicio, come descritto in tabella 2.

Gli esperimenti hanno avuto una durata di 14 giorni. Gli andamenti delle conte cellulari, espresse come cell mL⁻¹, sono mostrati in figura 22: in questo caso sono stati confermati gli andamenti e i risultati ottenuti nel capitolo 3 per le prove analoghe in deprivazione selettiva.

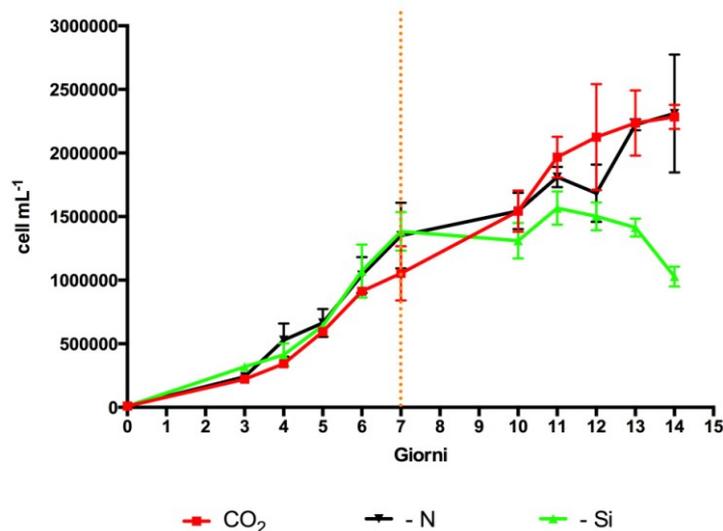


Figura 22 – Andamento delle curve di crescita nelle condizioni di crescita descritte in tabella 2 (CO₂, -N e -Si). La linea rossa tratteggiata indica il giorno in cui è iniziata la deprivazione selettiva

La produzione di biomassa e lipidi ha mostrato che i valori più alti si sono ottenuti nelle prove CO₂ e -N, con valori pari a circa 1.4 g L⁻¹ e 1.3 g L⁻¹, rispettivamente, per la biomassa e circa 260 mg L⁻¹ e 325 mg L⁻¹, rispettivamente, per i lipidi (Figura 23). Queste due condizioni sono quelle che hanno avuto anche un numero medio di cell mL⁻¹ più alto durante tutta la durata della curva di crescita (Figura 22). Questi dati hanno ulteriormente confermato che la combinazione tra aggiunta quotidiana di nutrienti, somministrazione di CO₂ al 10% e deprivazione selettiva da singolo macronutriente determinano un aumento nella biomassa complessiva e anche un arricchimento in lipidi.

Nelle prove in deprivazione selettiva di silicati si è avuta, come anche nella precedente sperimentazione, una produzione di lipidi (mg L⁻¹) quasi pari rispetto alla prova di controllo, nonostante la quantità quasi dimezzata della biomassa liofila (Figura 23). Ciò indica un aumento percentuale dei lipidi all'interno della biomassa e conferma l'influenza che la carenza di silicio ha sul metabolismo lipidico delle diatomee (Hu *et al.* 2008).

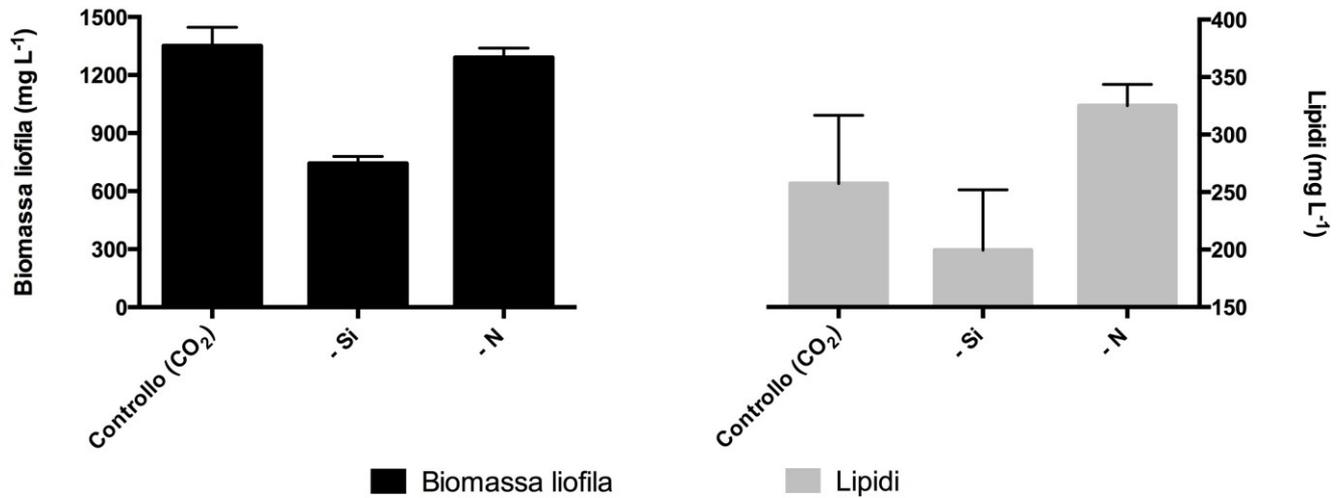


Figura 23 – Valori in biomassa liofila e produzione lipidica (mg L^{-1}) ottenute nelle condizioni di crescita Si e -N rispetto al controllo

Dall'analisi dei dati biochimici è possibile osservare come nel caso della condizione di crescita con la seconda fase di deprivazione selettiva (-Si) si abbia un drastico aumento dei lipidi ed una parallela diminuzione dei carboidrati, analogamente a quanto osservato nelle prove precedenti (Figura 24). Nella prova di deprivazione di azoto, la carenza dei nitrati ha invece determinato una riduzione della frazione proteica a favore di un proporzionale aumento della componente lipidica, confermando anche in questo caso i dati precedentemente osservati (Figura 24).

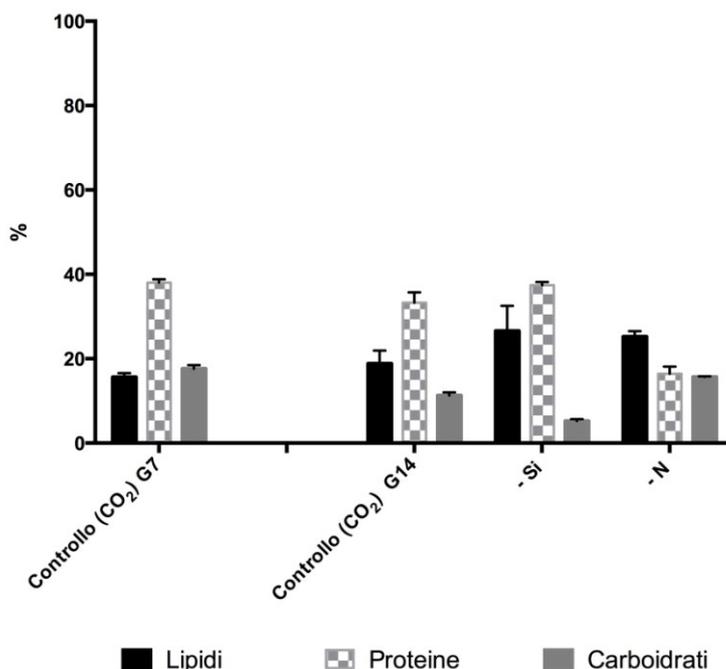


Figura 24 – Andamento percentuale di lipidi, proteine e carboidrati nell’ambito della biomassa recuperata a metà e alla fine delle crescite delle condizioni di crescita di controllo, -Si e -N. I valori al giorno 7 delle condizioni -Si e -N non sono riportati in quanto perfettamente sovrapponibili a quelli della condizione di controllo

4.2.3.2 Analisi elementare (CHNS), TOC (Carbonio Organico Totale) e Tasso di fissazione della CO₂ (P_{CO_2})

Parallelamente alle analisi biochimiche, sono state effettuate analisi per quantificare i principali elementi (CHNS) presenti nelle biomasse liofile. Come già fatto nei casi discussi in precedenza, per il carbonio è stata effettuata anche l’analisi del Carbonio Organico Totale (TOC).

Nella tabella 5 si possono osservare i valori percentuali degli elementi analizzati. Idrogeno e zolfo sono presenti in concentrazioni che costantemente si mantengono intorno al 6% e all’1%, rispettivamente.

Diverso il discorso per quanto concerne azoto e carbonio. Il primo è presente in concentrazioni che oscillano intorno al 5%, tranne nella biomassa finale della prova in deprivazione selettiva di azoto, in cui la percentuale è dimezzata.

Per quanto riguarda il carbonio, le analisi hanno mostrato percentuali comprese tra il 36% e il 40% circa con oscillazioni che dipendono dalle condizioni di crescita.

Tabella 5 – Risultati delle analisi CHNS che mostrano il contenuto percentuale dei vari elementi nelle biomasse di *C. cryptica* provenienti dalle condizioni di crescita CO₂, -Si e -N: i dati del carbonio sono quelli derivanti dall'analisi TOC. P_{CO2} (mg L⁻¹ giorno⁻¹) è un parametro che indica il tasso di fissazione della CO₂. Tutte le prove sono state condotte in triplicato

	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	P _{CO2} (mg L ⁻¹ giorno ⁻¹)
CO₂ (G14)	37.3 ± 1.1	5.2 ± 0.8	5.2 ± 1.4	0.8 ± 0.08	133.3 ± 12.0
-Si (G14)	35.9 ± 1.7	5.8 ± 0.1	5.5 ± 0.8	0.9 ± 0.01	70.6 ± 6.3
-N (G14)	37.8 ± 0.9	5.4 ± 0.1	2.1 ± 0.4	0.8 ± 0.2	128.7 ± 2.4

Un importante parametro analizzato in queste colture è stato il tasso di fissazione della CO₂ (P_{CO2}), espresso come mg L⁻¹ giorno⁻¹. In tabella 5 si può osservare che i valori più alti, analogamente all'andamento delle biomasse liofile, si ottengono nelle condizioni di crescita di controllo e -N. Ancora una volta i dati dimostrano che una crescita in doppia fase con aggiunta dosata e quotidiana dei nutrienti, seguita da una deprivazione selettiva di un solo macroelemento e con insufflazione costante di CO₂ 10% (v/v) ha portato ad ottenere elevate biomasse, alte quantità di CO₂ fissata nel tempo e una buona produzione di lipidi.

4.2.3.3 Analisi NMR per la determinazione lipidica

Le colture sottoposte ad un regime dosato di alimentazione per i primi sette giorni di crescita (con CO₂ al 10%) seguito da una condizione di stress come la deprivazione da singolo macronutriente (sempre con CO₂ al 10%) hanno mostrato alte percentuali di triacilgliceroli (più del 60%). I livelli di lipidi polari di membrana (GL + PL) sono stati significativi, probabilmente per le elevate quantità di biomassa, con una generale predominanza dei PL sui GL.

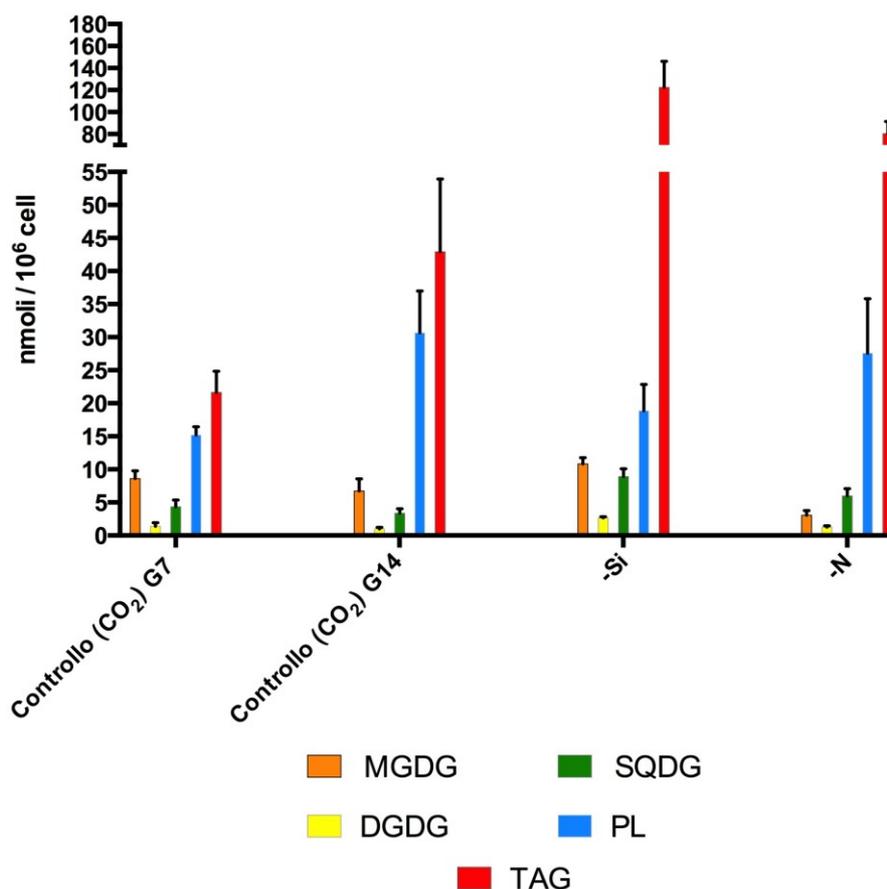


Figura 25 – Quantità di ciascuna classi lipidica (MGDG, DGDG, SQDG, PL e TAG) presente negli estratti di *C. cryptica* cresciuta nelle condizioni di controllo, -Si e -N, sia alla fine della prima che della seconda fase di crescita. I dati sono espressi in nmoli x 10⁶ cell⁻¹. I valori al giorno 7 delle condizioni -Si e -N non sono riportati in quanto perfettamente sovrapponibili a quelli della condizione CO₂

I dati quantitativi espressi in nmoli e ottenuti dall'analisi ¹H-NMR sono stati utilizzati per determinare il quantitativo complessivo di ciascuna classe lipidica per cellula (Figura 25). Come si può osservare, nei vari campioni le classi più abbondanti sono rappresentate dai PL e dai TAG, quindi da lipidi polari di membrana legati alla presenza di biomassa e da lipidi di riserva, più abbondanti nelle crescite in deprivazione selettiva di macronutriente. E' interessante notare come analizzando il contenuto delle singole classi lipidiche rispetto al numero di cellule, la biomassa cresciuta in deprivazione selettiva di silicati contenga maggiori nmoli di TAG per singola cellula, a ulteriore conferma che effettivamente la deprivazione di questo macronutriente ha un effetto significativo sul metabolismo dei lipidi neutri.

Un altro dato interessante che si evince dalla figura 25 è che per le cellule cresciute in deprivazione selettiva di N si è avuta una riduzione del contenuto per cellula in MGDG e DGDG. Ciò potrebbe essere dovuto all'”interruzione” della sintesi di tali lipidi di membrana dei cloroplasti a favore di quelli neutri, con una redistribuzione tra le cellule figlie del quantitativo disponibile già sintetizzato e quindi con una generale riduzione delle dimensioni dei cloroplasti nelle cellule di nuova formazione (Liang *et al.* 2015).

La riduzione del contenuto per cellula in MGDG e DGDG non si è verificato nella condizione di deprivazione da silicio, in cui la carenza di questo elemento ha limitato la divisione cellulare rispetto alla carenza di N. Liang *et al.* (2015) riporta che generalmente la diminuzione nelle classi di lipidi polari (MGDG, DGDG, SQDG, PC e PG) in crescite in deprivazione selettiva di azoto è stata osservata durante la divisione cellulare: ciò porterebbe sia alla diminuzione dei lipidi in questione all'interno delle singole cellule che alla diminuzione del volume del cloroplasto.

4.2.4 Analisi lipidomica: determinazione della composizione e della variazione in acidi grassi delle singole specie delle varie classi lipidiche di C. cryptica

La metodica applicata è la stessa descritta nel paragrafo 4.2.2. La figura 26 è la heatmap che mostra le variazioni, espresse come \log_2 fold change, delle varie componenti lipidiche al termine delle deprivazioni di azoto (-N) e silicio (-Si) in confronto con il rispettivo giorno intermedio (termine della prima fase di crescita, in cui non è ancora iniziata la deprivazione selettiva). Anche in questo caso sono mostrati i raggruppamenti delle specie lipidiche in modo da minimizzare la loro “lontananza logica” interna e di massimizzare quella tra i gruppi.

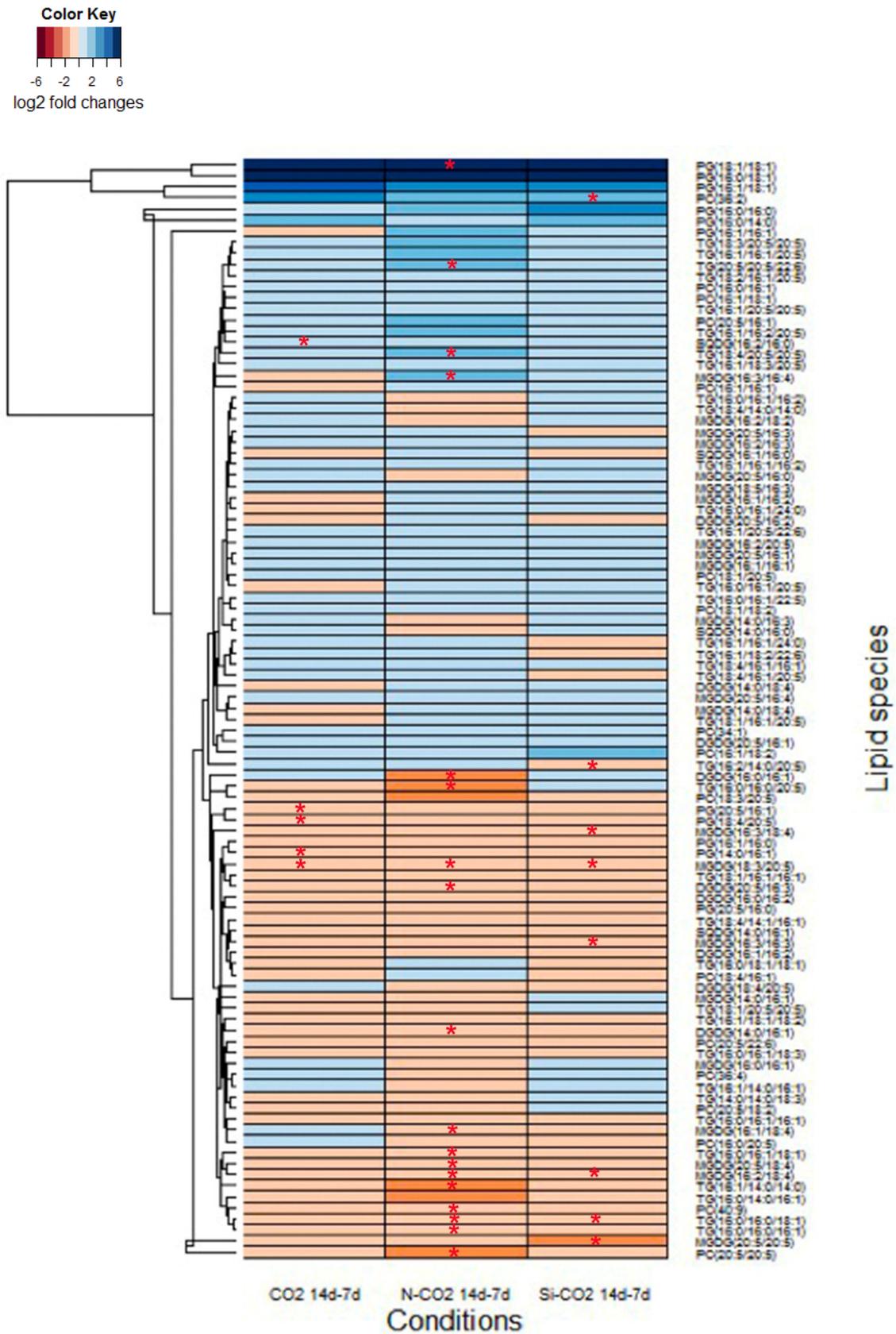


Figura 26 – Heatmap che mostra i valori di log₂ fold change per le condizioni sperimentali CO₂, -N e -Si come confronto tra il proprio giorno finale della curva di crescita e il giorno intermedio. La stellina indica valori di significatività da *t*-test con *p*-value < 0.05

Confrontando gli effetti delle condizioni di $-N$ e $-Si$ con i risultati del controllo al giorno finale delle crescite (G14), è possibile osservare alcune variazioni qualitative in risposta alla mancanza selettiva di tali macronutrienti. Un effetto comune ad entrambe le deprivazioni riguarda la classe degli MGDG, in cui si nota una riduzione della lunghezza e delle insaturazioni totali viste come somma di quelle presenti nelle due catene aciliche. Inoltre si osserva un decremento delle specie chimiche che presentano catene C18 in posizione *sn*-2 e aumento dei digliceridi con catene C16 in posizione *sn*-2 (Figura 27). Una situazione analoga si riscontra nella componente PG dei fosfolipidi (Figura 28), suggerendo che entrambe le classi lipidiche siano di origine plastidiale (via procariotica).

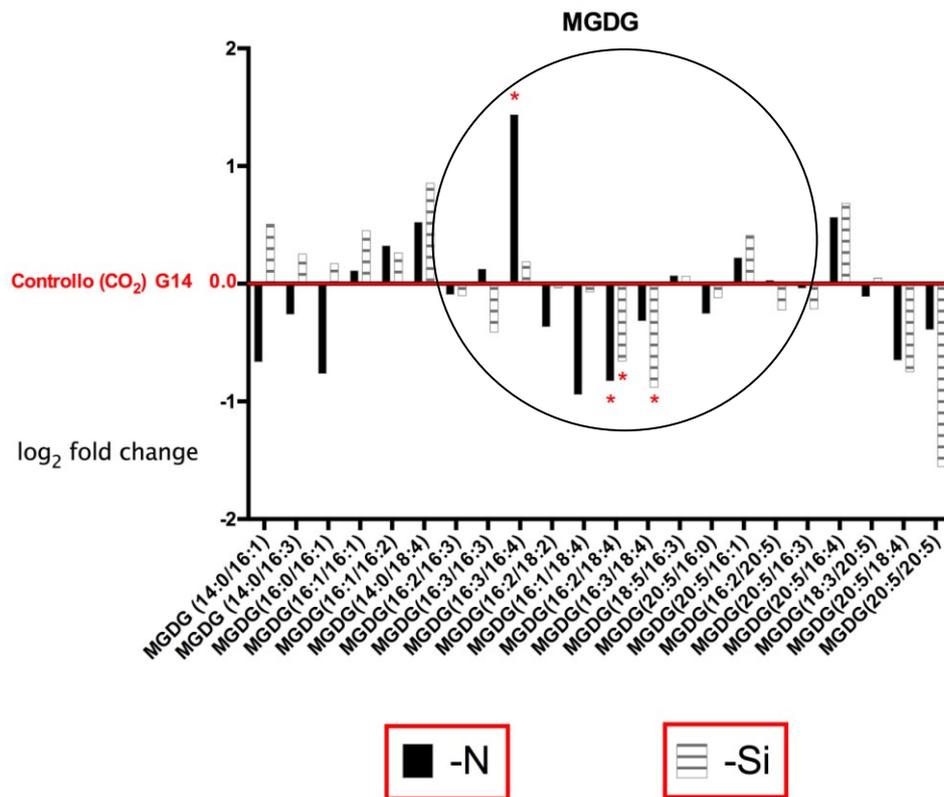


Figura 27 – Grafico che mostra le variazioni, sia in aumento che diminuzione, espresse con i log₂ fold change, dei livelli percentuali delle singole specie all'interno degli MGDG al termine della crescita nelle condizioni di deprivazione selettiva confrontate con la prova CO₂, usata come controllo. Le stelline indicano le variazioni statisticamente significative

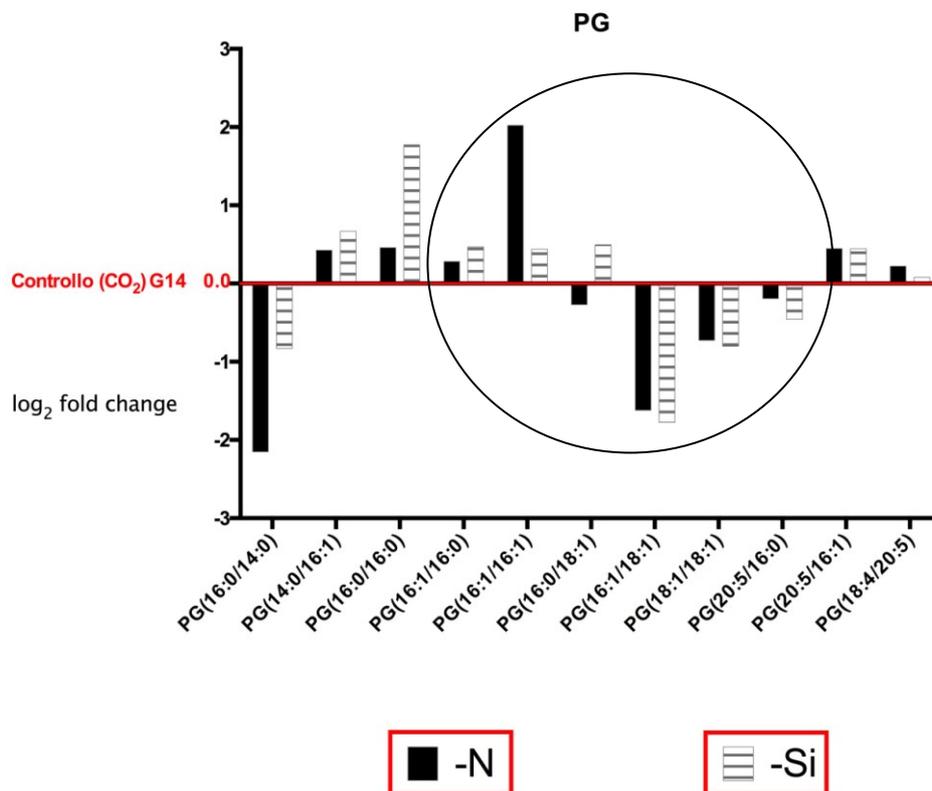


Figura 28 – Grafico che mostra le variazioni, sia in aumento che diminuzione, espresse con i log₂ fold change, dei livelli percentuali delle singole specie all'interno dei PG al termine della crescita nelle condizioni di deprivazione selettiva confrontate con la prova CO₂, usata come controllo

Nel caso dei triacilgliceroli, la carenza selettiva dei nutrienti ha determinato un aumento generalizzato di questa classe rispetto alle crescite con solo CO₂. Tuttavia, la deprivazione selettiva di nutrienti ha determinato anche un aumento selettivo dei TAG con catene aciliche più lunghe e con un maggior numero di insaturazioni (Figura 29). Questa situazione è in linea con recenti studi in cui è stato osservato che cellule di *T. pseudonana* poste in deprivazione di silicio e azoto hanno accumulato le stesse specie molecolari di TAG, sebbene in condizione di deprivazione di nitrati si ha una frazione di TAG ad alto peso molecolare, mentre in deprivazione di silicati è stata osservata la presenza di più specie a basso peso molecolare. Secondo Yu *et al.* (2009) questi effetti potrebbero essere dovuti alla produzione e/o incorporazione di catene aciliche più lunghe nei TAG in carenza di nitrati e alla degradazione di tali catene o biosintesi di catene più corte in assenza di silicati (Yu *et al.* 2009).

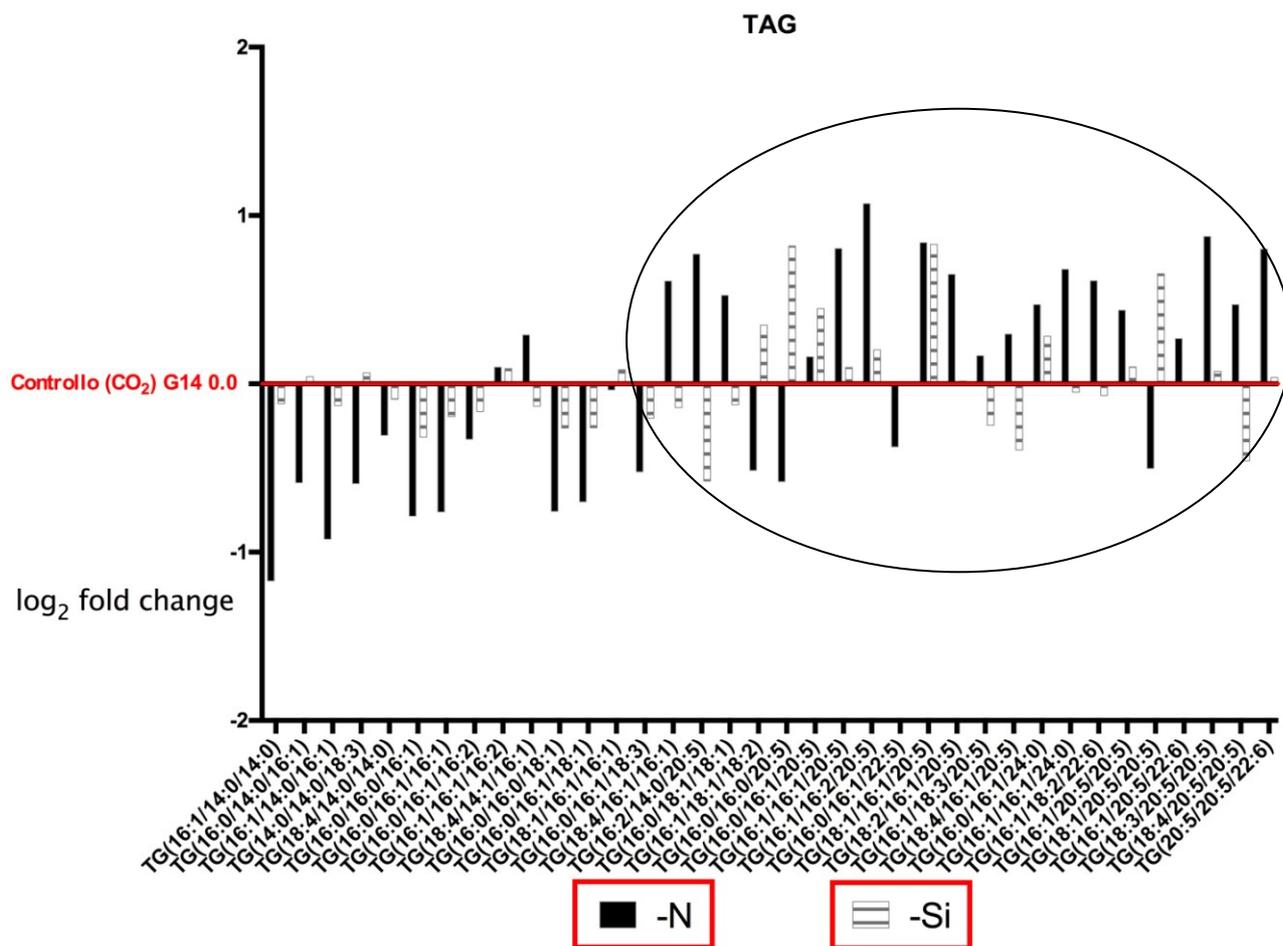


Figura 29 – Grafico che mostra le variazioni, sia in aumento che diminuzione, espresse con i log₂ fold change, dei livelli percentuali delle singole specie all'interno dei triacilgliceroli al termine della crescita in condizioni di deprivazione selettiva di azoto o silicio rispetto alla prova CO₂, usata come controllo

A ulteriore conferma di quanto osservato, sono state confrontate le variazioni all'interno degli MGDG anche nell'ambito della stessa condizione di crescita a 7 e 14 giorni. Come riportato in Figura 30, entrambi gli stress abiotici causano un'evidente riduzione della lunghezza complessiva e delle insaturazioni delle catene aciliche (come somma degli atomi di C e dei doppi legami presenti in posizione *sn*-1 e *sn*-2). Inoltre è anche più intensa la riduzione delle specie di MGDG che hanno catene aciliche C18 in posizione *sn*-2.

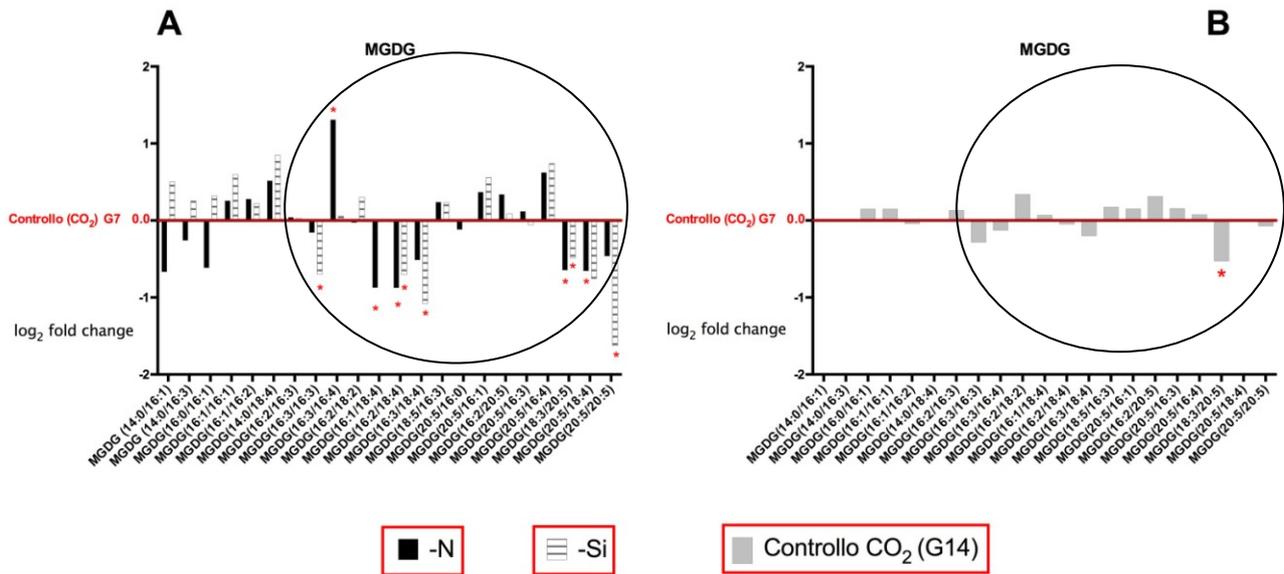


Figura 30 – Grafici che mostrano le variazioni, sia in aumento che diminuzione, espresse con i log₂ fold change, dei livelli percentuali delle singole specie all'interno degli MGDG nelle condizioni di (A) deprivazione selettiva e (B) CO₂ rispetto al giorno intermedio delle rispettive prove, usato come controllo. Le stelline indicano le variazioni statisticamente significative e riportate anche nella heatmap

Discorso diverso invece per quanto riguarda la componente PG dei fosfolipidi, in quanto il confronto tra -N e -Si (G14/G7) con il controllo (G14/G7) mostra una egual tendenza all'aumento di specie con catene aciliche C18 in posizione *sn*-2 e alla riduzione della lunghezza complessiva e delle insaturazioni degli acidi grassi. Essendo questa tendenza già presente nella condizione CO₂, ed essendosi mantenuta costante nelle deprivazioni selettive, può essere quindi attribuita all'effetto dell'anidride carbonica che è il parametro di crescita in comune tra le varie condizioni (Figura 31 A e B).

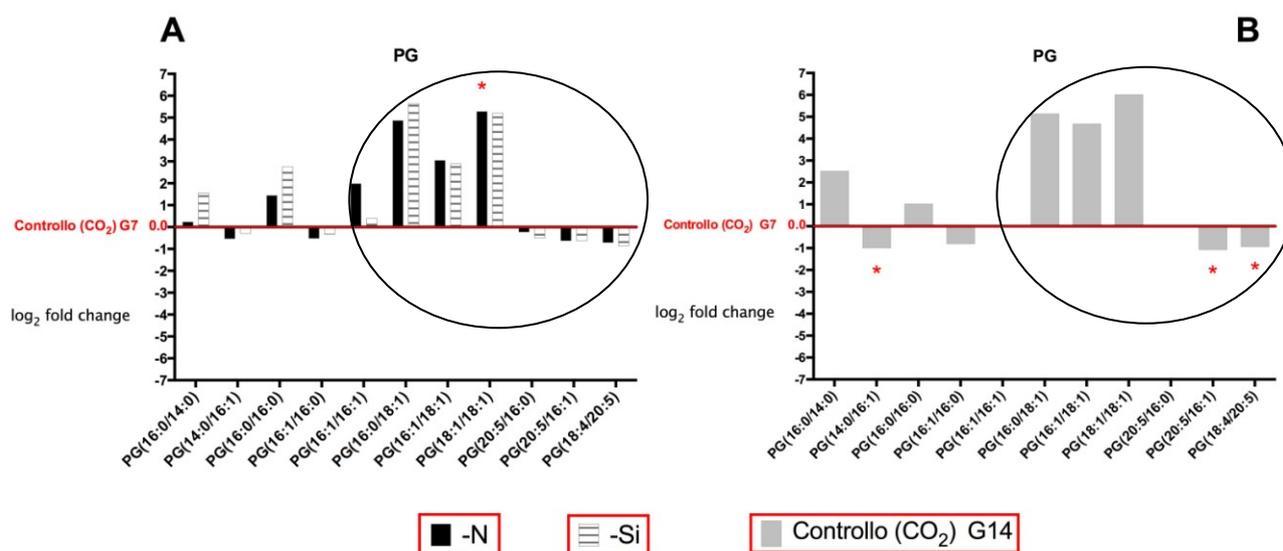


Figura 31 – Grafici che mostrano le variazioni, sia in aumento che diminuzione, espresse con i log₂ fold change, dei livelli percentuali delle singole specie all'interno dei PG nelle condizioni di (A) deprivazione selettiva e (B) CO₂ rispetto al giorno intermedio delle rispettive prove, usato come controllo. Le stelline indicano le variazioni statisticamente significative e riportate anche nella heatmap

4.2.5 Valutazioni su remodeling e sintesi de novo dei lipidi in *C. cryptica*

Alla luce dei dati NMR e di spettrometria di massa, nelle varie condizioni di crescita (Aria, CO₂, -Si e -N) la diminuzione (μ moli classe lipidica/mg campione liofilo) dei lipidi polari (GL, in particolar modo SQDG e MGDG) non può essere considerata come unica fonte di carbonio per l'incremento della produttività molare dei lipidi neutri (TAG) (Figura 32 e Tabella 6). Più dettagliatamente, confrontando i valori a metà e alla fine della curva di crescita, si può osservare come nella condizione di insufflazione con aria vi sia una riduzione nelle classi degli SQDG ed MGDG ed un aumento di PL e TAG. Quantitativamente, la diminuzione molare dei glicolipidi non compensa interamente l'aumento del secondo gruppo di composti (Figura 32 e Tabella 6). Una situazione analoga è stata osservata nella condizione con insufflazione di CO₂ (Figura 32 e Tabella 6).

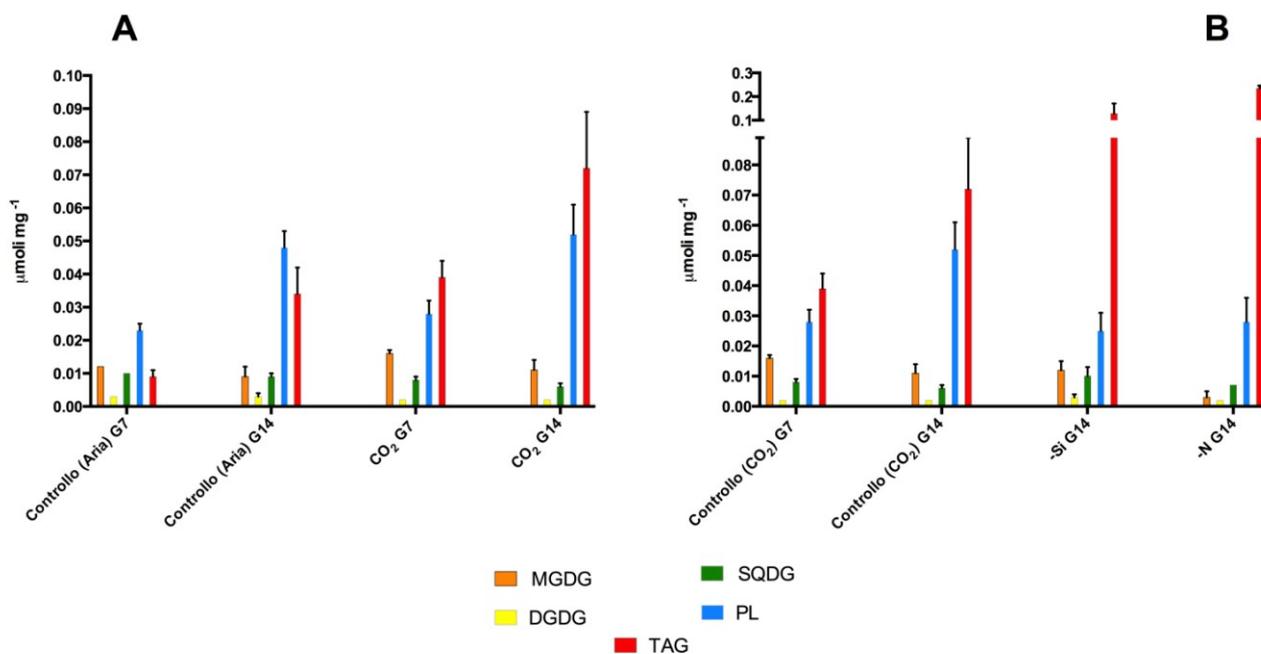


Figura 32 – Quantità di ciascuna classe lipidica (MGDG, DGDG, SQDG, PL e TAG) presente negli estratti di *C. cryptica* cresciuta nelle condizioni (A) Aria e CO_2 ; (B) CO_2 , -Si e -N. I dati sono espressi in $\mu\text{mol mg}^{-1}$ di biomassa liofila

Nel caso invece del confronto delle classi lipidiche quantificate al termine delle deprivazioni selettive rispetto a quelle presenti al termine della prima fase di crescita, si è osservata una riduzione netta dei glicolipidi e, in deprivazione di azoto, anche dei PL. Anche in questo caso, le riduzioni molari complessive non compensano gli aumenti molari dei TAG. Inoltre si può osservare come le deprivazioni selettive di macronutrienti determinino una riduzione dei PL più evidente rispetto a quella che si osserva nelle condizioni con aria e CO_2 (Figura 32 e Tabella 6).

Tabella 6 – Confronto tra le quantità delle singole classi lipidiche (esprese come $\mu\text{moli/mg}$ di biomassa liofila) a metà e alla fine delle curve di crescita delle condizioni Aria, CO_2 , -N e -Si

ESPERIMENTO	CLASSI LIPIDICHE	GIORNO 14		GIORNO 7		$\Delta \mu\text{moli/mg}$
		$\mu\text{moli/mg}$ (Media)	DS	$\mu\text{moli/mg}$ (Media)	DS	
ARIA	DGDG	0,003	0,001	0,003	0,000	0,000
	SQDG	0,009	0,001	0,010	0,000	-0,001
	MGDG	0,009	0,003	0,012	0,000	-0,003
	PL	0,048	0,005	0,023	0,002	0,025
	TAG	0,034	0,008	0,009	0,002	0,025
	FFA	0,038	0,005	0,018	0,004	0,021
CO_2	DGDG	0,002	0,000	0,002	0,000	-0,001
	SQDG	0,006	0,001	0,008	0,001	-0,002
	MGDG	0,011	0,003	0,016	0,001	-0,004
	PL	0,052	0,009	0,028	0,004	0,024
	TAG	0,072	0,017	0,039	0,005	0,033
	FFA	0,014	0,019	0,029	0,021	-0,015
SENZA NITRATI (-N)	DGDG	0,002	0,000	0,003	0,000	0,000
	SQDG	0,007	0,000	0,011	0,001	-0,004
	MGDG	0,003	0,002	0,013	0,002	-0,010
	PL	0,028	0,008	0,039	0,004	-0,012
	TAG	0,235	0,011	0,009	0,003	0,227
	FFA	0,111	0,064	0,016	0,004	0,095
SENZA SILICATI (-Si)	DGDG	0,003	0,001	0,004	0,001	-0,001
	SQDG	0,010	0,003	0,010	0,000	-0,001
	MGDG	0,012	0,003	0,019	0,002	-0,008
	PL	0,025	0,006	0,024	0,007	0,000
	TAG	0,128	0,043	0,025	0,001	0,103
	FFA	0,078	0,048	0,011	0,011	0,067

Questi dati indicano che quindi accanto al processo di remodeling all'interno delle varie componenti lipidiche (soprattutto GL) ci sia un più ampio meccanismo di sintesi *de novo* degli acidi grassi per la produzione di TAG. Il carbonio per tale sintesi *de novo* può venire sia da carbonio di nuova fissazione (visto anche il leggero aumento nella percentuale di C presente nelle biomasse dei G14 rispetto ai G7, tabelle 3 e 5) che da carbonio che deriva dalla degradazione della clorofilla e delle proteine non essenziali nel caso della deprivazione da nitrati (in accordo con Lee *et al.* 2012; Mus *et al.* 2013) o dagli scheletri carboniosi dei carboidrati nel caso della deprivazione da silicati. I nostri dati sembrano coerenti sia con Burrows *et al.* (2012), che afferma che il processo di sintesi dei lipidi nelle cellule di *P. tricornutum* in deprivazione di nitrati è per lo più *de novo* sia con Roessler (1988), che riporta che la carenza di silicio ha effetti nella compartimentazione del

carbonio di nuova fissazione con una percentuale maggiore utilizzata per la sintesi dei lipidi e una quantità minore impiegata per la sintesi dei crisolaminarani, principale carboidrato di riserva all'interno delle diatomee.

4.2.6 Acidi grassi come valore aggiunto per applicazioni biotecnologiche

Nelle diatomee, la maggior parte del carbonio fissato fotosinteticamente passa attraverso il piruvato, da cui è decarbossilato dal complesso della piruvato deidrogenasi (PDC, EC 1.2.4.1) per formare acetil-CoA (Ac-CoA). Nella maggior parte delle condizioni di crescita, l'Ac-CoA è immesso nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) per formare metaboliti intermedi. Tuttavia, quando stressate, le cellule mandano il carbonio di nuova fissazione verso componenti di riserva, mediante la carbossilazione irreversibile dell'Ac-CoA a malonil-CoA, che è il substrato per la biosintesi degli acidi grassi. Nella maggior parte delle diatomee, i composti di riserva sono i TAG, che si accumulano nei corpi lipidici e servono come serbatoi di energia. Pertanto, sembra che ci debba essere un compromesso inevitabile tra la crescita delle cellule e il loro contenuto lipidico. Questo compromesso è uno dei maggiori ostacoli nella produzione industriale a basso costo di biodiesel dalle microalghe (Levitan *et al.* 2014).

L'idoneità degli oli algali per la produzione di biodiesel dipende in larga misura dalla composizione in acidi grassi e dalla loro distribuzione nei triacilgliceroli (Knothe 2008).

I principali acidi grassi costituenti dei lipidi complessi di *C. cryptica* cresciuta nelle condizioni Aria, CO₂, -N e -Si sono a 16:0, 16:1, 16:2, 16:3 e 20:5. Tali dati sono in accordo con quelli riportati da Roessler (1988) per la stessa specie. Tale miscela con catene di acidi grassi relativamente corte e con poche insaturazioni (eccezion fatta per il 20:5) è potenzialmente utilizzabile per la produzione di bio-oli.

Negli ultimi anni, uno degli obiettivi degli studi sugli acidi grassi ha riguardato la serie ω -3 degli acidi grassi polinsaturi, come l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA), con la ricerca di nuove fonti biologiche da cui estrarli e delle condizioni necessarie per aumentarne

il contenuto, per esempio, nelle diatomee. Infatti all'interno della frazione lipidica sia l'EPA che il DHA ricoprono un ruolo di interesse biotecnologico non strettamente correlato alla produzione di energia. Tali acidi grassi, più comunemente citati come acidi grassi ω -3 e molto abbondanti all'interno dell'olio di pesce, occupano un ruolo importante in campo alimentare visti i loro effetti benefici riscontrati sulla salute umana (Stonik e Stonik 2015).

All'interno degli estratti lipidici dei campioni di *C. cryptica* utilizzati per l'analisi lipidomica, questa componente ω -3, con una netta predominanza di EPA, è risultata presente per \cong 40% nei lipidi di membrana di tutte e quattro le condizioni sperimentali, con un leggero aumento di \cong 15% nelle prove CO₂ e -N rispetto alle altre condizioni sperimentali (Figura 33). Nell'ambito della deprivazione da silicati si può osservare una leggera diminuzione della componente ω -3 come riscontrato anche da Yongmanitchai e Ward (1991), i quali hanno osservato una diminuzione dell'acido eicosapentaenoico (EPA) in *P. tricornutum* posta in deprivazione di silicio. Anche Mortensen *et al.* (1988) ha osservato in *Chaetoceros gracilis* una diminuzione della quantità di PUFA C20 e C22 man mano che diminuiva la disponibilità di silicati in coltura.

Il DHA è invece pressoché costante nei GL e PL in tutte le condizioni sperimentali, ma è completamente assente nei TAG (Figura 33).

Per quanto riguarda i livelli di EPA sono significativamente più bassi (anche fino a sei volte) nei triacilgliceroli rispetto alle percentuali nei lipidi di membrana (Figura 33).

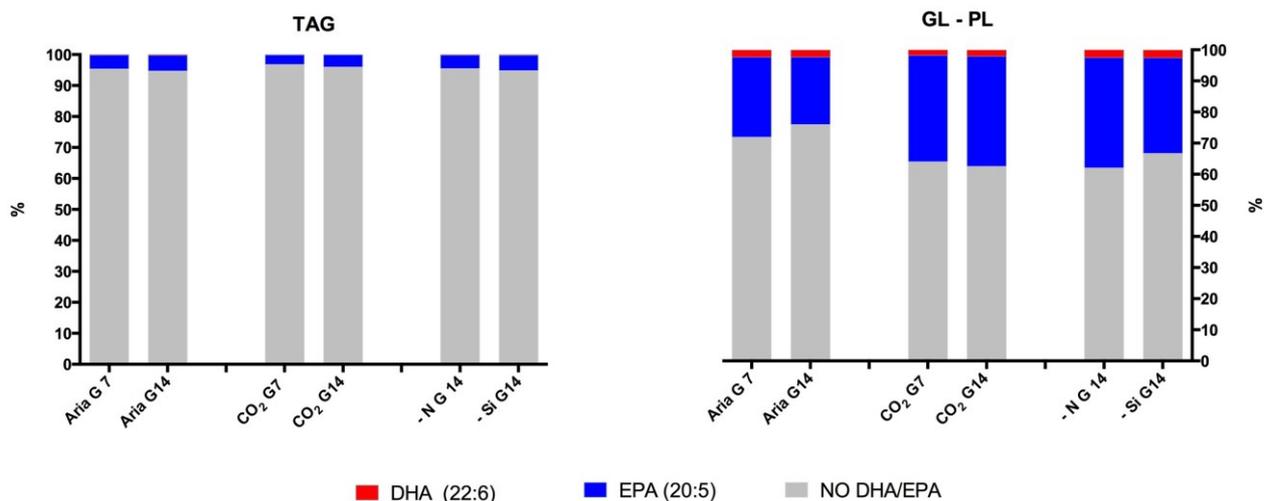


Figura 33 – Percentuali di DHA ed EPA nei lipidi neutri e di membrana delle varie condizioni di crescita applicate per *C. cryptica*. In grigio sono indicate le percentuali di tutti gli altri acidi grassi

4.3 CONCLUSIONI

L'analisi qualitativa e quantitativa delle varie classi lipidiche mediante UHPLC/HRMS ha avuto lo scopo di identificare le variazioni delle principali specie lipidiche in modo da tracciare un quadro preliminare del metabolismo in *C. cryptica* cresciuta in differenti condizioni.

Un totale di 92 specie lipidiche sono state individuate e all'analisi dei dati di spettrometria di massa è stata affiancata anche l'analisi statistica al fine di valutare la significatività delle variazioni ottenute tra le varie catene aciliche nelle diverse condizioni di crescita a cui la specie è stata sottoposta. In linea generale i dati indicano un aumento quantitativo di tutte le componenti lipidiche in presenza di anidride carbonica.

Le classi lipidiche maggiormente influenzate da un punto di vista qualitativo sono state i lipidi di membrana, in particolare MGDG e i PG.

A parte un aumento delle insaturazioni totali, la CO₂ determina un incremento delle specie di MGDG che presentano catene C18 in posizione *sn*-2 (tipico della sintesi di tipo eucariotico) e un decremento di quelle con catene C16 in posizione *sn*-2. Analoga situazione è osservabile anche nei

fosfatidilgliceroli, dove si nota anche un accorciamento delle catene alchiliche e una riduzione delle insaturazioni totali.

Per quanto riguarda i lipidi neutri, l'insufflazione di anidride carbonica causa un aumento della lunghezza media degli acidi grassi e del grado di insaturazione.

Nelle condizioni di insufflazione di CO₂ ma deprivazione selettiva di azoto o silicio sia gli MGDG che i PG subiscono una riduzione della lunghezza delle catene aciliche e delle insaturazioni totali.

Inoltre si osserva un decremento delle combinazioni che presentano catene C18 in posizione *sn*-2 e l'aumento delle specie con catene C16 in posizione *sn*-2, a supporto di una possibile sintesi *de novo* tramite via procariotica.

La deprivazione da N ha determinato la presenza di TAG a più alto peso molecolare e con più insaturazioni, mentre la carenza di Si non influenza questi aspetti. In generale comunque le deprivazioni selettive di azoto e silicio hanno determinato un aumento quantitativo di tutte le sue specie molecolari lipidiche in confronto alla semplice insufflazione di anidride carbonica.

Dai dati ottenuti da analisi ¹H-NMR e di spettrometria di massa si può osservare come in generale vi sia una riduzione nelle classi degli SQDG ed MGDG, con un aumento invece dei TAG, ma la diminuzione molare dei primi non compensa interamente l'aumento dei secondi. Inoltre si osserva come le deprivazioni selettive determinino un rimodellamento delle membrane, in particolar modo dei cloroplasti, più significativo rispetto alle condizioni con aria o CO₂. Ciò indica che quindi accanto al processo di remodeling all'interno delle varie componenti lipidiche (soprattutto GL) ci sia un più ampio meccanismo di sintesi *de novo* degli acidi grassi per la produzione di TAG. Il carbonio per tale sintesi *de novo* può venire sia da carbonio di nuova fissazione che da carbonio che deriva dalla degradazione della clorofilla e delle proteine non essenziali nel caso della deprivazione da nitrati o dagli scheletri carboniosi dei carboidrati nel caso della deprivazione da silicati.

I principali acidi grassi costituenti dei lipidi complessi di *C. cryptica* cresciuta nelle condizioni aria, CO₂, CO₂ con -N e CO₂ con -Si sono a 16:0, 16:1, 16:2, 16:3 e 20:5. Questa composizione caratterizzata da catene di acidi grassi relativamente corte e con poche insaturazioni (eccezion fatta

per il 20:5) è potenzialmente utilizzabile per la produzione di bio-oli e ha un valore aggiunto importante da un punto di vista biotecnologico.

Inoltre all'interno degli estratti lipidici dei campioni di *C. cryptica* la componente ω -3 nei lipidi di membrana è di circa il 40%, con una netta predominanza di EPA. Questo valore aumenta leggermente (\cong 15%) nelle prove CO₂ e CO₂ senza N rispetto alle altre condizioni sperimentali. Le percentuali di DHA sono invece costanti nei GL e PL in tutte le condizioni sperimentali, ma sono completamente assenti nei TAG. Per quanto riguarda i livelli di EPA sono significativamente più bassi (anche fino a sei volte) nei triacilgliceroli in tutte le prove di crescita rispetto alle percentuali nei lipidi di membrana.

5. STUDI METABOLICI – ANALISI TRASCRITTOMICA

5.1 INTRODUZIONE

5.1.1 Diatomee e biologia molecolare

Nonostante il grande interesse ecologico che c'è sulle diatomee, sono ancora relativamente pochi i dati molecolari su questo gruppo di organismi. Fino a pochi anni fa, le sequenze di geni di diatomee nei database non erano più di 50 e qualsiasi tipo di analisi molecolare richiedeva lo sviluppo di protocolli specifici. Al giorno d'oggi invece sono disponibili quattro genomi di diatomee: *Thalassiosira pseudonana* (<http://genome.jgi-psf.org/Thaps3/Thaps3.home.html>), *Phaeodactylum tricorutum* (<http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>), *Fragilariopsis cylindrus* (<http://genome.jgi-psf.org/Fracy1/Fracy1.home.html>) e *Pseudo-nitzschia multiseriis* (<http://genome.jgi.doe.gov/Psemu1/Psemu1.home.html>). Per *F. cylindrus* e *P. multiseriis* l'analisi completa del genoma è in via di definizione e, ad ogni modo, queste due specie non hanno rilevanza nell'ambito della produzione dei biocarburanti principalmente perchè non crescono ad un ritmo abbastanza veloce per un sistema di produzione biotecnologicamente applicabile (Hildebrand *et al.* 2012).

Il trascrittoma è l'insieme degli RNA messaggeri presenti all'interno di una cellula in un determinato momento fisiologico ed è dal processo di traduzione di questo messaggio che derivano le proteine (Nelson e Cox 2014).

In tutti gli organismi le molecole organiche prodotte dalle reazioni biochimiche sono dette metaboliti primari, e le vie intricate attraverso le quali l'organismo le sintetizza o le demolisce costituiscono nel loro insieme il metabolismo primario. I metaboliti secondari sono per lo più caratteristici di singoli generi o specie e si formano da specifici pathway che di solito derivano dai metaboliti primari. Di conseguenza, mentre i metaboliti primari sono coinvolti nei processi vitali di

base, i metaboliti secondari svolgono ruoli di mediatori chimici o di regolatori specie-specifici. Allo stato attuale, siamo lontani dal comprendere pienamente tutti i percorsi metabolici che si verificano all'interno delle cellule (Nelson e Cox 2014).

Le risposte fisiologiche e biochimiche (capitolo 3) e metaboliche (capitolo 4) confermano che vi sono una serie di adattamenti cellulari e fisiologici che rendono le diatomee uniche e diverse rispetto agli altri organismi fotosintetici e la cui individuazione è stata resa possibile anche da studi di biologia molecolare, quindi genomica, proteomica e trascrittomica.

Per esempio ci sono alcune caratteristiche peculiari che contribuiscono al successo ambientale delle diatomee, come la presenza del ciclo completo dell'urea, che non si trova nelle Clorofite, o la presenza di parte degli enzimi glicolitici nei mitocondri, forse come strategia per incanalare meglio i substrati verso il ciclo dell'acido citrico (Hildebrand *et al.* 2012).

Le diatomee si differenziano dalle altre classi di microalghe in termini di carboidrati di riserva prodotti: infatti invece dell'amido, esse producono i crisolaminarini, che contengono unità di $\beta(1 \rightarrow 3)$ e $\beta(1 \rightarrow 6)$ -glucosio in un rapporto 11:1. Questi zuccheri sono solubili e immagazzinati nel vacuolo, rispetto alle microalghe verdi che accumulano una forma insolubile (l'amido) nei cloroplasti (Hildebrand *et al.* 2012).

Per quanto riguarda la regolazione della produzione dei corpi lipidici nelle microalghe, in termini di sequenziamento dei genomi la bioinformatica può aiutare indicando quali vie sono coinvolte, ma in questo, come altri casi, sono ancora poche le evidenze sperimentali delle attività enzimatiche putative (Scott *et al.* 2010).

La velocità di evoluzione delle diatomee è stata almeno in parte attribuita all'acquisizione orizzontale di geni, che si pensa abbiano conferito nuove funzioni cellulari e metaboliche, e sono responsabili dei processi di diversificazione rispetto ad altre specie. Tuttavia, ci sono anche differenze sostanziali tra le diatomee e gli altri organismi nell'omologia e nella localizzazione dei geni chiave coinvolti nei pathway eucariotici più conservati. Tali differenze possono influenzare il metabolismo cellulare e indicano che la flessibilità trofica ed ambientale delle diatomee ha una base

genetica. Le differenze nel metabolismo delle varie specie di diatomee indica che ci sono molteplici possibilità di manipolazione degli enzimi e dei percorsi metabolici per migliorare, per esempio, la crescita e l'accumulo dei lipidi in questi organismi (Hildebrand *et al.* 2012).

5.1.2 Obiettivi dell'attività sperimentale: assemblaggio de novo del trascrittoma di C. cryptica cresciuta in Regime Controllato di Nutrienti in presenza di aria o CO₂ al 10% e in doppia fase con deprivazione selettiva di silicati o nitrati

La specie utilizzata per approfondire gli studi di biologia molecolare è stata *C. cryptica*. Lo scopo dello studio era l'assemblaggio *de novo* del trascrittoma di *C. cryptica* cresciuta in differenti condizioni sperimentali al fine di quantificare e valutare le isoforme differenzialmente espresse e a quali percorsi metabolici esse appartengono. La condizione con insufflazione di aria (condizione A) è stata usata come controllo per la valutazione dei trascritti up o down-regolati nella condizione con insufflazione di CO₂ (definita B). Quest'ultima è stata a sua volta usata come controllo per i campioni con insufflazione di CO₂ e deprivazione di Si o N (rispettivamente condizioni C e D).

Infatti per le analisi di trascrittomica sono state applicate le quattro condizioni di crescita, uguali a quelle impiegate per l'analisi lipidomica (capitolo 4), qui di seguito descritte e riassunte in tabella 1:

- unica fase di crescita con aggiunta dosata e quotidiana dei nutrienti e insufflazione con aria (CO₂ allo 0.04%) (condizione definita a Regime Controllato di Nutrienti, Aria);
- unica fase di crescita con aggiunta dosata e quotidiana dei nutrienti e insufflazione con CO₂ al 10% per sette ore al giorno durante la fase luminosa del fotoperiodo per tutta la durata della curva di crescita (condizione definita a Regime Controllato di Nutrienti con CO₂ al 10%, CO₂);
- doppia fase di crescita in cui nella prima fase (7 giorni) è stato applicato il protocollo con aggiunta dosata e quotidiana dei nutrienti e nella seconda fase di deprivazione selettiva (7 giorni) è stato eliminato un solo macroelemento del mezzo di crescita (silicio). Le colture sono state insufflate con CO₂ al 10% per sette ore al giorno per tutto il periodo di crescita (condizione definita -Si);

➤ doppia fase di crescita in cui nella prima fase (7 giorni) è stato applicato il protocollo con aggiunta dosata e quotidiana dei nutrienti e nella seconda fase di deprivazione selettiva (7 giorni) è stato eliminato un solo macroelemento del mezzo di crescita (azoto). Le colture sono state insufflate con CO₂ al 10% per sette ore al giorno per tutto il periodo di crescita (condizione definita -N).

Le cellule sono state recuperate a metà e al termine della curva di crescita, centrifugate e conservate a -80°C fino all'analisi.

Tabella 1 - Schema riassuntivo delle tipologie di crescita a cui è stata sottoposta la specie modello *C. cryptica* per i successivi studi di trascrittomica. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato

PROVA	CONDIZIONE	DURATA (Giorni)	TIPO DI ESPERIMENTO	CONDIZIONI ESPERIMENTO	
				Aggiunta Nutrienti	Insufflazione
Regime Controllato dei Nutrienti (Aria)	A	14	Unica Fase	Aggiunta dosata dei nutrienti tutti i giorni	Aria
Regime Controllato dei Nutrienti + CO ₂ (CO ₂)	B	14	Unica Fase	Aggiunta dosata dei nutrienti tutti i giorni	Aria + 10% di CO ₂
Deprivazione selettiva (- Si)	C	14	Doppia Fase	I Fase: Aggiunta dosata dei nutrienti per i primi 7 giorni. II Fase: Sospensione Aggiunta Na ₂ SiO ₃ per i secondi 7 giorni	I Fase: Aria + 10% di CO ₂ II Fase: Aria + 10% di CO ₂
Deprivazione selettiva (- N)	D	14	Doppia Fase	I Fase: Aggiunta dosata dei nutrienti per i primi 7 giorni. II Fase: Sospensione Aggiunta NaNO ₃ per i secondi 7 giorni	I Fase: Aria + 10% di CO ₂ II Fase: Aria + 10% di CO ₂

5.2 RISULTATI E DISCUSSIONI

5.2.1 Assemblaggio *de novo* del trascrittoma di *C. cryptica* cresciuta in Regime Controllato di Nutrienti in presenza di aria o CO₂ al 10% e in doppia fase con deprivazione selettiva di silicati o nitrati

Lo scopo del progetto è stato l'assemblaggio *de novo* del trascrittoma della diatomea *C. cryptica* utilizzando i dati raccolti da triplicati di quattro condizioni sperimentali differenti. Una volta assemblato, si è visto che il trascrittoma grezzo comprendeva 77197 trascritti raggruppati in 64539 geni. Successivamente è stata effettuata la quantificazione dei livelli dell'espressione dei trascritti in ciascun campione e l'analisi dell'espressione differenziale tra le diverse condizioni sperimentali.

La condizione Aria (definita A) è usata come controllo per la condizione CO₂ (definita B) al fine di valutare l'effetto della CO₂ al 10% sull'espressione genica; la condizione B a sua volta è usata come controllo per i campioni -Si e -N (definiti rispettivamente C e D) per la valutazione degli effetti sul trascrittoma della deprivazione selettiva da macronutriente (Tabelle 2 e 3).

Nella tabella 2 è indicato il numero di geni totali, quelli up-regolati e quelli down-regolati, mentre la tabella 3 riassume le isoforme totali e quelle differentemente espresse con valore di log₂ fold change ≥ 1.5 o ≤ -1.5 e con significatività statistica ≤ 0.05 individuati nelle diverse condizioni sperimentali.

Tabella 2 – Numero di geni totali e differentemente espressi nelle varie condizioni messe a confronto

Treatment	Control	Genes with FDR ≤ 0.05	Genes UP (FC ≥ 1.5 and FDR ≤ 0.05)	Genes DOWN FC ≤ -1.5 and FDR ≤ 0.05
Cond_B	Cond_A	2200	1228	972
Cond_C	Cond_B	544	131	413
Cond_D	Cond_B	903	236	668

Tabella 3 – Numero di isoforme totali e differentemente espresse nelle varie condizioni messe a confronto

Treatment	Control	Isoforms with FDR ≤ 0.05	Isoforms UP (FC ≥ 1.5 and FDR ≤ 0.05)	Isoforms DOWN FC ≤ 1.5 and FDR ≤ 0.05
Cond_B	Cond_A	2006	1114	892
Cond_C	Cond_B	474	160	314
Cond_D	Cond_B	805	204	601

Se si considera il numero di isoforme che nell'insieme sono differentemente espresse, il fattore CO₂ è stato più significativo nell'influenzare l'espressione genica rispetto alle singole deprivazioni selettive di azoto o silicio (Tabella 3).

Per quanto riguarda i valori di log₂ fold change delle isoforme down-regolate, la carenza di silicio è quella che ha portato ad avere differenze in down-espressione più significative. Per quanto riguarda invece l'up-regolazione, è la CO₂ che ha permesso di avere differenze di espressione nelle isoforme più significative. Nella condizione B vs A (CO₂ vs Aria) i valori di log₂ fold change vanno da circa -143 a -1.9 per le isoforme down-regolate e da circa +1.8 a +1311 per quelle up-regolate; nella condizione C vs B (-Si vs CO₂) i valori di log₂ fold change vanno da circa -501 a -4.9 per le isoforme down-regolate e da circa +6.0 a +194 per quelle up-regolate; nella condizione D vs B (-N vs CO₂) i valori di log₂ fold change vanno da circa -266 a -2.3 per le isoforme down-regolate e da circa +2.5 a +199 per quelle up-regolate.

La figura 1 è una heatmap che mostra che le repliche biologiche utilizzate per l'assemblaggio *de novo* del trascrittoma e la quantificazione dei livelli dell'espressione dei trascritti si raggruppano in accordo con il disegno sperimentale e quindi sono buoni triplicati biologici. I campioni 1, 2 e 3 sono il triplicato biologico della condizione Aria (A); i campioni 4, 5 e 6 si riferiscono alla condizione CO₂ (B); mentre 7, 8 e 9 sono il triplicato della condizione -Si (C) e i campioni 10, 11 e 12 si riferiscono alle repliche biologiche della condizione -N (D).

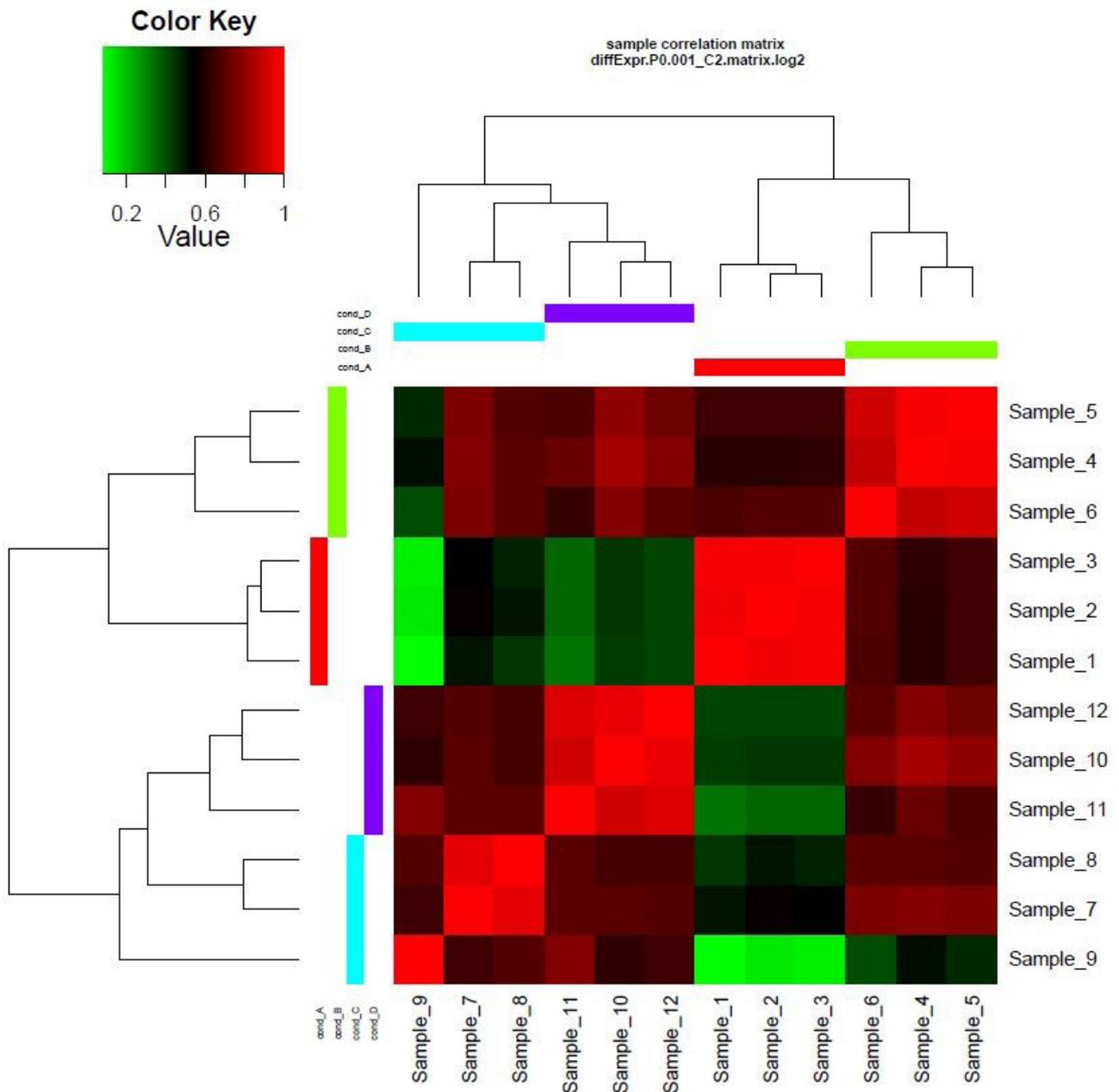


Figura 1 – Heatmap che mostra la distanza euclidea tra i campioni utilizzati per l’analisi differenziale del trascrittoma

Le sequenze dei trascritti assemblati *de novo* sono stati tradotti in proteine con l’utilizzo del software Transdecoder (lunghezza minima 100 aa). Utilizzando i Transcript ID e il database Uniprot è stato possibile ricavare i nomi e la funzione delle proteine conosciute, se note per omologia con altri organismi. Per assegnare le proteine note agli specifici pathway è stato usato il database KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) e i pathway di *T. pseudonana* come riferimento.

Un dato importante da tenere in considerazione è che comunque il genoma e il trascrittoma completo di *C. cryptica* non sono noti e che una parte delle isoforme differentemente espresse nelle varie condizioni sperimentali, sia up che down-regolate, per ora non è stato possibile identificarle per omologia con sequenze proteiche a funzione nota. Comunque in generale si è osservata l'omologia delle proteine di *C. cryptica* con una vasta gamma di altri organismi, più o meno complessi, in accordo con quanto riportato da Armbrust *et al.* (2004) (Figura 2).

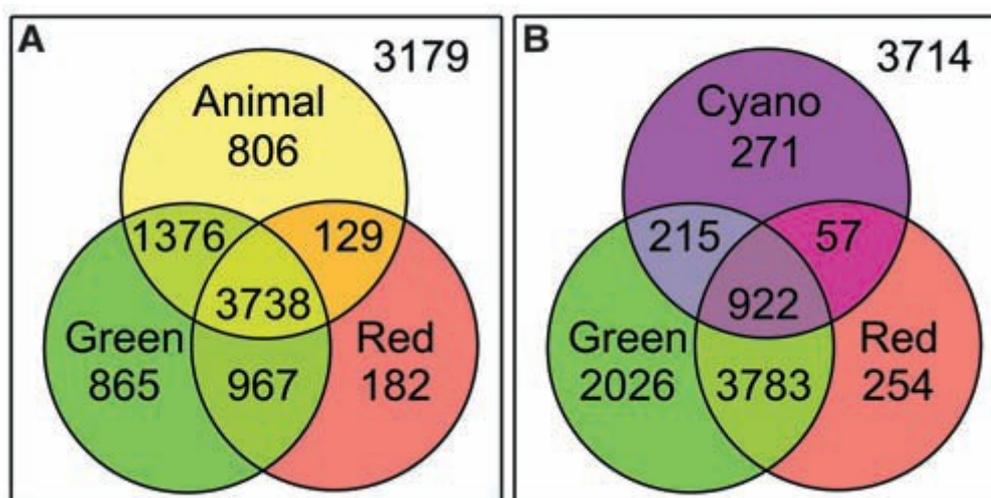


Figura 2 – Diagrammi che mostrano l'omologia delle proteine delle diatomee (punteggi BLAST ≥ 100) con altri organismi. (A) Il diagramma mostra la distribuzione dell'omologia delle proteine di *T. pseudonana* con quelle di *A. thaliana* (una pianta, verde), *Cyanidioschyzon merolae* (un'alga rossa, rosso) o *Mus musculus* (un animale, giallo); (B) La stessa cosa del diagramma precedente, ma con *Nostoc* sp. PCC 7120 (un cianobatterio, viola) invece di *M. musculus*. Il numero al di fuori dei cerchi indica le proteine di *T. pseudonana* senza omologia con i proteomi esaminati (Armbrust *et al.* 2004)

5.2.2 Analisi differenziale dei livelli di espressione delle isoforme nella condizione B vs A (CO_2 vs Aria)

Come mostrato nella tabella 3, l'analisi del trascrittoma delle cellule di *C. cryptica* cresciute con CO_2 , con le sue 1114 isoforme up-regolate, permette di osservare come la presenza della CO_2 comporti in un certo senso un'attività metabolica più accelerata all'interno della cellula.

Interessante è l'up-regolazione di una isoforma di “transitional endoplasmic reticulum ATPase TER94, EC 3.6.4.6” (FC circa +10), che è necessaria per la frammentazione del Golgi durante la mitosi e per il suo riassetto subito dopo.

Nei percorsi metabolici strettamente collegati all'attività fotosintetica sono risultate diversamente up-regolate varie isoforme, come la “cytochrome c6”, che si trova nei tilacoidi e funziona come trasportatore di elettroni tra il citocromo b6-f legato alla membrana e il PSI; come isoforme presenti all'interno dei complessi di cattura della luce (“chlorophyll a-b binding protein L1818” e “fucoxanthin-chlorophyll a-c binding protein”, tutte isoforme del cloroplasto) ed enzimi catabolici della clorofilla (“pheophytinase, chloroplastic, EC 3.1.1.-”), probabilmente coinvolti nel loro insieme in una stimolazione della cattura della luce e nel riarrangiamento dei sistemi antenna nell'ottica di una maggiore efficienza fotosintetica in un più veloce metabolismo cellulare.

Tra le isoforme up-regolate, ma la cui funzione non rientra in uno specifico pathway metabolico, vi sono varie proteine presenti nelle membrane con funzione di canali o con ruoli di trasporto, come ad esempio la “mechanosensitive ion channel protein 10”, che è un canale meccanosensibile che si apre in risposta alle forze di tensione nello strato lipidico della membrana o più isoforme (con diversi valori di FC, anche fino a circa +13) della “choline transporter-like protein 2” coinvolta nella sintesi della fosfatidilcolina, che è uno dei più importanti componenti delle membrane biologiche. L'up-regolazione di tali isoforme può essere legata alla maggiore biomassa presente in condizione CO₂ rispetto alla crescita con sola aria e quindi alla necessità di una maggiore sintesi delle componenti delle nuove membrane cellulari (capitolo 4, paragrafo 4.2.1).

Per quanto riguarda le isoforme down-regolate, ne sono state individuate sia alcune associate alla degradazione delle proteine via ubiquitina che a loro modificazioni post-traduzionali, come la glicosilazione delle proteine, la fosforilazione e il riarrangiamento dei ponti disolfuro, così come isoforme associate alla biosintesi delle proteine e al loro trasporto.

All'interno dei percorsi metabolici specifici, l'analisi differenziale del trascrittoma ha permesso di individuare come up-regolate varie isoforme strettamente collegate a diversi pathway del metabolismo dei carboidrati, che quindi, nel suo insieme, ne risulta stimolato.

Tra gli esempi più importanti di isoforme up-regolate, ci sono quelle presenti all'interno del ciclo dell'acido citrico (Figura 3) come la "probable citrate synthase, mitochondrial, EC 2.3.3.1" (reazione 1) con la funzione di catalizzare la reazione di condensazione tra l'acetil-CoA (a due atomi di C) e una molecola di ossalacetato (a quattro atomi di C) per formare il citrato (a sei atomi di C), la "fumarate hydratase class I, aerobic, EC 4.2.1.2" (reazione 7) che catalizza la conversione del fumarato in malato e la "malate dehydrogenase, cytoplasmic, EC 1.1.1.37" (reazione 8) con la funzione di catalizzatore della reazione che porta alla conversione del malato in ossalacetato (Figura 3).

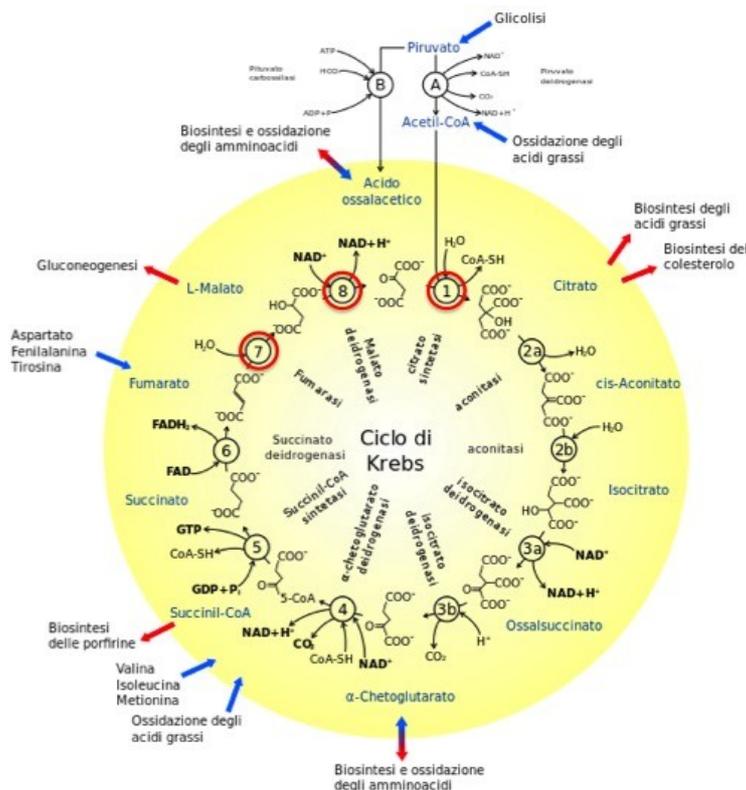


Figura 3 – Classico ciclo dell'acido citrico. I cerchi in rosso (1, 7 e 8) indicano le tre reazioni enzimatiche up-regolate. Le frecce rosse indicano le vie metaboliche verso le quali possono spostarsi gli intermedi del ciclo, mentre le blu quelle che sostengono la produzione degli intermedi stessi

Quindi nell'insieme, all'interno del percorso metabolico legato a glicolisi/gluconeogenesi/ciclo dell'acido citrico, vi è una up-regolazione delle reazioni iniziali e finali del ciclo dell'acido citrico con la conversione dell'acetil-CoA in citrato e infine ossalacetato, di cui è down-regolata (tramite la "phosphoenolpyruvate carboxykinase, EC 4.1.1.49") la conversione in fosfoenolpiruvato e quindi lo spostamento verso la glicolisi. La up-regolazione della produzione di citrato è importante perché può essere indirizzato verso la sintesi di steroli e acidi grassi, e lo stesso ossalacetato, prodotto finale del ciclo, è importante per sostenere e ricominciare il ciclo stesso. Può essere appunto indirizzato anche verso la glicolisi, ma nella condizione CO₂ è down-regolato tale spostamento.

Sono risultate up-regolate anche diverse isoforme che lavorano all'interno del citoplasma e sono strettamente collegate con il metabolismo lipidico, come l'"acyl-CoA-binding domain-containing protein 6", che lega le molecole di acil-coenzima A a lunga catena con una forte preferenza per i C18:1-CoA insaturi, una bassa affinità per i C20:4-CoA, un'affinità molto debole per i C16:0-CoA, mentre non lega gli acidi grassi (FC +17); un'isoforma di "acyl carrier protein" (ACP), che è il trasportatore di catene di acidi grassi coinvolto nella biosintesi degli acidi grassi; la "phosphatidylinositol transfer protein CSR1", anch'essa coinvolta nel trasporto dei lipidi; una isoforma di "protein spinster", che funge da trasportatore degli sfingolipidi.

Invece all'interno degli specifici pathway del metabolismo lipidico sono risultate up-regolate varie isoforme, di cui le più importanti sono coinvolte nella biosintesi degli acidi grassi ("pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, EC 1.2.4.1", "acetyl-CoA carboxylase, EC 6.4.1.2", "malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial, EC 2.3.1.39", "3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ, EC 4.2.1.59").

Per quanto riguarda i loro ruoli, la prima fa parte del complesso della piruvato deidrogenasi, che catalizza la conversione del piruvato ad acetil-CoA e CO₂, generando quindi l'acetil-coenzima A utilizzato come unità di base per la costruzione degli acidi grassi (Figura 4); la seconda catalizza la reazione iniziale della biosintesi degli acidi grassi, che è anche quella che regola la velocità dell'intero processo biosintetico; la terza catalizza il trasferimento dei motivi malonilici dal

malonil-CoA al braccio di fosfopanteteina della proteina ACP mitocondriale (di cui una isoforma precedentemente elencata risulta up-regolata); l'ultima è coinvolta nella sintesi degli acidi grassi insaturi.

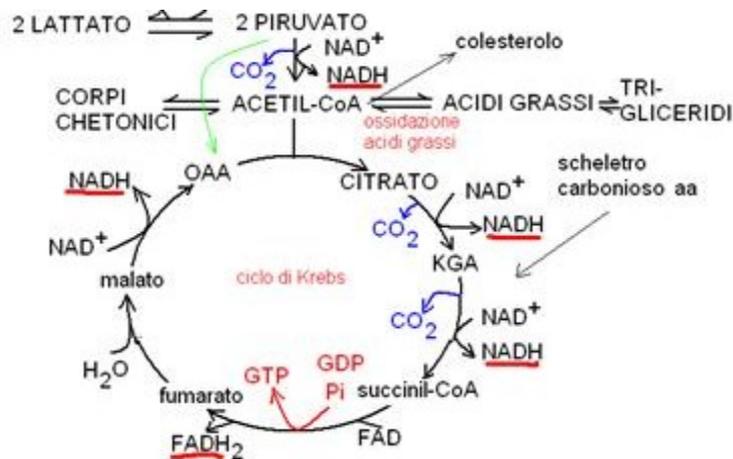


Figura 4 – La piruvato deidrogenasi converte il piruvato ad acetil-CoA, che può essere sia indirizzato verso il ciclo dell'acido citrico che verso la sintesi degli acidi grassi

Risulta up-regolata anche una isoforma della “acyl-CoA synthetase family member 3, mitochondrial, EC 6.2.1.-”, che catalizza la reazione iniziale della sintesi degli acidi grassi mitocondriale, attivando malonato e metilmalonato, ma non acetato, nei rispettivi tioesteri-CoA.

Nel processo di elongazione degli acidi grassi è invece coinvolta la “very-long-chain enoyl-CoA reductase, EC 1.3.1.93”, che si trova nel reticolo endoplasmatico e catalizza l'ultima delle quattro reazioni del ciclo di allungamento degli acidi grassi a lunga catena ed è necessaria per l'allungamento dei precursori degli acidi grassi di sfingolipidi e lipidi di riserva.

Nel percorso metabolico legato ai glicerofosfolipidi, sono up-regolate isoforme dell'enzima “cardiolipin synthase (CMP-forming), EC 2.7.8.41” (FC +22), che catalizza la formazione della cardiolipina, un fosfolipide chiave nelle membrane mitocondriali, trasferendo un gruppo fosfatidilico dal CDP-diacilglicerolo al fosfatidilglicerolo (PG); della “CDP-diacilglicerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase, mitochondrial, EC 2.7.8.5”, anch'essa coinvolta

nella biosintesi dei fosfolipidi anionici, dei fosfatidilgliceroli e della cardiolipina; della “glycerophosphoryl diester phosphodiesterase, EC 3.1.4.46”.

Sempre nell’ottica di una stimolazione della sintesi di importanti lipidi componenti delle membrane, visto l’aumento delle biomasse riscontrate nella condizione CO₂ rispetto alla condizione di sola aria, è da ricordare anche l’up-regolazione della “ceramide synthase, EC 2.3.1.24”.

Inoltre è stata osservata l’up-regolazione anche di una isoforma di un inibitore della fosfolipasi A2 (PLA2) (“annexin A3, EC 3.1.4.43”, FC circa +10): nello specifico, la PLA2 riconosce il legame acilico *sn*-2 dei fosfolipidi e ne induce la catalisi idrolitica rilasciando acido arachidonico e lisofosfolipidi.

In generale nelle microalghe e nelle diatomee, che sono caratterizzate dalla presenza degli organelli cellulari, la situazione è complessa, in quanto per esempio in *C. reinhardtii* sono state identificate più isoforme della fosfoenolpiruvato carbossilasi (PEPC, EC 4.1.1.32), alcune sensibili ai livelli di carbonio oltre a quelli di azoto inorganico. Anche sei omologhi della piruvato chinasi (EC 2.7.1.40) e cinque della malato deidrogenasi (EC 1.1.1.37) sono presenti nel genoma di *C. reinhardtii* e mostrano differenti livelli di espressione in varie condizioni sperimentali. Questi risultati sottolineano la complessità del metabolismo di questi organismi e la necessità di caratterizzare i sistemi anche a livello proteico/enzimatico (de Jesús Paniagua-Michel *et al.* 2015).

5.2.3 Analisi differenziale dei livelli di espressione delle isoforme nella condizione C vs B (-Si vs CO₂)

Il silicio svolge ruoli importanti in ambito biologico, soprattutto per le diatomee, ma a livello molecolare poco si sa sulla sua influenza a livello cellulare.

Ad oggi, nessun enzima ha dimostrato di avere l’attività alterata direttamente dalla presenza o dall’assenza del silicio, anche se è stato dimostrato che nelle diatomee le anidrasi carboniche utilizzano la silice come agente tampone (Shrestha *et al.* 2012).

Nelle diatomee i tre principali processi cellulari che coinvolgono direttamente il silicio sono il ciclo cellulare, il trasporto del silicio stesso e la sintesi della parete cellulare (Shrestha *et al.* 2012).

In particolare, l'analisi differenziale del trascrittoma effettuata sui campioni di *C. cryptica* cresciuta in deprivazione selettiva di silice con CO₂ al 10% in comparazione con un controllo cresciuto nelle stesse condizioni ma con tutti i nutrienti necessari, ha evidenziato la presenza di una serie di isoforme down-regolate che fanno parte del complesso antenna presente nei cloroplasti per la cattura della luce (LHC) come la “fucoxanthin-chlorophyll a-c binding protein, chloroplastic”, la “chlorophyll a-b binding protein 1B-21”, la “chlorophyll a-b binding protein 7, chloroplastic”, la “chlorophyll a-b binding protein L1818, chloroplastic” o attività enzimatiche ad esse associate come la “pyridoxal reductase, chloroplastic, EC 1.1.1.65”, l’”oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, chloroplastic, EC 1.3.3.3” con un FC circa -16, la “pheophytinase, chloroplastic, EC 3.1.1.-” e l’”ubiquinol oxidase 4, chloroplastic/chromoplastic, EC 1.10.3.11”, che è coinvolta nella biogenesi del cloroplasto. Una generale down-regolazione dei sistemi antenna e quindi dell'attività fotosintetica potrebbe essere associata all'arresto della crescita cellulare osservata in carenza di silicio.

Così come down-regolata è la “nucleoside diphosphate kinase, EC 2.7.4.6”, che ha un ruolo importante nella sintesi dei nucleosidi trifosfati nell'ambito del metabolismo delle purine e delle pirimidine, lasciando ipotizzare una ridotta necessità di sintesi di nuovi acidi nucleici, deputati alla conservazione e al trasporto dell'informazione genetica, proprio a causa del blocco della divisione cellulare.

Tutt'oggi rimangono pochi gli studi dettagliati della regolazione del metabolismo lipidico nelle diatomee in condizioni di limitazione di silicio al fine di manipolarlo per incrementare la produzione dei lipidi stessi. In condizioni di limitazione di Si, sia dai dati mostrati nei precedenti capitoli (capitolo 4, paragrafi 4.2.3 e 4.2.4) che da lavori di letteratura (Obata *et al.* 2013), si evince che *C. cryptica* presenta livelli elevati di lipidi neutri e una maggiore quantità di acidi grassi saturi e monoinsaturi rispetto a colture in cui questo elemento non è limitante.

Nell’ambito dei pathway del metabolismo lipidico, risultano up-regolate varie isoforme differenti della proteina “3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial, EC 2.3.1.16”, con valori di FC tra +7 e +14, che risultano coinvolte nel processo di elongazione e degradazione degli acidi grassi (Figura 5). Le tiolasi, note anche come acetiltransferasi acetil-coenzima A (ACAT), sono enzimi che convertono due unità di acetil-CoA in acetoacetile-CoA all’interno della via del mevalonato. Negli eucarioti, ci sono due forme di 3-chetoacil-CoA tiolasi: una situata nei mitocondri e l’altra nei perossisomi; l’isoforma up-regolata nel caso di *C. cryptica* in condizione di -Si è quella mitocondriale.

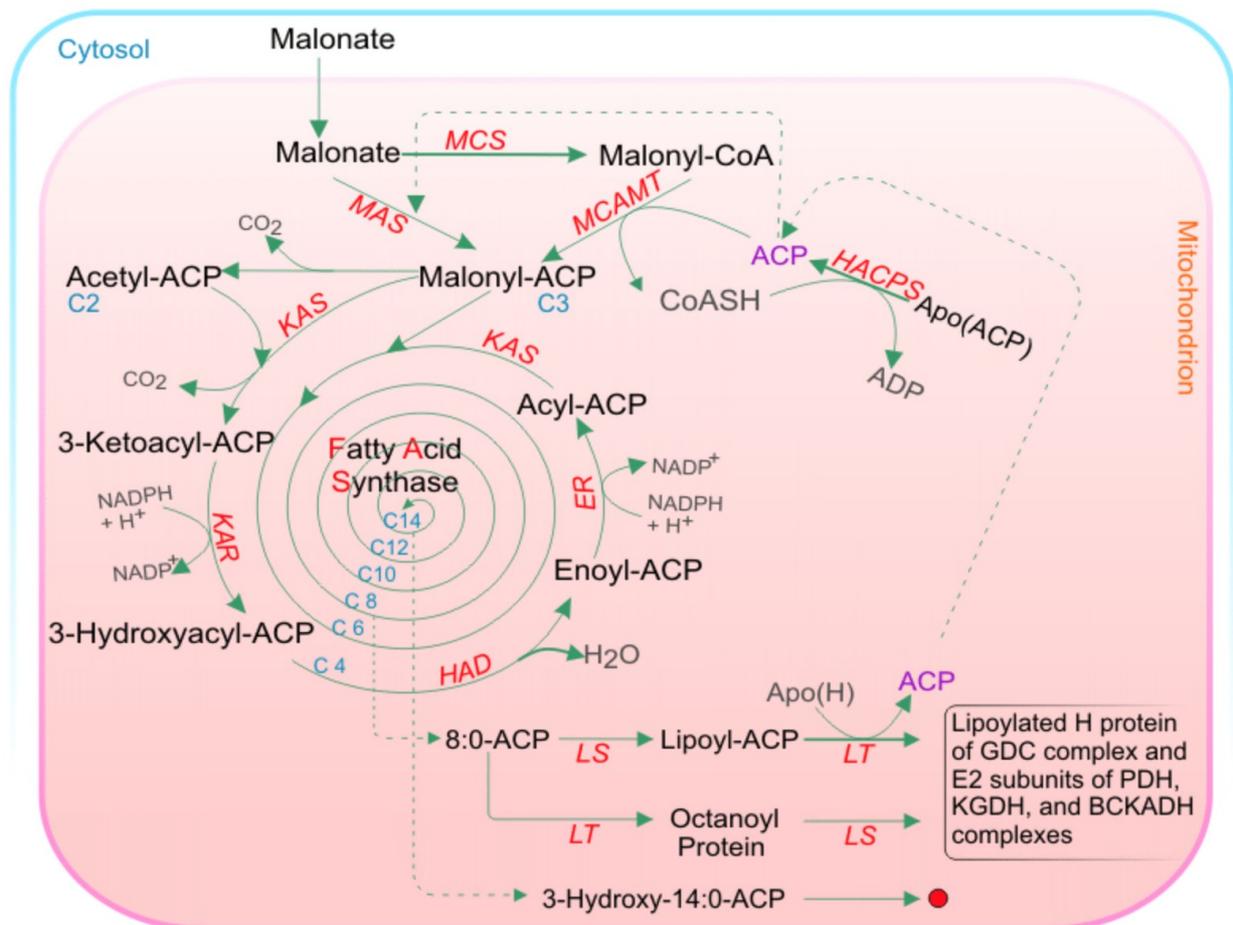


Figura 5 – Pathway mitocondriale della sintesi degli acidi grassi che parte dal malonato e nella quale è coinvolta la 3-ketoacyl-CoA thiolase, mitocondriale (EC 2.3.1.16) (Li-Beisson *et al.* 2010)

Un'altra isoforma enzimatica risultata up-regolata in condizione di deprivazione di silicio è stata la “malonyl-CoA decarboxylase, EC 4.1.1.9” (FC +12), presente all'interno della matrice mitocondriale e coinvolta nella biosintesi degli acidi grassi con la funzione principale di catalizzare la conversione del malonil-CoA in acetil-CoA e anidride carbonica (Figura 6).



Figura 6 – Reazione catalizzata dalla malonil-CoA decarbossilasi (EC 4.1.1.9)

Un'altra attività up-regolata è la “uncharacterized acyltransferase C1718.04, EC 2.3.-.-”, che catalizza l'aggiunta di una catena acilica in posizione 1 del glicerolo-3-fosfato, importante quindi nella biosintesi dei lipidi complessi.

Nel percorso metabolico legato ai glicerofosfolipidi, sono down-regolate varie isoforme dell'enzima “cardiolipin synthase (CMP-forming), EC 2.7.8.41”, che catalizza la formazione della cardiolipina, importante nell'ambito delle membrane mitocondriali e la cui down-regolazione anche può essere legata al blocco della divisione cellulare.

All'interno dei percorsi metabolici dei carboidrati le isoforme individuate risultano per lo più down-regolate: ciò è in linea con la minore percentuale della componente dei carboidrati presente nella biomassa cresciuta in condizione di deprivazione selettiva di silicio rispetto alla coltura CO₂.

Quindi ciò confermerebbe che l'accumulo dei lipidi in *C. cryptica* determinato dalla carenza di silicio potrebbe essere dovuto in parte ad un cambiamento del prodotto finale verso il quale è indirizzato il carbonio di nuova fissazione, in modo che una maggiore percentuale di questo elemento vada verso i lipidi e una percentuale inferiore sia immagazzinata nei crisolaminarani, principali carboidrati di riserva delle diatomee (Liu e Benning 2013).

5.2.4 Analisi differenziale dei livelli di espressione delle isoforme nella condizione D vs B (-N vs CO₂)

L'assorbimento dell'azoto nelle diatomee è direttamente collegato al metabolismo del carbonio in quanto l'assimilazione di N richiede ATP e riducenti derivati dalla fotosintesi e scheletri carboniosi derivati dal ciclo dell'acido citrico (Falkowski e Stone 1975).

Come dimostrato anche dalle analisi biochimiche riportate nel capitolo 4 (paragrafo 4.2.3), quando la crescita delle diatomee è limitata dalla disponibilità di nitrato, i livelli di proteine e la concentrazione di azoto cellulare diminuiscono innescando un processo di riciclaggio dell'azoto intracellulare e l'accumulo di composti ricchi di carbonio, come i lipidi (Allen *et al.* 2011; Hockin *et al.* 2012).

L'analisi differenziale del trascrittoma di biomasse di *C. cryptica* poste in deprivazione di azoto ha individuato diverse isoforme down-regolate presenti nel cloroplasto e strettamente collegate all'attività fotosintetica, in particolare alla biosintesi dei gruppi eme e della clorofilla ("geranylgeranyl diphosphate reductase, chloroplastic, EC 1.3.1.83"), delle xantofille ("cytochrome P450 97B3, chloroplastic, EC 1.14.-.-"), alle proteine del complesso antenna ("chlorophyll a-b binding protein 7, chloroplastic") ed altre presenti nella membrana dei tilacoidi e che servono in generale per il trasporto degli elettroni o fanno parte dei sistemi LHC, che funzionano come accettori della luce, catturando e inviando l'energia di eccitazione ai fotosistemi ai quali sono strettamente associati. Questi dati possono essere spiegati con una degradazione della clorofilla indotta dalla deprivazione di azoto, perché in questo modo le cellule cercano di recuperare questo elemento comunque essenziale da altre fonti, inducendo di conseguenza una generale riduzione della fotosintesi.

Quindi l'effetto primario della deprivazione di azoto è la sua ridotta disponibilità, sebbene questo sia un nutriente essenziale per la sintesi *de novo* degli amminoacidi, degli acidi nucleici e di vari altri costituenti cellulari. Non sorprende, quindi, che la sua deprivazione influenzi i livelli di trascrizione di geni coinvolti nell'assimilazione e nel metabolismo dell'azoto. Infatti sono down-

regolate alcune isoforme coinvolte nei pathway metabolici dei vari amminoacidi e nella riduzione dei nitrati (FC -31), come anche proteine di membrana con funzione di trasporto dell'ammonio e così come altre isoforme impiegate in altri percorsi metabolici legati comunque a composti azotati, come il metabolismo della β -alanina e di taurina e ipotaurina.

Sono risultate down-regolate anche isoforme che si trovano nel citoplasma come “metiltransferasi”, coinvolte anche nella riparazione di proteine danneggiate, così come altre proteine normalmente presenti nel periplasma e che sono impegnate nel ripiegamento delle proteine (“peptidyl-prolyl cis-transisomerase, EC 5.2.1.8”). Down-regolate sono anche isoforme presenti nel RE che catalizzano la formazione post-traduzionale della 4-idrossiprolina e la “37S ribosomal protein S24, mitochondrial” che invece si trova nel mitocondrio ed è coinvolta nella traduzione delle proteine mitocondriali.

Nell'ambito del metabolismo lipidico nei campioni in deprivazione di azoto di *C. cryptica* una isoforma della “diacylglycerol O-acyltransferase 2, EC 2.3.1.20” (DGAT) risulta up-regolata con un FC +21. Tale enzima si trova nel reticolo endoplasmatico e catalizza il passaggio finale nella sintesi dei TAG usando diacilglicerolo e acil-CoA come substrati (Figure 7 e 8).

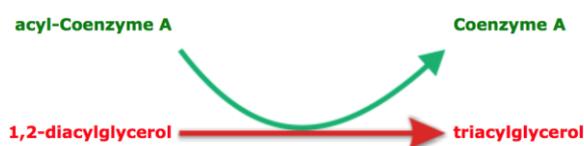


Figura 7 – Schematizzazione delle reazioni catalizzate dalla diacilglicerolo O-aciltransferasi 2 (EC 2.3.1.20)

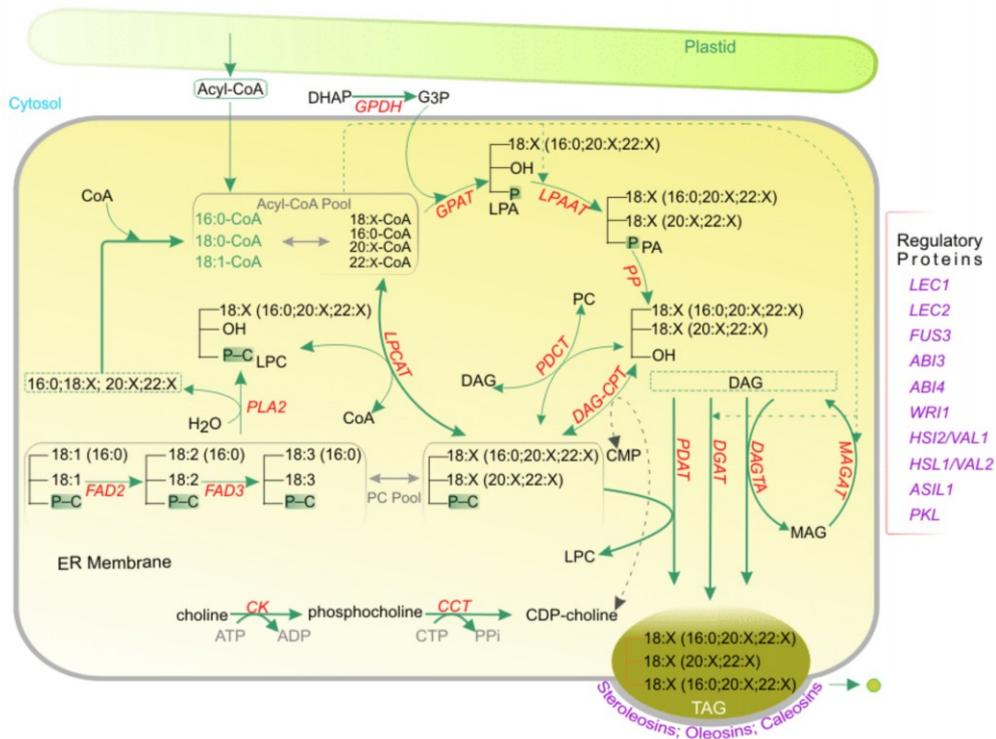


Figura 8 - Sintesi dei triacilgliceroli in *A. thaliana*. Abbreviazioni: DGAT, acil-CoA:diacilglicerolo aciltransferasi (EC 2.3.1.20) (Li-Beisson *et al.* 2010)

In diatomee come *P. tricornutum* le diverse funzioni e caratteristiche dell'enzima DGAT devono essere ancora ulteriormente caratterizzate. Recentemente due proteine, DGAT1 (Guihéneuf *et al.* 2011) e DGAT2 (Gong *et al.* 2013), sono state caratterizzate, ma l'identificazione di altre isoforme di questo enzima è ancora da completare. E' stato riportato che la sovraespressione di una isoforma di DGAT2 in *P. tricornutum* aumentava il contenuto in lipidi neutri del 35%. Inoltre è stato dimostrato che questa isoforma di DGAT2 svolge funzioni molteplici, non solo per l'accumulo di lipidi neutri, ma anche per la determinazione della composizione in acidi grassi in quanto la sua sovraespressione ha aumentato i livelli di PUFA del 34.8% (Niu *et al.* 2013).

Il risultato è in accordo con la sovraespressione del gene codificante per una isoforma della DGAT1 di *T. pseudonana* in un ceppo di lievito mutante che non possedeva la sintesi dei TAG e la cui composizione in acidi grassi è stata modificata anche mediante l'incorporazione di acidi grassi polinsaturi a lunga catena (EPA e DHA) nei TAG (Xu *et al.* 2013).

Anche “long-chain-fatty-acid-[acyl-carrier-protein] ligase, EC 6.2.1.20”, situate all’interno del cloroplasto e coinvolte nell’attivazione degli acidi grassi, sono risultate up-regolate con valori di FC oscillanti tra +10 e +30. Up-regolata è anche una “putative long-chain-fatty-acid--CoA ligase, EC 6.2.1.3” con valori di fold change anche di +22.

Così come up-regolati (FC +22) sono risultate varie isoforme di “phosphatidylcoline:diacylglycerol cholinephosphotransferase 1, EC 2.7.8.-“ (FC da +15 a +29) e l’”1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase 1, chloroplastic, EC 2.3.1.51” (FC +25) (LPAAT). La prima è coinvolta nel trasferimento del gruppo di testa fosfocolina dalla fosfatidilcolina (PC) ai diacigliceroli, nella reazione principale per il trasferimento dei C18:1 nella fosfatidilcolina e anche nel trasferimento dei 18:2 e 18:3 verso la sintesi dei TAG; la seconda, presente nel cloroplasto, è deputata a convertire l’acido lisofosfatidico (LPA) in acido fosfatidico incorporando acili in posizione *sn*-2 con preferenza per i substrati C:16-CoA (Figure 9 e 10) confermando la via procariotica per la biosintesi dei glicerofosfolipidi e ipotizzata osservando i dati dell’analisi lipidomica per gli MGDG e i PG delle prove di deprivazione selettiva (capitolo 4, paragrafo 4.2.4).

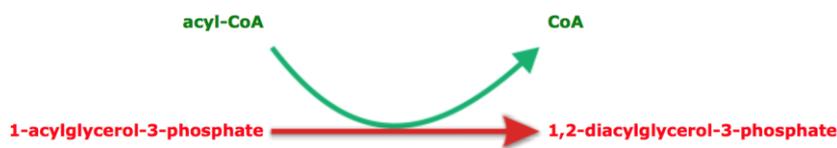


Figura 9 – Schematizzazione delle reazioni catalizzate dalla 1-acil-sn-glicerolo-3-fosfato aciltransferasi (EC 2.3.1.51)

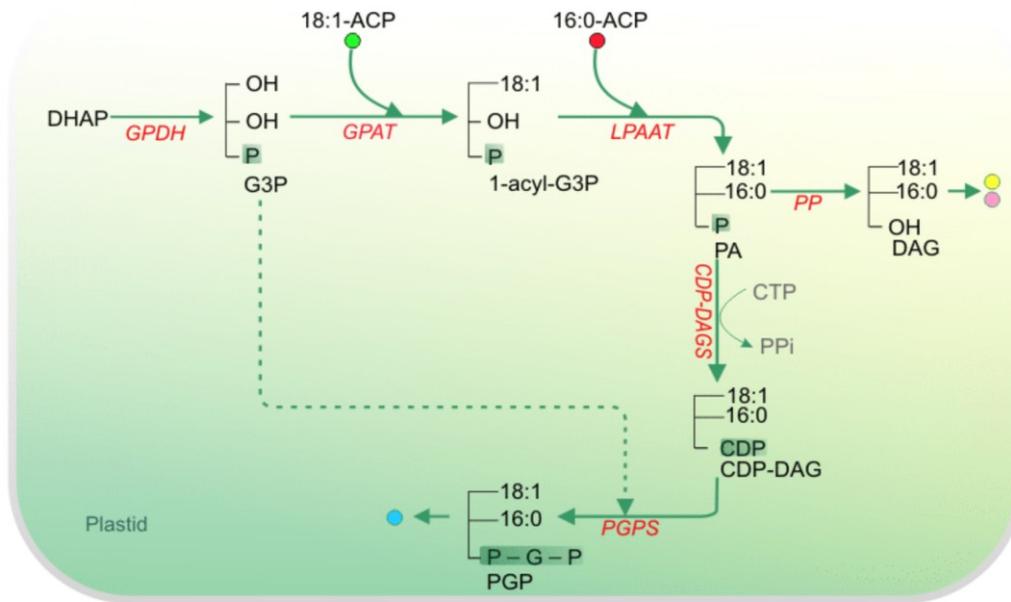


Figura 10 – Pathway di formazione dei diacilgliceroli: la reazione catalizzata dalla 1-acil-sn-glicerolo-3-fosfato aciltransferasi (EC 2.3.1.51) è quella indicata dal pallino rosso (Li-Beisson *et al.* 2010)

Dall'analisi differenziale del trascrittoma si evince che sono up-regolate isoforme coinvolte nel metabolismo lipidico, come l'"acyl-CoA-binding domain-containing protein 6", che si trova nel citoplasma ed è un trasportatore, presumibilmente coinvolto nella biosintesi degli acidi grassi, che lega molecole di acil-CoA a lunga catena con una forte preferenza per i C18:1-CoA insaturi. Infatti l'analisi lipidomica (capitolo 4, paragrafo 4.2.4) ha mostrato la presenza di alte percentuali di tali acidi grassi nella componente fosfolipidica dei campioni di *C. cryptica* cresciuta in deprivazione di nitrati. Inoltre tale isoforma alla preferenza nel legare molecole di C:18 acil-CoA affianca una più bassa affinità per i C20:4-CoA insaturi e un'affinità molto debole per i C16:0-CoA saturi che l'analisi di spettrometria di massa ha mostrato avere valori di \log_2 fold change significativamente negativi, in particolare nella componente glicolipidica di MGDG e DGDG rispetto alle stesse classi del campione CO₂.

Ad ogni modo la carenza di azoto ha probabilmente un impatto diverso sulle attività metaboliche rispetto alla limitazione da silicio. Ad esempio, è stato dimostrato che la sintesi proteica *de novo* è necessaria per l'aumento dell'attività della ACCasi indotta da limitazione di nutrienti in *C. cryptica*

(Roessler 1988). Se la sintesi proteica, necessaria per creare altri enzimi per la produzione di TAG, è influenzata negativamente dalla limitazione dei nitrati, allora c'è la possibilità che l'induzione dell'accumulo di TAG in deprivazione di N si verifichi per vie diverse rispetto ai processi che si attivano in deprivazione di silicati (Yu *et al.* 2009).

San Pedro *et al.* (2013) riporta che la deprivazione di azoto può stimolare l'attività della diacilglicerolo aciltransferasi (EC 2.3.1.20). Inoltre riporta il ruolo importante dell'enzima ribulosio-1,5-difosfato carbossilasi/ossigenasi in condizioni limitative di azoto, in quanto agirebbe come fonte di azoto nelle prime fasi della deprivazione supportando la divisione cellulare. L'incremento nel contenuto di lipidi neutri in condizione di limitazione di azoto è supportato dal fatto che questa classe di lipidi gioca un importante ruolo protettivo per prevenire i danni da fotoossidazione delle cellule.

5.3 CONCLUSIONI

Nonostante il grande interesse ecologico che c'è sulle diatomee, sono ancora relativamente pochi i dati molecolari su questo gruppo di organismi. Lo scopo di questa parte dello studio è stato l'assemblaggio *de novo* del trascrittoma di *C. cryptica* e l'analisi dell'espressione differenziale dei trascritti ottenuti nelle condizioni sperimentali che nell'analisi lipidomica hanno evidenziato variazioni interessanti nelle catene aciliche.

Se si considera il numero di isoforme che nell'insieme sono differenzialmente espresse, il fattore CO₂ è stato più significativo nell'influenzare l'espressione genica rispetto alle singole deprivazioni selettive di azoto o silicio.

In generale l'insufflazione di CO₂ rispetto alla crescita in presenza di aria ha portato all'up-regolazione di varie isoforme collegate ai sistemi antenna di cattura della luce, nell'ottica di una maggiore efficienza fotosintetica in un più veloce metabolismo e divisione cellulare. Isoforme up-

regolate sono presenti anche nel ciclo dell'acido citrico e nel metabolismo lipidico, sia a livello enzimatico nella biosintesi degli acidi grassi che nell'ambito di trasportatori specifici.

Tale maggiore stimolazione generale del ciclo di divisione cellulare potrebbe essere in parte responsabile dell'aumento di biomassa ottenuto nella condizione CO₂ rispetto alla crescita in presenza di aria.

L'analisi differenziale del trascrittoma effettuata sui campioni di *C. cryptica* cresciuta in deprivazione selettiva di silicio con CO₂ al 10% utilizzando come confronto le cellule cresciute con tutti i nutrienti necessari, ha evidenziato la presenza di una serie di isoforme down-regolate nell'ambito del metabolismo delle purine e delle pirimidine e nel complesso antenna presente nei cloroplasti per la cattura della luce (LHC), indicando una ridotta necessità di sintesi di nuovi acidi nucleici e una riduzione dell'attività fotosintetica probabilmente associata all'arresto della crescita cellulare osservata in carenza di silicio. Al contrario, sono up-regolate alcune isoforme legate al metabolismo lipidico, mentre per lo più sono down-regolate le isoforme individuate all'interno dei pathway metabolici dei carboidrati: ciò è in linea con la minore percentuale della componente dei carboidrati presente nella biomassa cresciuta in condizione di deprivazione selettiva di silicio rispetto alla coltura CO₂, in linea con uno spostamento del carbonio dai carboidrati verso la componente lipidica.

L'analisi differenziale del trascrittoma di biomasse di *C. cryptica* poste in deprivazione di azoto ha individuato diverse isoforme down-regolate strettamente collegate all'attività fotosintetica: ciò può essere spiegato con una degradazione della clorofilla indotta dalla deprivazione di azoto, perché in questo modo le cellule cercano di recuperare questo elemento comunque essenziale da altre fonti, inducendo di conseguenza una generale riduzione della fotosintesi.

Inoltre la deprivazione di nitrati influenza anche i livelli di trascrizione di geni coinvolti nell'assimilazione dell'azoto, nei pathway metabolici degli amminoacidi e in altri percorsi metabolici legati comunque a composti azotati.

Nell'ambito del metabolismo lipidico nei campioni in deprivazione di azoto di *C. cryptica* è da sottolineare l'up-regolazione della "diacylglycerol O-acyltransferase 2, EC 2.3.1.20", che catalizza il passaggio finale nella sintesi dei TAG usando diacilglicerolo e acil-CoA come substrati.

Comunque molte funzioni enzimatiche sono spesso legate a più geni che codificano per proteine che hanno attività ridondanti: nel genoma di *C. reinhardtii* almeno sei geni codificano per un'acil-CoA:diacilglicerolo aciltransferasi (EC 2.3.1.20) rispetto ai due geni noti che codificano per questa attività enzimatica in *A. thaliana*, suggerendo forse un ruolo di primo piano per il metabolismo lipidico nelle cellule microalgali con una complessità che potrebbe superare quella delle cellule vegetali (Liu e Benning 2013).

L'identificazione dei passaggi limitanti nelle varie vie metaboliche e uno studio approfondito della regolazione genetica dei geni interessati e degli enzimi della biosintesi dei lipidi può rivelarsi utile per il miglioramento del contenuto lipidico cellulare (Verma *et al.* 2010).

5.4 APPENDICE

Tabella 4 – Principali isoforme differentemente espresse nella condizione CO₂ vs Aria (B vs A)

PROVA	CONDIZIONE	ISOFORMA	FUNZIONE / PATHWAY	UP	DOWN
CO ₂ vs Aria	B vs A	transitional endoplasmic reticulum ATPase TER94 (EC 3.6.4.6)	Frammentazione / Riassetto Golgi	✓	
		cytochrome c6			
		chlorophyll a-b binding protein L1818	Fotosintesi	✓	
		fucoxanthin-chlorophyll a-c binding protein			
		pheophytinase, chloroplastic (EC 3.1.1.-)			
		mechanosensitive ion channel protein 10	Canali - Trasportatori	✓	
		choline transporter-like protein 2			
		probable citrate synthase, mitochondrial (EC 2.3.3.1)	Ciclo Acido Citrico	✓	
		fumarate hydratase class I, aerobic (EC 4.2.1.2)			
		malate dehydrogenase, cytoplasmic (EC 1.1.1.37)			
		phosphoenolpyruvate carboxykinase (EC 4.1.1.49)	Gluconeogenesi		✓
		acyl-CoA-binding domain-containing protein 6			
		acyl carrier protein			
		protein spinster			
		phosphatidylinositol transfer protein CSR1			
		pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha (EC 1.2.4.1)			
		acetyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.2)			
		malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial (EC 2.3.1.39)	Metabolismo lipidico	✓	
		3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ (EC 4.2.1.59)			
		acyl-CoA synthetase family member 3, mitochondrial (EC 6.2.1.-)			
		very-long-chain enoyl-CoA reductase (EC 1.3.1.93)			
		cardiolipin synthase (CMP-forming) (EC 2.7.8.41)			
		CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase, mitochondrial (EC 2.7.8.5)			
glycerophosphoryl diester phosphodiesterase (EC 3.1.4.46)					
ceramide synthase (EC 2.3.1.24)					
annexin A3 (EC 3.1.4.43)					

Tabella 5 – Principali isoforme differentemente espresse nella condizione –Si vs CO₂ (C vs B)

PROVA	CONDIZIONE	ISOFORMA	FUNZIONE / PATHWAY	UP	DOWN	
Senza silicati vs CO ₂	C vs B	fucoxanthin-chlorophyll a-c binding protein, chloroplastic	Fotosintesi			
		chlorophyll a-b binding protein 1B-21				
		chlorophyll a-b binding protein 7, chloroplastic				
		chlorophyll a-b binding protein L1818, chloroplastic				
		pheophytinase, chloroplastic (EC:3.1.1.-)				
		oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxidase, chloroplastic (EC:1.3.3.3)				
		ubiquinol oxidase 4, chloroplastic/chromoplastic (EC:1.10.3.11)	Metabolismo nucleotidi			
		nucleoside diphosphate kinase (EC:2.7.4.6)				
		3-ketoacyl-CoA thiolase, mitocondriale (EC 2.3.1.16)	Metabolismo lipidico		✓	
		malonyl-CoA decarboxylase (EC: 4.1.1.9)				
uncharacterized acyltransferase C1718.04 (EC:2.3.-.-)						
cardiolipin synthase (CMP-forming) (EC 2.7.8.41)						

Tabella 6 – Principali isoforme differentemente espresse nella condizione –N vs CO₂ (D vs B)

PROVA	CONDIZIONE	ISOFORMA	FUNZIONE / PATHWAY	UP	DOWN	
Senza nitrati vs CO ₂	D vs B	geranylgeranyl diphosphate reductase, chloroplastic (EC 1.3.1.83)	Fotosintesi		✓	
		cytochrome P450 97B3, chloroplastic (EC 1.14.-.-)				
		chlorophyll a-b binding protein 7, chloroplastic				
		metiltransferasi	Regolazione proteica			✓
		peptidyl-prolyl cis-transisomerase (EC 5.2.1.8)				
		37S ribosomal protein S24, mitochondrial	Metabolismo lipidico		✓	
		diacylglycerol O-acyltransferase 2 (EC 2.3.1.20)				
		long-chain-fatty-acid-[acyl-carrier-protein] ligase (EC 6.2.1.20)				
		putative long-chain-fatty-acid--CoA ligase (EC6.2.1.3)				
		phosphatidylcoline:diacylglycerol cholinephosphotransferase 1 (EC 2.7.8.-)				
1-acyl-sn-glycerolo-3-phosphate acyltransferase (EC 2.3.1.51)						
acyl-CoA-binding domain-containing protein 6						

6. SCALE-UP PRE-INDUSTRIALE DI COLTURE DI DIATOMEE PER LA PRODUZIONE DI BIO-OLI

6.1 INTRODUZIONE

6.1.1 Colture intensive di diatomee su grande scala

In generale le microalghe vivono in ambienti liquidi e per essere utilizzate efficacemente per la produzione di bio-oli e biodiesel necessitano di tecnologie specifiche. Tutti i processi esistenti per la crescita delle microalghe includono un'unità di produzione in cui crescere gli organismi, una metodologia di separazione delle cellule dalla soluzione liquida, un'unità di estrazione dei lipidi e la conversione dei lipidi in esteri metilici di acidi grassi (biodiesel) (Chisti 2007).

Per la produzione di microalghe sono teorizzate colture intensive su enormi superfici utilizzando o vasche aperte (open ponds) o fotobioreattori chiusi (Verma *et al.* 2010).

Queste strutture sono già state testate sia in laboratorio sia su scala industriale e presentano vantaggi e svantaggi comprovati da dati sperimentali. Le variabili operative che permettono di descrivere il comportamento di un sistema sia aperto che chiuso e che influiscono in maniera determinante sulla progettazione del reattore e sulle prestazioni dello stesso sono:

- l'area superficiale, molto importante in quanto descrive la superficie che può ricevere la radiazione luminosa per un volume dato di fotobioreattore. Inoltre è la superficie di scambio termico con l'ambiente esterno, quindi ha influenza sulla temperatura del sistema;
- la geometria del reattore è importante per determinare le caratteristiche meccaniche del sistema;
- l'illuminazione, per cui occorre valutare l'intensità e l'alloggiamento della lampada (se è prevista luce artificiale);
- il posizionamento del sistema di coltura all'interno di serre o ambienti climatizzati (colture indoor) o all'esterno (coltivazioni outdoor).

Dal punto di vista geometrico il sistema deve avere una conformazione tale da garantire anche altre caratteristiche tecniche come:

- riduzione degli angoli per evitare ristagni e accumulo di sporcizia;
- riduzione delle saldature per evitare perdite o cedimenti strutturali;
- presentare un'apertura superiore con filtro che garantisca un compromesso ottimale tra lo scambio di materia (necessario per l'allontanamento dell'O₂) e l'axenicità (ossia evitare le contaminazioni da parte di altre specie) (Wen e Johnson 2009).

Ci sono tre parametri comunemente utilizzati per valutare la produttività in una unità di produzione di microalghe:

- Produttività Volumetrica (VP): è la produttività per unità di volume del reattore (espressa in g L⁻¹ giorno⁻¹);
- Produttività Areica (AP): è la produttività per unità di superficie di terreno occupata dal reattore (espressa in g m⁻² giorno⁻¹);
- Produttività per Superficie Illuminata (ISP): è la produttività per unità di superficie illuminata del reattore (espressa in g m⁻² giorno⁻¹).

Nel confronto tra sistemi di crescita aperti e chiusi si osserva che, benché i sistemi chiusi non offrano vantaggi in termini di produttività superficiale, essi presentano una produttività volumetrica e il raggiungimento di una concentrazione cellulare maggiori rispetto ai sistemi aperti (rispettivamente, otto volte e sedici volte superiore) (Tabella 1) (Mata *et al.* 2010).

La scelta di come effettuare una coltivazione su grande scala dipende da diversi fattori: il terreno di coltura, la quantità d'acqua da usare, le sostanze nutritive, la temperatura e il prodotto finale che si vuole ottenere. Generalmente la scelta tra l'utilizzo di un sistema aperto o chiuso dipende principalmente dalla produttività (Tabella 1), comunque nonostante questa non sia a favore dei sistemi aperti, attualmente la produzione maggiore di microalghe su grande scala è fatta in vasche perchè sono poco costose e abbastanza semplici, durevoli e pratiche nella manutenzione e gestione (Pulz 2001).

Tabella 1 – Confronto tra le caratteristiche dei sistemi aperti e chiusi per le colture su grande scala delle microalghe (Pulz 2001)

	Sistemi chiusi (PBRs)	Sistemi aperti (ponds)
Controllo della contaminazione	Facile	Difficile
Rischio di contaminazione	Ridotto	Alto
Sterilità	Realizzabile	Nessuna
Controllo di processo	Facile	Difficile
Controllo delle specie	Facile	Difficile
Mescolamento	Uniforme	Molto basso
Modalità di funzionamento	Batch o semi-continuo	Batch o semi-continuo
Spazio richiesto	Dipende dalla produttività	PBRs ~ ponds
Rapporto area/volume	Alto (20-200 m ⁻¹)	Bassa (5-10 m ⁻¹)
Concentrazione di cellule	Alta	Bassa
Investimento	Alto	Basso
Costi operativi	Alti	Bassi
Costi capitali	3-10 volte superiore rispetto ai ponds	PBRs > ponds
Efficienza di utilizzo della luce	Alta	Basso
Controllo temperatura	Temperatura più uniforme rispetto ai sistemi aperti	Difficile
Produttività	3-5 volte superiore rispetto ai ponds	Bassa
Perdite d'acqua	Dipende dal sistema di raffreddamento	PBRs ~ ponds
Stress idrodinamico subito dalle microalghe	Basso-alto	Molto basso
Evaporazione del medium di crescita	Bassa	Alta
Controllo trasferimento gas	Alto	Basso
Perdite anidride carbonica	Dipendono dal pH, dall'alcalinità, etc.	PBRs ~ ponds
Inibizione da ossigeno	Problemi maggiori nei PBRs rispetto ai ponds	PBRs > ponds
Concentrazione di biomassa	3-5 volte superiore rispetto ai ponds	PBRs > ponds
Scale-up	Difficile	Difficile

6.1.2 Sistemi aperti: caratteristiche e limiti degli open ponds

I sistemi aperti rappresentano la più antica configurazione proposta per la produzione massiva di biomasse e sono ampiamente usati nei processi industriali. Di solito sono vasche circolari (circular ponds) o lunghi canali (raceway ponds) in cui un braccio rotante o delle pale tengono la coltura in agitazione (Figura 1) (Carvalho *et al.* 2006).

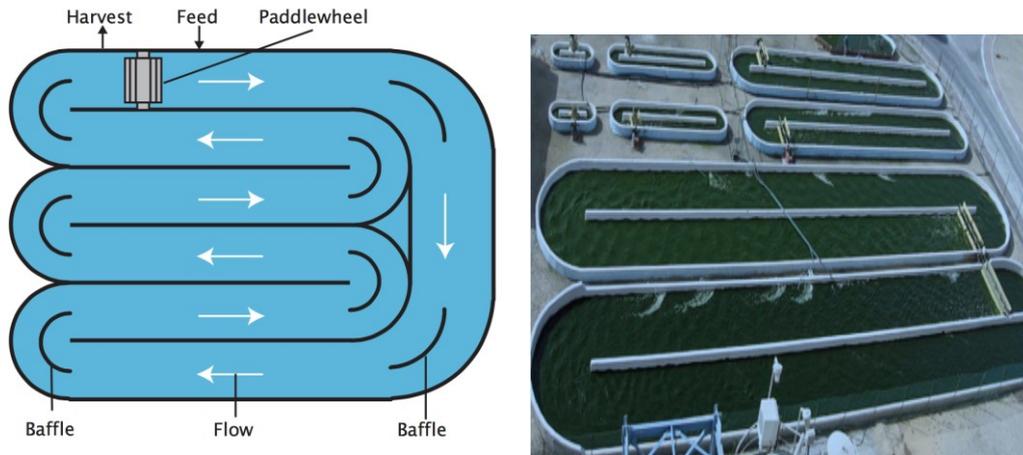


Figura 1 – Schema e foto di un raceway pond (Chisti 2007)

Questi sono sistemi adatti per la crescita di microalghe estremofile che tollerano particolari condizioni, come bassi/alti valori di pH o salinità. Generalmente la profondità è limitata per permettere un'efficace penetrazione della radiazione solare nella coltura: le profondità ottimali della vasca per ottenere concentrazioni di biomasse di 1 g di prodotto secco per litro e produttività di 60 - 100 mg L⁻¹ giorno⁻¹ (pari a 10 - 20 g m⁻² giorno⁻¹) variano tra 15 e 20 cm (de Jesús Paniagua-Michel *et al.* 2015).

Le vasche circolari sono bacini scavati nel terreno e resi impermeabili con membrane plastiche, in cui le microalghe crescono essenzialmente come fanno in natura, sospese nella colonna d'acqua e rimescolate solo dal vento. Benché molto usate nel trattamento delle acque reflue e anche in alcuni sistemi di produzione commerciale di microalghe, tali tipi di vasche a basso costo presentano una produttività molto bassa. Ciò è dovuto almeno in parte alla carenza di CO₂, che è assorbita solo dalla parte della coltura a contatto diretto con l'atmosfera. La produttività è influenzata anche da fenomeni di contaminazione con altre microalghe e microrganismi che si nutrono di alghe (Carvalho *et al.* 2006).

Nei raceway, caratterizzati da un percorso sinuoso, l'agitazione della coltura è ottenuta mediante una pompa di ricircolo che tiene in costante movimento il liquido contenuto nei canali e la CO₂ in esso disciolta (Chisti 2007).

Le principali limitazioni relative al funzionamento di tali sistemi aperti sono l'impossibilità di controllare la contaminazione, l'utilizzo difficoltoso della luce da parte delle cellule, le perdite di acqua per evaporazione (che rappresenta l'unico modo per il raffreddamento delle colture) e il costo della fase di raccolta (Carvalho *et al.* 2006). A questi svantaggi vanno ulteriormente aggiunti le più ampie superfici di lavoro e il non facile utilizzo in fase di crescita di fumi contenenti anidride carbonica (Mata *et al.* 2010).

Poiché la luce non penetra per più di pochi centimetri in una coltura densa di cellule microalgali, lo scale-up di questo tipo di sistema è in gran parte basato sull'aumento della superficie, piuttosto che del volume. Gli open ponds sono molto diffusi per applicazioni nell'industria nutraceutica e cosmetica, in quanto l'alto valore aggiunto del prodotto ottenuto riesce a giustificare impianti di notevole estensione. Per sostenere la crescita in colture concentrate, la CO₂ può essere resa disponibile usando gas di combustione di impianti chimici, anche se la distribuzione su larga scala è problematica (Scott *et al.* 2010).

La scelta di come effettuare una coltura su grande scala dipende da diversi fattori: il terreno di coltura, la quantità d'acqua da usare, le sostanze nutritive, la temperatura e il prodotto finale che si vuole ottenere. Generalmente la scelta tra l'utilizzo di un sistema aperto o chiuso dipende principalmente dalla produttività (Tabella 1): nonostante questa non sia a favore dei sistemi aperti, attualmente la produzione maggiore di microalghe su grande scala è fatta mediante l'utilizzo di questi sistemi, che sono abbastanza semplici, durevoli e pratici nella manutenzione grazie al fatto che sono aperti e ciò ne facilita la pulizia (Pulz 2001).

6.1.3 Sistemi chiusi: caratteristiche e limiti dei fotobioreattori

I fotobioreattori sono dei sistemi flessibili che possono essere ottimizzati in base alle caratteristiche biologiche e fisiologiche delle specie da dover coltivare, anche per quei ceppi particolarmente sensibili alle contaminazioni che in sistemi aperti non possono essere cresciuti (Mata *et al.* 2010). In sostanza sono dei contenitori trasparenti ed equipaggiati in modo da garantire il giusto apporto di

nutrienti e anidride carbonica (de Jesús Paniagua-Michel *et al.* 2015). La configurazione del sistema permette il controllo dei contaminanti più facilmente rispetto ad una vasca, permettendo modalità di crescita fotoautotrofe, eterotrofe o mixotrofiche (Carvalho *et al.* 2006).

Generalmente, i fotobioreattori permettono una resa più elevata in biomassa rispetto ai sistemi aperti (Tabella 1) anche se necessitano di tecnologie più complesse per il controllo di tutti i parametri di processo. Gli alti rendimenti contribuiscono a compensare i costi elevati generalmente associati all'utilizzo di queste tecnologie chiuse. Gli elevati costi di costruzione e mantenimento dei fotobioreattori ne limitano attualmente l'uso alle sole colture massive di elevata purezza, utilizzate o per l'estrazione di biomolecole di alto valore commerciale o per inoculi di colture in sistemi aperti (Pulz 2001).

La sedimentazione della biomassa è impedita mantenendo la coltura in agitazione, utilizzando una pompa meccanica o un sistema di insufflazione dell'aria. Una buona miscelazione della coltura è importante perchè omogeneizza la distribuzione del calore, dei metaboliti e facilita il trasferimento dei gas (Chisti 2007). Rispetto ai sistemi aperti, i fotobioreattori si prestano meglio all'utilizzo dei gas di scarico in quanto la geometria del sistema permette una superficie di scambio maggiore rispetto a quella realizzabile in sistemi aperti (Mata *et al.* 2010).

I fotobioreattori lavorano con alte densità cellulari e quindi inevitabilmente contengono una zona centrale oscura foto-limitata e una zona periferica relativamente meglio illuminata. La penetrazione della luce risulta cruciale se si vuole migliorare l'efficienza fotosintetica, fattore quest'ultimo necessario per raggiungere elevate produttività di biomassa e prodotti di interesse. La capacità della luce di distribuirsi all'interno dei fotobioreattori dipende da molti fattori, incluso la geometria della camera, l'intensità dell'agitazione, la concentrazione cellulare, le proprietà ottiche della coltura, il diametro del fotobioreattore e il livello di irraggiamento esterno (Chisti 2007; Razeghifard 2013).

La raccolta di biomassa dai fotobioreattori è meno costosa che da una vasca aperta, perchè il volume della biomassa algale è circa 30 volte più concentrato rispetto ai sistemi aperti (Wen e Johnson 2009).

Per ottenere un elevato rapporto superficie-volume, sono tre i modelli di base sviluppati nel tempo per i fotobioreattori: 1) tubolare, 2) lastra piana, 3) fermentatore (Tabella 2) (Carvalho *et al.* 2006).

Tabella 2 – Principali configurazioni sviluppate per i fotobioreattori chiusi (Carvalho *et al.* 2006)

reactor type	light harvesting efficiency	degree of control	land area required	scale-up	productivity (g L ⁻¹ d ⁻¹); species	ref
vertical tubular	medium	medium	medium	possible	0.5; <i>P. cruentum</i>	27
horizontal tubular	good	medium	poor	possible	0.25; <i>S. platensis</i>	26; 30
helical	medium	good	excellent	easy	0.7; <i>Nannochloropsis</i> sp.	14
α-shaped	excellent	good	poor	very difficult	0.4; <i>S. platensis</i>	18
flat-plate	excellent	medium	good	possible	0.85; <i>Nannochloropsis</i> sp.	46; 51
fermenter type	poor	excellent	excellent	difficult	2.15; <i>S. platensis</i>	48
					0.03–0.05; several	

I fotobioreattori tubolari sono costituiti da tubi di materiale trasparente (vetro o plastica) con una trasmissione forte e stabile dell'intensità luminosa nella gamma fotosinteticamente attiva. Sono di dimensioni variabili e spesso vengono prodotti di forma verticale, orizzontale, elicoidale o a forma di alfa (Verma *et al.* 2010).

Nei tubolari verticali l'aria viene fatta gorgogliare dal basso, permettendo una buona miscelazione globale della coltura, un buon apporto di CO₂ e di allontanamento dell'O₂ (Figura 2). Con l'utilizzo di materiali di costo contenuto come il polietilene, si possono raggiungere concentrazioni cellulari anche tre volte maggiori rispetto ai sistemi aperti grazie all'elevata trasparenza e alle condizioni di sterilità. Un inconveniente è dato invece dall'angolo di incidenza della luce solare, che ne provoca un'elevata perdita di energia con quella che viene riflessa (Carvalho *et al.* 2006).

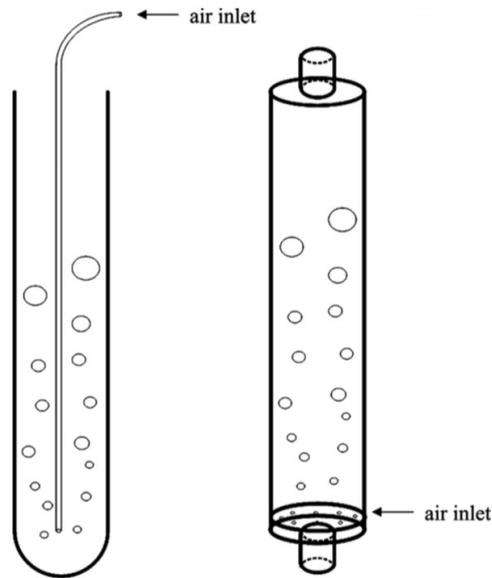


Figura 2 – Schema di due classici fotobioreattori tubolari verticali con diverso sistema di insufflazione (Carvalho *et al.* 2006)

Un tipo particolare di fotobioreattore tubolare verticale è quello anulare (coassiale), che consta di due cilindri concentrici in polimetilmetacrilato (PMMA) saldati su di una base metallica a tenuta. Nell'intercapedine fra i due cilindri si realizza un reattore anulare, mentre all'interno del cilindro minore sono alloggiate una o più lampade che permettono un doppio irraggiamento sia esterno (con luce naturale) che interno (con luce artificiale). Ovviamente il ricorso a sistemi di illuminazione artificiale aumenta significativamente i costi per la produzione della biomassa (Carvalho *et al.* 2006).

Nei tubolari orizzontali l'incidenza della luce è sfruttata al massimo per effetto della posizione con netti miglioramenti nelle rese (Figura 3). Queste configurazioni possono gestire grandi volumi di lavoro, ma al tempo stesso produrre notevoli quantità di calore, con relativi problemi di funzionamento. Per questo motivo, richiedono generalmente sistemi di raffreddamento durante il giorno.

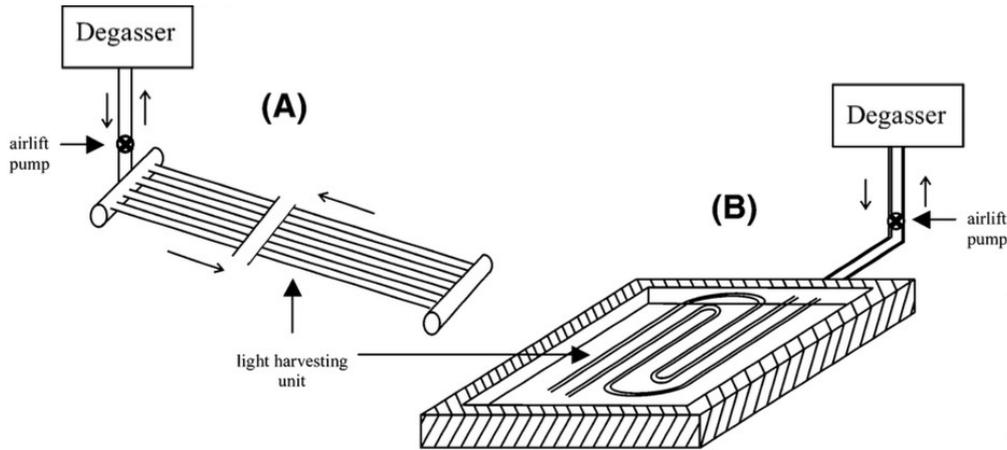


Figura 3 – Rappresentazione schematica di un reattore tubolare orizzontale con un'unità per l'insufflazione dell'aria e di raccolta della luce, costituito da (A) tubi paralleli o (B) curviformi (Carvalho *et al.* 2006)

I fotobioreattori tubulari possono essere facilmente installati in zone non agricole e possono utilizzare anche acque reflue come mezzo di coltura (Mata *et al.* 2010).

Per i tubolari elicoidali la configurazione Biocoil risulta la più diffusa ed è costituita da una serie di tubi di polietilene di diametro interno di 3 cm arrotolati in una struttura circolare aperta e accoppiati ad un sistema per lo scambio dei gas e ad un altro per lo scambio termico. Il movimento della coltura attraverso il tubo e fino allo scambiatore dei gas avviene grazie a una pompa (Figura 4A).

Proprio per la presenza nel sistema di questa pompa, tale configurazione elicoidale non risulta adatta per la crescita di ceppi particolarmente sensibili allo stress meccanico (Carvalho *et al.* 2006).

Nella forma conica l'assorbimento dell'energia radiante è distribuito su una maggiore superficie migliorando così la distribuzione spaziale della luce, mentre uno dei principali svantaggi è che, a differenza del Biocoil, questa disposizione non può essere regolata facilmente (Figura 4B) (Carvalho *et al.* 2006).

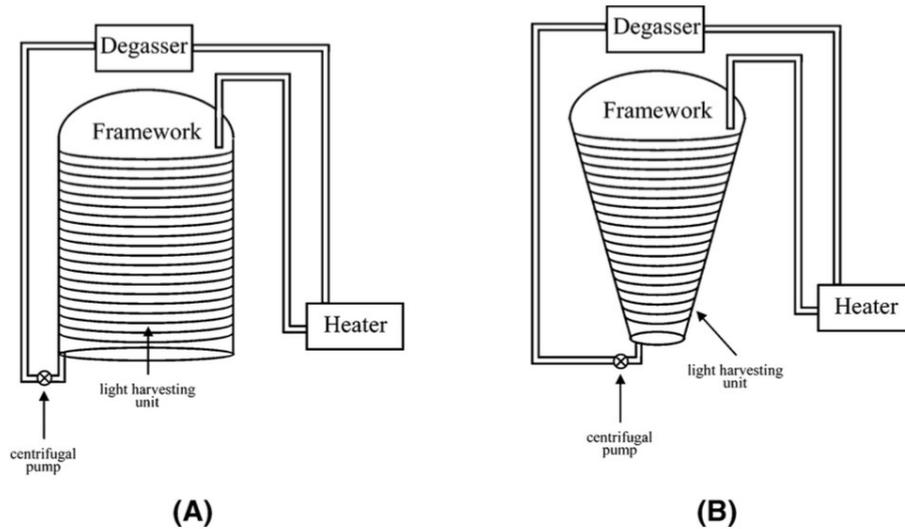


Figura 4 – Rappresentazione schematica di reattori tubolari elicoidali: (A) Biocoil e (B) a forma conica (Carvalho *et al.* 2006)

Nei reattori a forma di alfa il fluido viene pompato in una sola direzione e i tubi, con traiettoria ascendente e discendente, hanno un’angolazione di 45° verso la luce del sole in modo da rendere più efficiente la penetrazione della radiazione luminosa (Figura 5) (Carvalho *et al.* 2006).

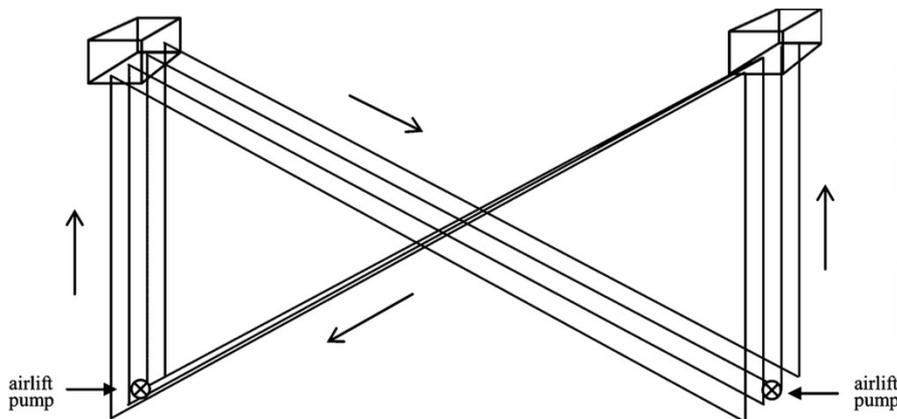


Figura 5 – Rappresentazione schematica di un reattore a forma di α (Carvalho *et al.* 2006)

I fotobioreattori a lastra piana sono sistemi adatti per le colture all’esterno e la loro struttura consente ampie superfici di illuminazione (Figura 6). Più pannelli possono essere collegati a formare degli array di varia lunghezza. I principali vantaggi di questi sistemi derivano dai bassi

costi e dalla semplicità di manutenzione. Le limitazioni invece risiedono nel non facile controllo della temperatura della coltura e nello stress idrodinamico a cui possono essere soggetti i ceppi algali (Mata *et al.* 2010).

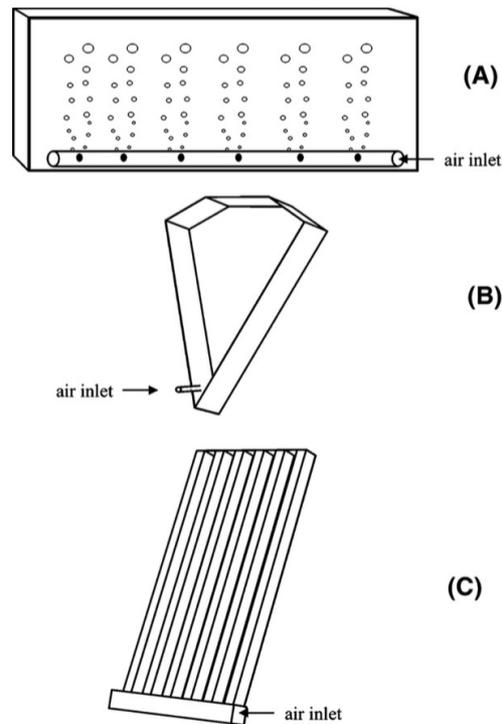


Figura 6 – Schema di reattori a lastra piana: (A) con insufflazione di aria dal basso; (B) a forma di V; (C) alveolare (Carvalho *et al.* 2006)

I fermentatori presentano uno svantaggio intrinseco, ovvero il rapporto area-volume è piuttosto basso con relativa conseguenza sull'efficienza luminosa (Figura 7). Per poter superare questo inconveniente sono stati sviluppati sistemi sofisticati di illuminazione interna che sono in grado di fornire una distribuzione più omogenea della luce, ma che al tempo stesso restringono al momento l'applicabilità di questi sistemi al solo campo della ricerca scientifica. Il vantaggio principale dei fermentatori è il controllo accurato dei parametri del processo e della crescita delle cellule (Carvalho *et al.* 2006).

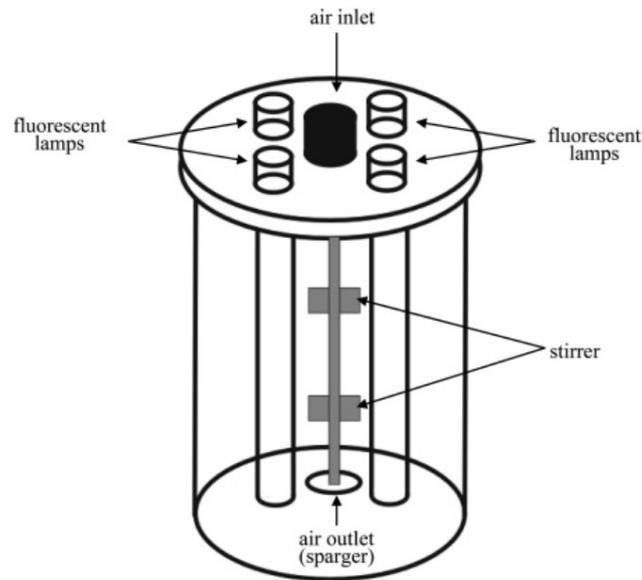


Figura 7 – Schema che rappresenta un fotobioreattore tipo fermentatore (Carvalho *et al.* 2006)

6.1.4 Influenza di luce e temperatura sulle colture intensive delle diatomee

Luce e temperatura giocano un ruolo fondamentale sia nelle crescite indoor che outdoor. Per le installazioni outdoor, entrambi i parametri variano di giorno in giorno, da stagione a stagione e in base alla latitudine terrestre. La scelta della posizione geografica dove collocare i sistemi per le colture intensive risulta quindi cruciale per ottenere buone produttività in biomassa.

Gli organismi fotosintetici hanno uno spettro di assorbimento della luce piuttosto ridotto detto PAR (Photosynthetic Active Radiation) e solo le lunghezze d'onda appartenenti a questo intervallo (circa il 45% della radiazione totale) sono utili alla fotosintesi (Figura 8).

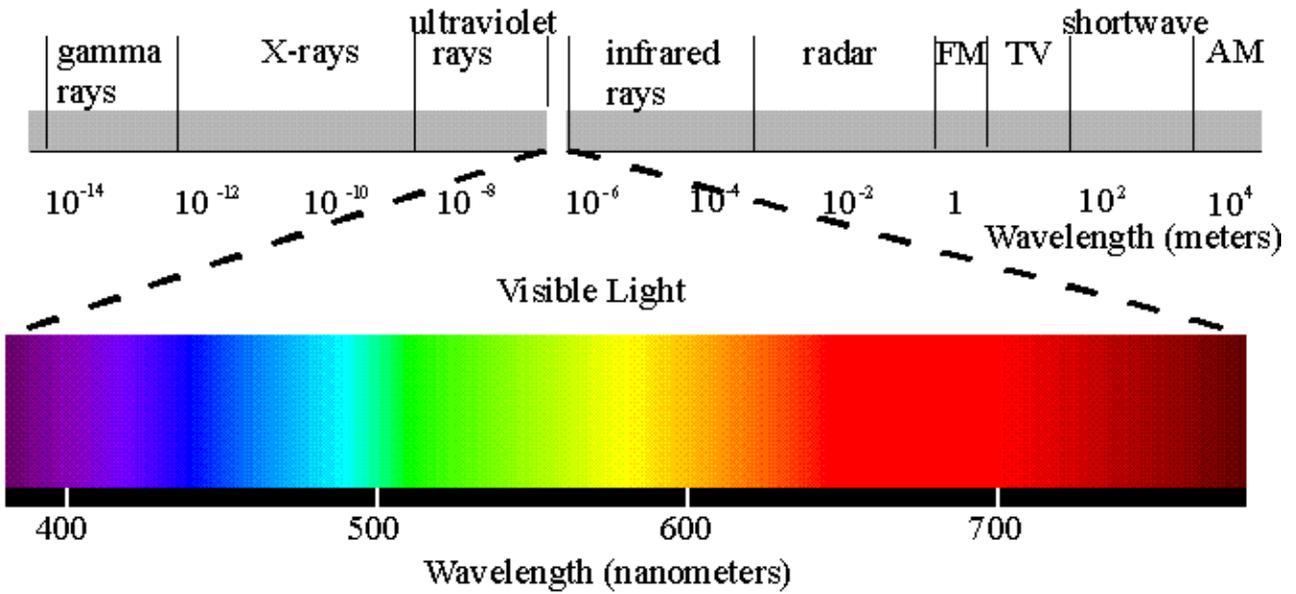


Figura 8 - L'energia utilizzata dalle microalghe per la fotosintesi è la luce, che è solo una porzione dello spettro elettromagnetico. I diversi tipi di radiazione differiscono per la lunghezza d'onda e di conseguenza per la quantità di energia associata ad ogni singolo fotone

La banda PAR si concentra nelle bande del blu e del rosso, con massimi attorno ai valori di $\lambda = 430$ e 680 nm; in corrispondenza di quest'ultimo si ha il maggiore assorbimento da parte dei fotosistemi I e II (rispettivamente 700 e 680 nm) (Figura 9).

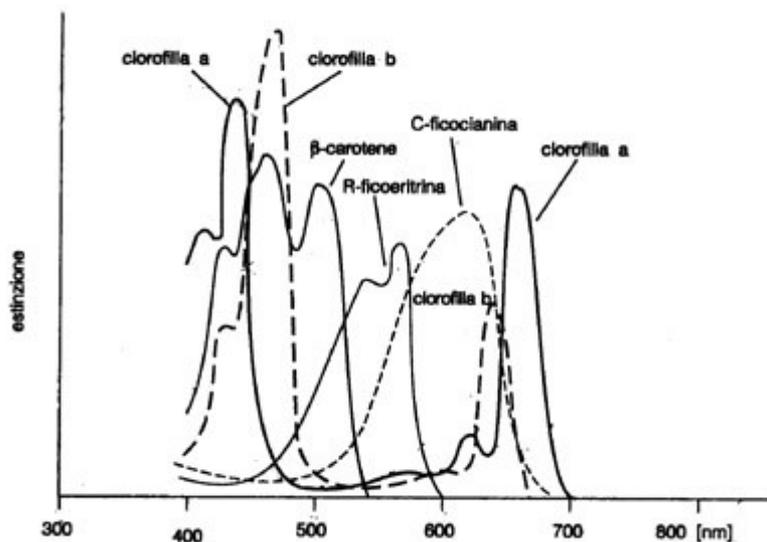


Figura 9 - Spettri di assorbimento dei principali pigmenti delle diatomee: clorofille, ficobiline e carotenoidi

La fotosintesi microalgale è influenzata dalla quantità e dalla qualità della luce incidente e dalla densità cellulare delle colture. Colture con densità cellulare elevata richiedono un'intensità luminosa maggiore per ottenere il massimo dell'attività fotosintetica, che, in ogni caso, risulta inferiore a quella che può essere raggiunta in una coltura con bassa densità cellulare, in quanto la luce è attenuata dall'elevata concentrazione dei microorganismi che si schermano fra di loro.

Le microalghe sono capaci di crescere a differenti intensità luminose, ma alcune specie possono andare incontro a fotoinibizione, ossia l'esposizione a irradianza troppo elevata per periodi prolungati causa una diminuzione della velocità di crescita e in alcuni casi la morte cellulare. Sia la fotoinibizione che lo stress causato da una bassa irradianza provocano una diminuzione nella produzione della biomassa (Voronova *et al.* 2009; Bernard 2011).

E' stato riportato che l'intensità luminosa influisce sulla qualità e la quantità di biodiesel che può essere prodotto dalle microalghe: basse intensità luminose inducono la formazione di lipidi polari, in particolare quelli associati con i cloroplasti, mentre alte irradianze favoriscono la biosintesi dei lipidi neutri, in particolare triacilgliceroli (Brown *et al.* 1996). L'intensità luminosa determina anche il grado di insaturazione degli acidi grassi che costituiscono i TAG: la bassa irradianza favorisce la formazione di acidi grassi polinsaturi (PUFA) (Sukenik *et al.* 1989).

Sforza *et al.* (2012) riporta che per *N. salina* cresciuta in fotobioreattori indoor il solo stress da forte luce non induce la sintesi lipidica, che è invece il risultato della complessa regolazione di più segnali biochimici.

La presenza delle componenti IR e UV nello spettro solare è fonte di potenziali complicazioni, in quanto l'assorbimento della componente IR porta all'emissione di radiazione sotto forma di energia termica, incrementando così la temperatura del sistema con conseguente diminuzione delle produttività. Ciò impone la necessità di utilizzare sistemi di raffreddamento delle colture, che in genere sono costituiti da bagni d'acqua in cui sono immersi i fotobioreattori.

Anche l'elevata energia associata alla componente UV può inibire la crescita dei microorganismi: è noto che la radiazione UV-B può danneggiare il DNA dei microorganismi fotosintetici. E' stato

dimostrato che la produzione primaria del fitoplancton può essere inibita in acque di superficie antartiche, laddove maggiori sono gli effetti della riduzione dell'ozono stratosferico (Helbling e Villafane 2002).

Da un punto di vista ecologico la temperatura rappresenta uno dei principali fattori climatici ad esercitare un'azione incisiva sulle caratteristiche degli ecosistemi e a condizionare sensibilmente l'attività metabolica e lo sviluppo degli organismi viventi. Ancora più della radiazione luminosa, la temperatura influenza la composizione degli acidi grassi dei lipidi microalgali. Temperature basse determinano un aumento delle insaturazioni e, viceversa, un aumento degli acidi grassi saturi si registra in presenza di temperature più elevate (Renaud *et al.* 2002).

6.1.5 Metodi di raccolta della biomassa

La raccolta della biomassa rappresenta l'ultima fase del processo di crescita microalgale prima della lavorazione dei prodotti finali ed è uno degli aspetti più costosi della produzione di bioprodotto, inclusi i biocarburanti. Generalmente la raccolta della biomassa richiede uno o più stadi di separazione della componente solida da quella liquida.

La maggior parte dei comuni metodi di raccolta della biomassa includono: flocculazione (o una combinazione di flocculazione-flottazione), sedimentazione, centrifugazione, filtrazione, ultrafiltrazione (Mata *et al.* 2010).

I metodi di flocculazione più utilizzati comportano l'utilizzo di sali metallici polivalenti come il cloruro ferrico (FeCl_3), il solfato di alluminio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) e il solfato ferrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$). Una valida alternativa ai sali metallici è l'uso di polimeri cationici (polielettroliti). Questa tecnica sfrutta la carica negativa delle pareti cellulari che viene neutralizzata dall'agente flocculante consentendo la formazione di grandi fiocchi che poi vengono recuperati per sedimentazione. Poiché gli aggregati cellulari inglobano al loro interno l'agente flocculante, dopo la raccolta è necessario la depurazione della biomassa da questi contaminanti. Per questo motivo, la scelta dei flocculanti deve essere accurata soprattutto nel caso di produzione di biomassa per uso farmaceutico o alimentare.

Attualmente sono disponibili dei polimeri biologici con tossicità ridotta, alta affinità con le cellule microalgali e facilmente separabili dalla biomassa stessa (Mata *et al.* 2010).

Talvolta per aumentare l'efficienza del processo di flocculazione basta semplicemente modificare il pH portandolo tra 11.8 e 12 (Molina Grima *et al.* 2003).

Molte diatomee sono in grado di bioflocculare attraverso l'aggregazione spontanea delle cellule in grandi fiocchi che si depositano abbastanza rapidamente. Il processo dipende dalla produzione di polimeri che fanno aggregare le cellule tra loro, tuttavia cosa inneschi e controlli il fenomeno non è al momento chiaro. Si ritiene che il processo possa dipendere da diversi fattori, incluso proprietà genetiche della specie e condizioni ambientali, come la scarsità di azoto e di altri nutrienti (Mata *et al.* 2010).

La flottazione, contrariamente alla flocculazione, prevede la raccolta della biomassa sulla superficie del liquido e non sul fondo. Per favorire la risalita e l'aggregazione delle cellule si insuffla aria in forma di bolle dal diametro di circa 10 μm dopo aver aggiunto dei polielettroliti che consentono la formazione di composti con carica globalmente neutra e di densità tale da essere portati facilmente in superficie dalle bolle d'aria (Wang *et al.* 2004).

Vista la sua velocità, la centrifugazione è attualmente ancora il metodo preferito per il recupero della biomassa nonostante il fatto che i costi e l'alta intensità energetica di cui necessita ne sconsigliano un suo generale.

La filtrazione solitamente utilizza dei setti che, sotto pressione o sotto vuoto, lasciano passare il liquido e trattengono le cellule. Si tratta di un metodo soddisfacente per il recupero di grandi cellule quali *Coelastrum proboscideum* e *Spirulina platensis*, mentre si presta poco per organismi di dimensioni più ridotte. Spesso per ovviare a tale problematica vengono adottate pratiche di microfiltrazione a membrana e ultrafiltrazione, che risultano ottimali per le cellule fragili, ma poco pratiche e applicabili per i processi su larga scala (Wang *et al.* 2004).

6.2 ATTIVITA' SPERIMENTALE IN CAMPO

6.2.1 Individuazione dell'area da utilizzare per lo scale-up in campo delle colture di diatomee e caratteristiche tecniche del fotobioreattore e del sistema di coltura scelto per le colture intensive

L'attività sperimentale per la crescita intensiva in campo di diatomee è stata svolta presso lo stabilimento della I.GI. di proprietà della Sepe Costruzioni. La sperimentazione è stata parte di progetto PON (Sfruttamento Integrato di Biomasse Algali in Filiera Energetica di Qualità, SIBAFEQ), in collaborazione con la stessa Sepe Costruzioni e la Ferrero S.p.A..

Lo stabilimento I.GI. è sito a Palomonte (40°40'N 15°18'E) (Figura 10), un comune in provincia di Salerno a 550 m s.l.m. tra la valle del Tanagro e il gruppo montuoso dei monti Marzano-Eremita, con una condizione climatica tipica dell'entroterra campano con temperatura media, secondo i rilievi della stazione meteorologica di Contursi, del mese più freddo (gennaio) di 6.9°C e di 24.5°C per il mese più caldo (luglio).

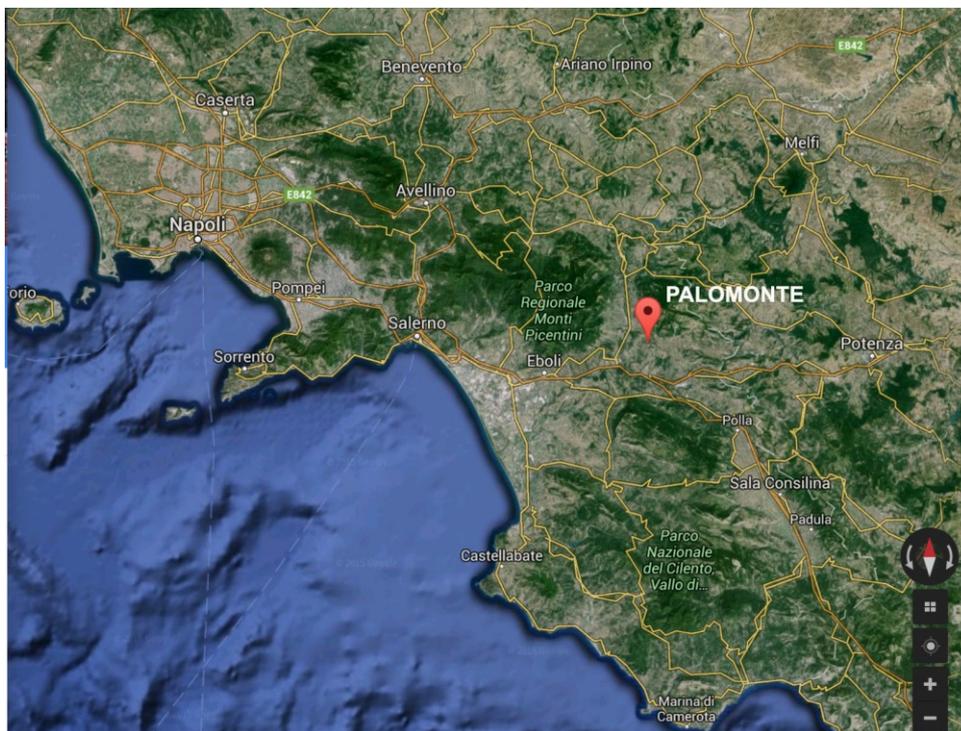


Figura 10 – Posizione geografica del comune di Palomonte (Sa) dove è stata individuata l'area per installare l'impianto pre-industriale di fotobioreattori per le colture intensive di diatomee

Per la sperimentazione sono stati utilizzati fotobioreattori tubulari inclinati con angolo di 23° rispetto al piano. La geometria è assimilabile a quella rettangolare dei pannelli solari e ogni fotobioreattore è costituito da sacche trasparenti ingabbiate in una struttura metallica. Ogni camera di coltura è infatti fatta in PVC trasparente di 1 mm di spessore, dal diametro di 80 cm e lunghezza di 2.5 metri per un volume utile variabile di 1000 litri (Figura 11). L'agitazione della coltura è garantita da un sistema di lift-up a gas.

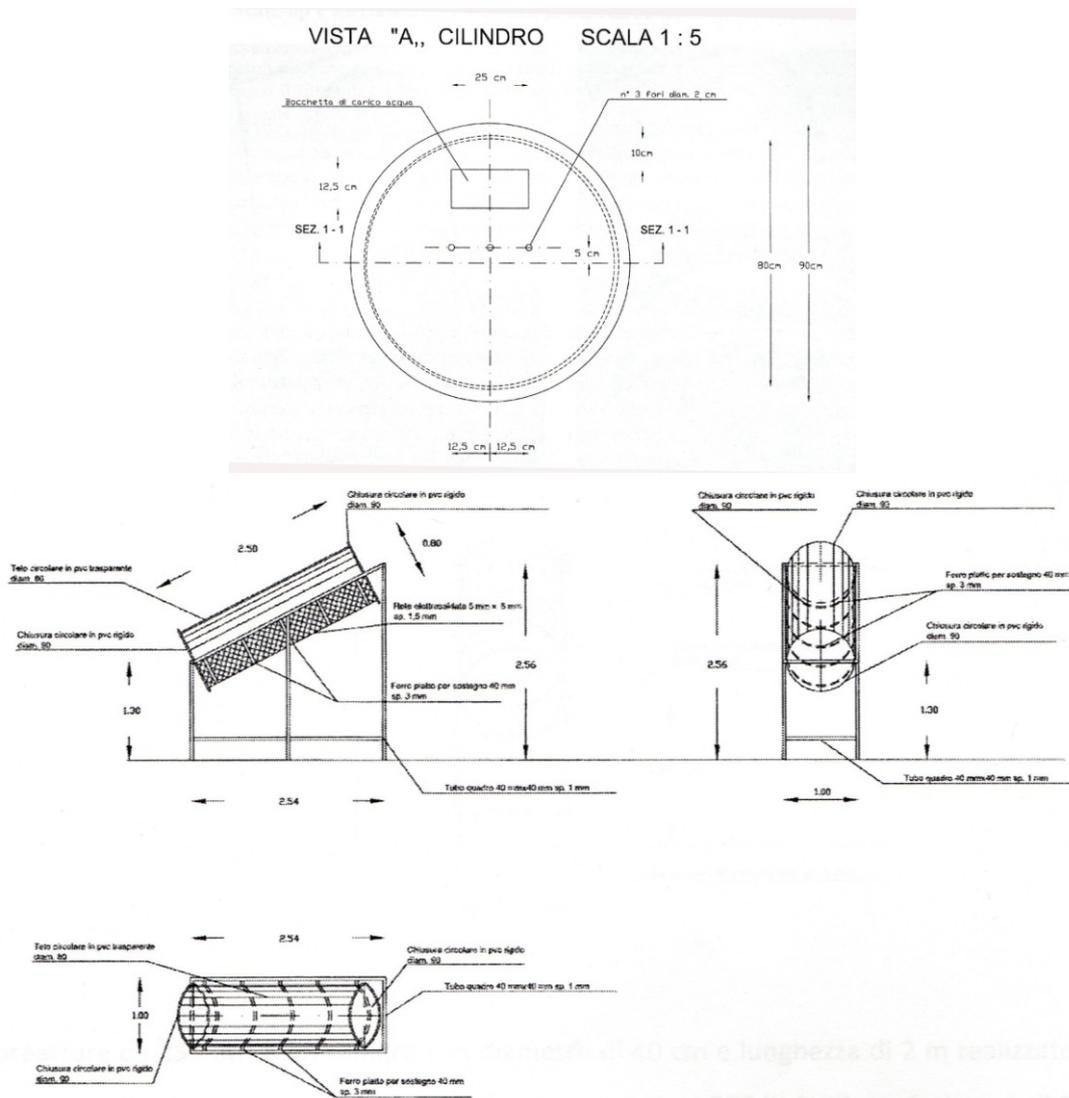


Figura 11 – Progetto del fotobioreattore cilindrico inclinato impiegato per la sperimentazione in campo

L'impianto per la crescita delle diatomee utilizzato per lo studio era composto da 8 fotobioreattori con una capacità totale netta di 8000 litri (Figure 12 e 13).

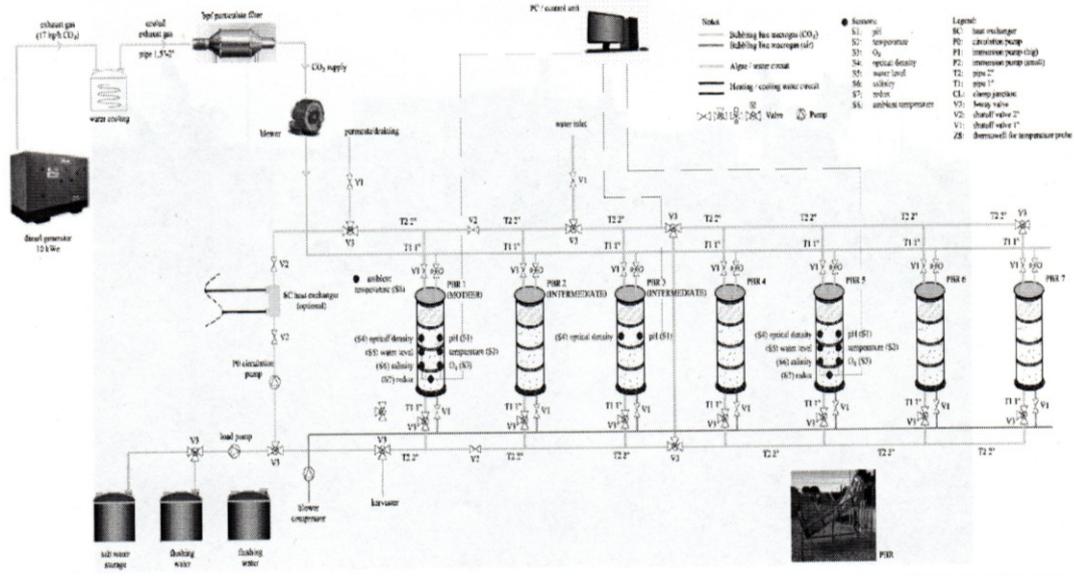


Figura 12 - Schema di principio dell'impianto per le colture intensive di diatomee sito a Palomonte

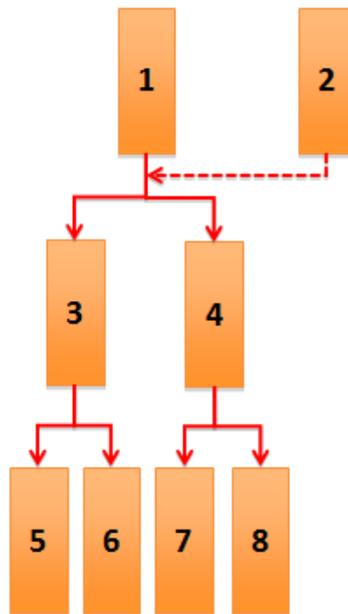


Figura 13 – Linea di lavoro con metodo a cascata dei fotobioreattori inclinati siti presso l'impianto di Palomonte

Per gli studi discussi in questa tesi è stato adottato un sistema di coltivazione a cascata, in cui ogni fotobioreattore serve per alimentare i successivi due posti in serie, secondo il percorso riportato

nello Schema A: il fotobioreattore 2 rappresenta un fotobioreattore di riserva nel caso in cui durante il processo si fossero presentati problemi con gli impianti o con le cellule .

Sfruttando i risultati ottenuti in laboratorio e discussi nel capitolo 3 di questa tesi, in campo è stata effettuata una sperimentazione con sistema di coltura a doppia fase, alternando una fase di accrescimento della biomassa (operata nei fotobioreattori 3 e 4) in cui le cellule vengono mantenute in un mezzo ricco di nutrienti, ad una fase di arricchimento lipidico (operata nei fotobioreattori 5, 6, 7 e 8) in cui le cellule vengono limitate selettivamente di uno specifico nutriente. I cicli di crescita sono stati gestiti in modo che quando si svuotava un fotobioreattore, quello che lo precedeva fosse pronto per essere usato come inoculo e trasferito. In questo modo tutti i fotobioreattori sono stati mantenuti sempre pieni e a regime ed è stato realizzato un processo di raccolta settimanale dei fotobioreattori 5, 6, 7 e 8 (4000 L di coltura) mediante sedimentazione naturale al buio e successiva centrifugazione.



Schema A – Diagramma del meccanismo definito “a cascata” secondo cui le colture sono trasferite tra i vari fotobioreattori

Oltre che ad essere alimentato con i fumi di un motore a combustione, l'impianto era dotato di apparati per il monitoraggio continuo delle colture, incluso:

- sonde multi-parametriche per la misura della temperatura, della salinità, del redox e dell'O₂ disciolto;
- sonda del pH;
- sonda della torbidità determinata mediante il principio ottico di backscattering;
- data logger per l'acquisizione e la registrazione dei dati;
- postazione computer per la visualizzazione in tempo reale dei dati acquisiti.

6.2.2 Obiettivi dello studio applicativo in campo

Tutto il carbonio presente nella biomassa delle diatomee deriva dalla CO₂, quindi potenzialmente parte del biossido di carbonio rilasciato da qualunque processo industriale può essere utilizzato per la produzione di biodiesel (Chisti 2007).

Nel corso degli anni passati varie ricerche, condotte in laboratorio (Olaizola 2003) e all'aperto (Matsumoto *et al.* 1995; Pedroni *et al.* 2004), hanno dimostrato che è possibile coltivare efficacemente le microalghe utilizzando direttamente i gas di combustione (Douskova *et al.* 2009; Kumar *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2015). Kumar *et al.* (2014) hanno riportato che la biomassa massima, la produttività totale di biomassa e la velocità di crescita netta in presenza di una miscela aria-fumi in rapporto 3:1 è solo leggermente superiore rispetto a miscele 1:1.

Oltre alla CO₂ anche altri componenti dei gas di combustione, in particolare NO_x e SO_x, possono essere assorbiti ed utilizzati dalle microalghe. Questi contaminanti, proprio come la CO₂, reagiscono in acqua producendo acidi diluiti che vengono neutralizzati dall'alcalinità del mezzo di coltura. Nel caso degli NO_x, sia NO sia NO₂ vengono utilizzati dalle microalghe senza alcun cambiamento netto di pH del mezzo di crescita (Negoro *et al.* 1993; Nagase *et al.* 2001).

Per la nostra sperimentazione, abbiamo utilizzato il ceppo *Thalassiosira weissflogii*, utilizzato in laboratorio (capitolo 3). La specie è stata scelta per la sua robustezza, la sua elevata capacità di resistenza alle contaminazioni, la capacità di sedimentare in poche ore e le alte produttività ottenute in laboratorio. L'obiettivo principale è stato quello di verificare se le metodiche di crescita sviluppate nelle condizioni controllate di laboratorio potessero essere riprodotte in fotobioreattori inclinati chiusi su larga scala, ottenendo un valore medio di produttività in biomassa e lipidi che permettesse di effettuare una valutazione sulla sostenibilità del processo a livello industriale.

Lo schema utilizzato ha previsto una coltivazione a due fasi ed una comparazione dei risultati ottenuti nelle crescite con e senza l'insufflazione dei fumi del motore a combustione. Durante la prima fase di crescita le diatomee sono state poste in un terreno con nutrienti sufficienti e abbondanza di fonte di carbonio per consentire alle cellule di dividersi e ottenere alte densità cellulari e quindi elevate biomasse; durante la seconda fase il terreno è stato selettivamente limitato di azoto o silicio, in modo da incrementare la componente lipidica.

Per tutte le crescite sono state effettuate misurazioni di

- conta cellulare (cell mL^{-1});
- pH;
- determinazione della biomassa umida e liofila (mg L^{-1});
- analisi biochimiche quantitative (determinazione contenuto lipidi, proteine e carboidrati);
- analisi qualitative e quantitative delle componenti lipidiche (PL – GL – TAG – FFA – TFA) attraverso analisi $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz);
- analisi quantitativa dei livelli dei principali macronutrienti (silicati, nitrati e fosfati) nel mezzo di crescita.

La sperimentazione in campo, dopo un lungo lavoro di progettazione e collaudo, è stata sviluppata a pieno regime nell'autunno 2015 effettuando una serie di crescite intensive per verificare il potenziale del sistema.

6.3 RISULTATI E DISCUSSIONI

6.3.1 Analisi delle biomasse ottenute dalle colture intensive in campo

La sperimentazione in campo ha previsto un lungo periodo di preparazione per mettere a punto i sistemi di monitoraggio e gestione delle colture. Infatti le elevate fluttuazioni di temperatura e intensità luminosa nei diversi periodi dell'anno influiscono sulla durata dei cicli di crescita, sulle possibili contaminazioni e sul consumo dei nutrienti che man mano venivano aggiunti. Sono state effettuate una serie di colture a carattere esplorativo per testare il modulo a cascata da 8000 L, acquisendo dati preliminari fondamentali per la fase di sperimentazione, che è stata poi portata avanti da settembre 2015 a dicembre 2015. Durante questo periodo l'impianto a cascata ha lavorato con tutti i fotobioreattori sempre a pieno regime.

Le condizioni testate in campo si sono basate sui protocolli di crescita validati in laboratorio (capitolo 3, paragrafo 3.2.6), che prevedevano una prima fase ad alto regime di nutrienti ed una seconda fase di limitazione di nitrati o silicati. Per tutte le prove la prima fase è stata effettuata nei fotobioreattori (Fb) 3 e 4 del sistema a cascata con l'aggiunta quotidiana dei nutrienti tipici dell' $f/2$ dosati in base alle esigenze fisiologiche delle cellule. La seconda fase è stata invece condotta in Fb 5, 6, 7 e 8 (vedi Schema A). La CO_2 al 10% utilizzata in laboratorio è stata sostituita negli studi in campo con l'insufflazione di fumi provenienti da un motore a combustione. Per verificare l'effetto dei fumi da motore, ogni ciclo prevedeva che Fb 5 e 6 avessero l'insufflazione con i fumi, mentre Fb 7 e 8 fossero alimentati senza fumi, in parallelo e nelle stesse condizioni. Nelle tabelle 3 e 4 sono riassunte le caratteristiche e le tipologie delle crescite effettuate nell'ambito dell'intera sperimentazione in campo.

Tabella 3 – Schema riassuntivo delle tipologie e del numero di crescite effettuate in campo sia con che senza fumi da motore a combustione

PROVA	DURATA (Giorni)	TIPO DI ESPERIMENTO	N° Fotobioreattori I Fase	N° Fotobioreattori II Fase	N° DI PROVE CON FUMI	N° DI PROVE SENZA FUMI
Controllo	14	Doppia Fase	2	4	2	2
Limitazione NaNO ₃	14	Doppia Fase	2	4	3	3
Limitazione Na ₂ SiO ₃	14	Doppia Fase	2	4	3	3

Tabella 4 – Schema riassuntivo delle procedure sperimentali applicate in campo sia con che senza fumi da motore a combustione

PROVA	CONDIZIONI ESPERIMENTO		Biomassa umida recuperata (Kg)
	Aggiunta nutrienti	Insufflazione	
Controllo	I Fase: Aggiunta dosata dei nutrienti per i primi 7 giorni. II Fase: Aggiunta dosata dei nutrienti per i secondi 7 giorni	I Fase: Fumi di scarico da motore a combustione II Fase: FB 5 - FB 6 con fumi di scarico da motore a combustione, FB 7 - FB 8 senza fumi di scarico da motore a combustione	4,408
Limitazione NaNO ₃	I Fase: Aggiunta dosata dei nutrienti per i primi 7 giorni. II Fase: sospensione solo NaNO ₃ del mezzo di crescita f2 per i secondi 7 giorni	I Fase: Fumi di scarico da motore a combustione II Fase: FB 5 - FB 6 con fumi di scarico da motore a combustione, FB 7 - FB 8 senza fumi di scarico da motore a combustione	7,479
Limitazione Na ₂ SiO ₃	I Fase: Aggiunta dosata dei nutrienti per i primi 7 giorni. II Fase: sospensione solo Na ₂ SiO ₃ del mezzo di crescita f2 per i secondi 7 giorni	I Fase: Fumi di scarico da motore a combustione II Fase: FB 5 - FB 6 con fumi di scarico da motore a combustione, FB 7 - FB 8 senza fumi di scarico da motore a combustione	9,265

Nelle figure 14 e 15 sono mostrati gli andamenti delle biomasse liofile e dei lipidi (mg L^{-1}) nei giorni finali della I fase e della II fase. Si può notare che in Fase I si ottengono in generale biomasse mediamente al di sotto di 150 mg L^{-1} . Al contrario, in seconda fase, indipendentemente dalle condizioni, le rese in biomassa si attestano intorno a valori medi che si aggirano tra i 200 e i 300 mg L^{-1} .

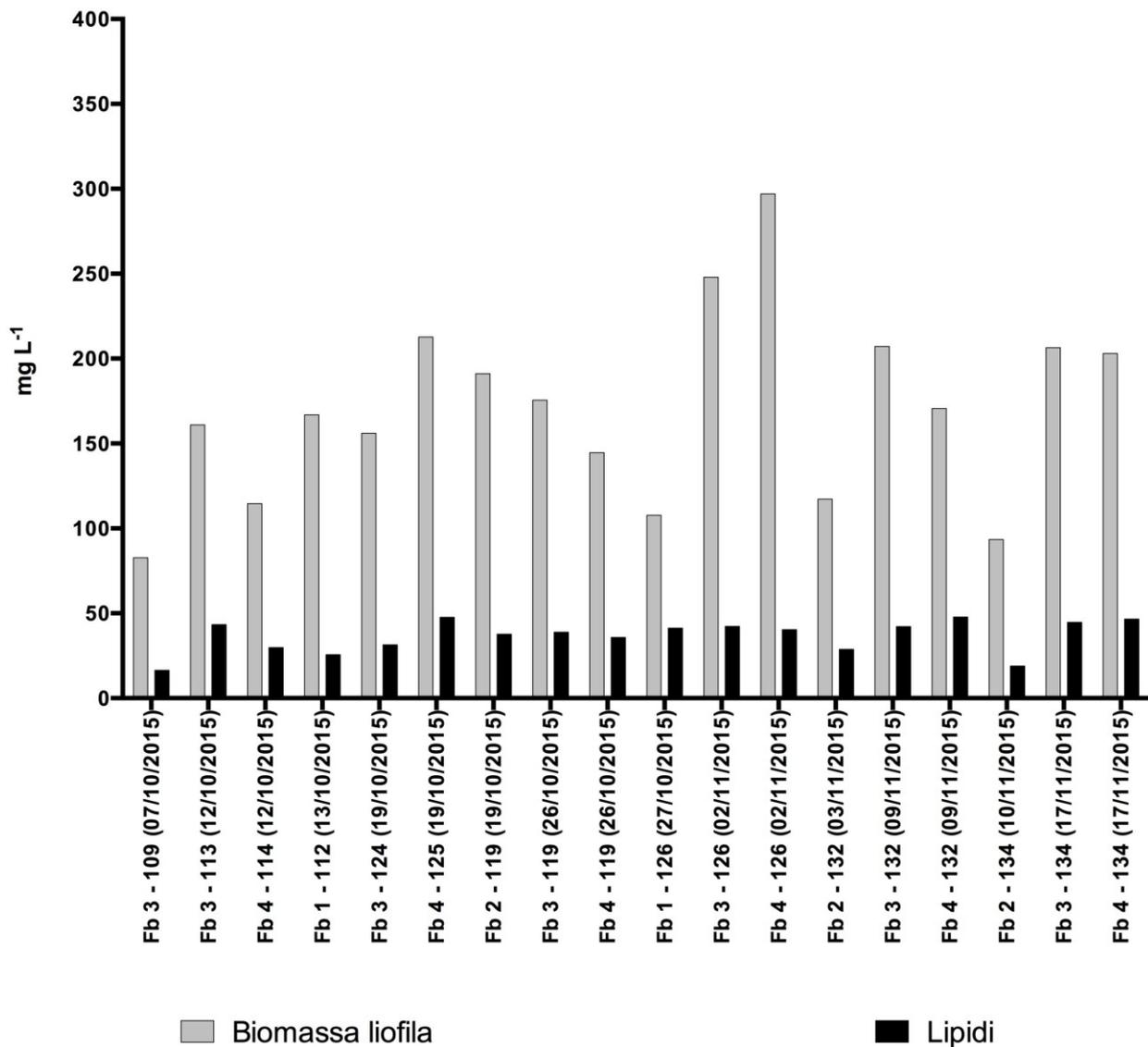


Figura 14 – Andamenti delle biomasse liofile e dei lipidi (mg L^{-1}) al giorno finale della I fase delle singole colture effettuate nella sperimentazione in campo tra settembre e dicembre 2015

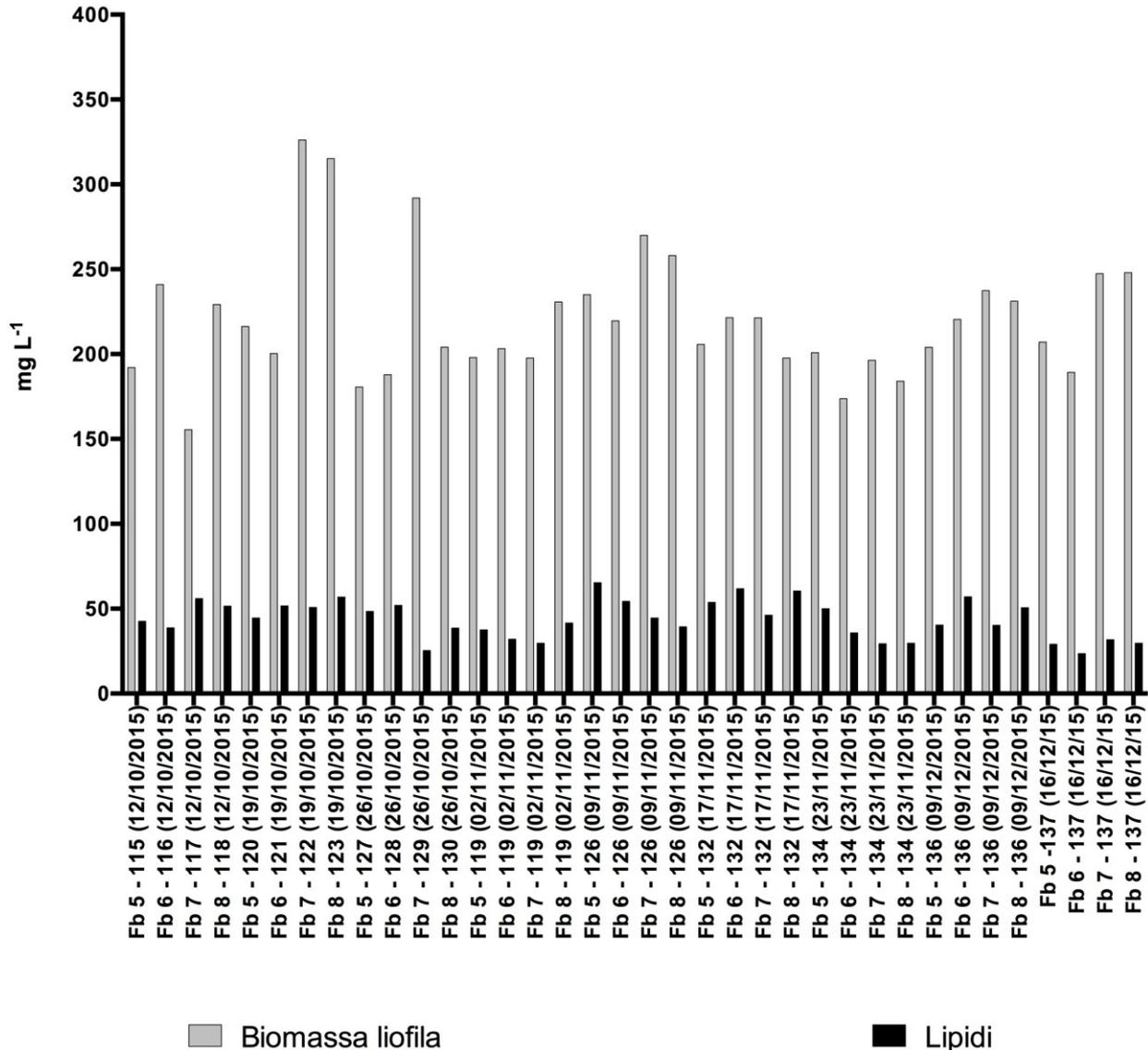


Figura 15 – Andamenti delle biomasse liofile e dei lipidi (mg L⁻¹) al giorno finale della II fase delle singole colture effettuate nella sperimentazione in campo tra settembre e dicembre 2015

Per le tre tipologie di crescita (controllo, limitazione di NaNO₃ e limitazione di Na₂SiO₃) sono state scelte delle crescite campione riportare nelle figure 16, 17 e 18.

I macronutrienti sono stati aggiunti sempre in base al fabbisogno delle cellule: nella crescita di controllo (figura 16) sono state necessarie mediamente 4 aggiunte di nitrati, 6 aggiunte di fosfati e aggiunte quotidiane di silicati per sostenere la crescita cellulare, in accordo con i consumi dei macronutrienti che erano stati osservati in laboratorio.

Secondo lo schema del processo a cascata (Schema A), al giorno 7 le colture da Fb 3 e 4 sono state suddivise in Fb 5 - 6 e Fb 7 - 8, rispettivamente, per l'avvio della Fase II. Questo ha determinato una diluizione delle colture con la conseguente riduzione della concentrazione cellulare che si osserva per tutte le prove (Figure 16, 17 e 18).

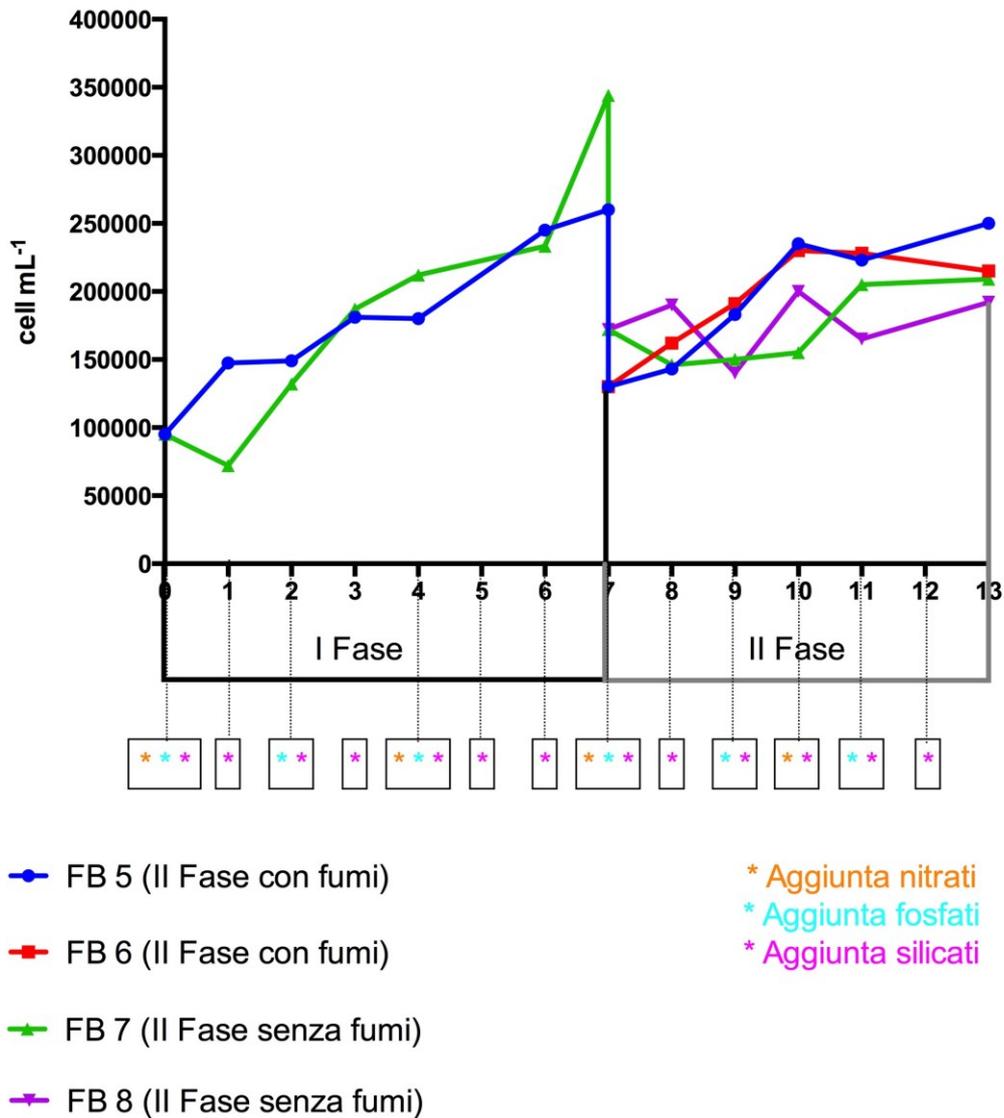


Figura 16 – Andamenti delle concentrazioni cellulari (cell mL⁻¹) di un classico ciclo a cascata di controllo: in I fase sono mostrate le curve dei Fb 3 e 4, mentre in II fase sono mostrate le curve dei Fb 5 e 6 (con i fumi) e Fb 7 e 8 (senza fumi). Gli asterischi indicano le aggiunte degli specifici macronutrienti

In tutte le tipologie di crescita (controllo, limitazione di nitrati e limitazione di silicati) le colture dei Fb 5 – 6, effettuate in presenza di fumi, hanno raggiunto concentrazioni cellulari maggiori rispetto alle colture condotte in parallelo nei Fb 7 – 8 senza fumi (Figure 16, 17 e 18). Questi risultati sono in accordo con quanto osservato in laboratorio, dove l'insufflazione di CO₂ aveva un effetto simile sull'incremento della biomassa. Anche se la composizione dei fumi da motore è sicuramente più complessa, la componente predominante è rappresentata proprio dalla CO₂ al 10%.

In figura 17 si può notare un ridotto consumo di nitrati nonostante la somministrazione di questi nutrienti solo al primo giorno della Fase I. Il ridotto abbattimento di questa componente è probabilmente dovuto al fatto che gli NO_x presenti nei fumi del motore hanno almeno parzialmente sostituito i nitrati come fonte di azoto necessaria per la crescita della diatomea.

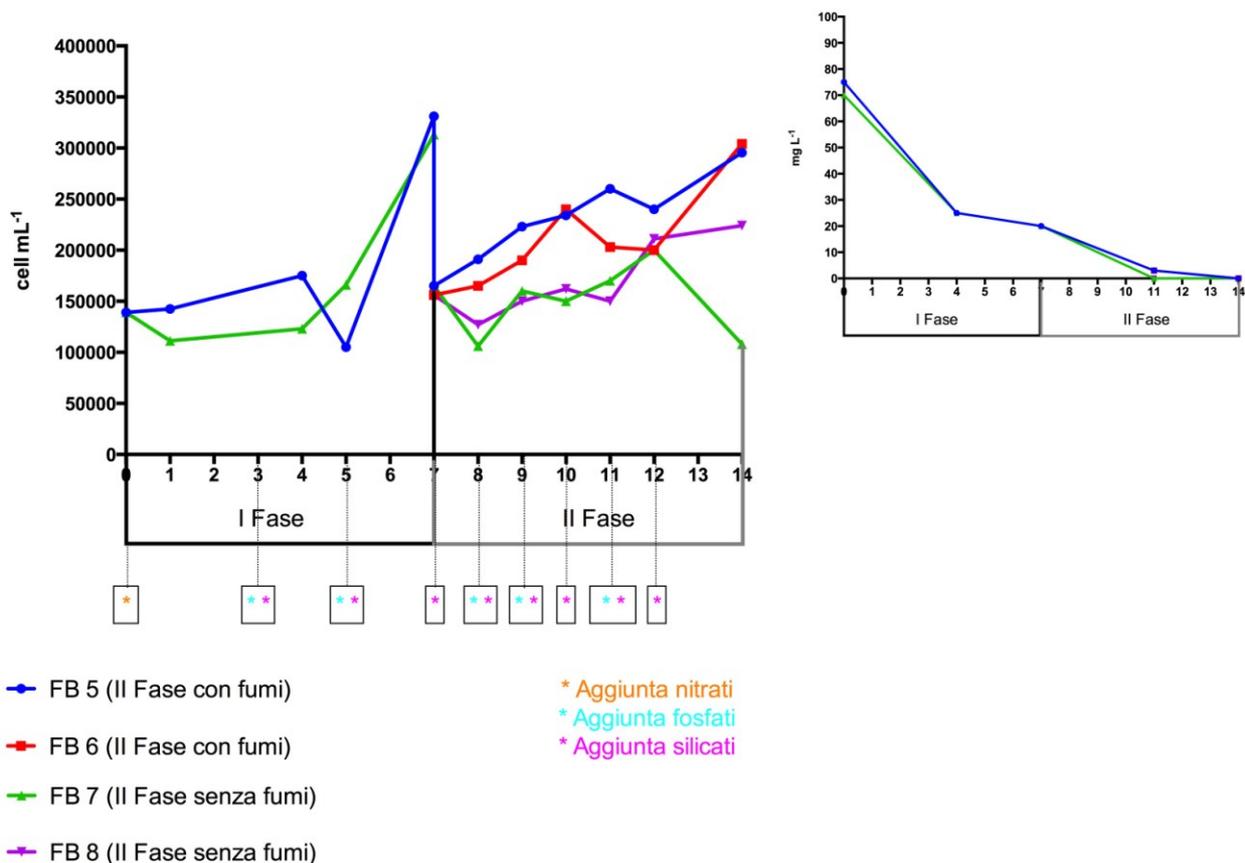


Figura 17 – Andamenti delle concentrazioni cellulari (cell mL⁻¹) di un classico ciclo a cascata in limitazione di NaNO₃: in I fase sono mostrate le curve dei Fb 3 e 4, mentre in II fase sono mostrate le curve dei Fb 5 e 6 (con i fumi) e Fb 7 e 8 (senza fumi). Gli asterischi indicano le aggiunte degli specifici macronutrienti. Nel riquadro in alto è mostrato l'andamento del consumo dei nitrati durante tutto l'arco del ciclo a cascata: le curve dei Fb 5 e 6 e dei Fb 7 e 8 sono perfettamente sovrapposte

Per quanto riguarda la prova in limitazione di silicati effettuata in campo, l'esperimento campione è riportato in figura 18. A differenza di quanto sperimentato in laboratorio, in campo la limitazione di questo macronutriente è partita a metà della Fase II a causa del rapido consumo di questo macronutriente nelle colture outdoor. Comunque una volta interrotta la somministrazione dei silicati, i livelli di questo macronutriente sono scesi immediatamente intorno allo zero. I bassi livelli residuali riscontrati sono stati principalmente dovuti alla quantità di cellule che sono andate incontro a lisi e che quindi hanno rilasciato i silicati intracellulari, come verificato anche sulle colture di laboratorio nella fase stazionaria/senescente delle crescite in deprivazione di silicati. Alla luce di questi risultati la condizione di limitazione di silicati risulta essere la più applicabile e gestibile in campo, in quanto si riesce ad ottenere questa condizione semplicemente sospendendo le aggiunte di questo macronutriente, senza dover sostituire il mezzo di coltura. A livello biotecnologico questo rappresenta un notevole vantaggio nella gestione operativa del fotobioreattore.

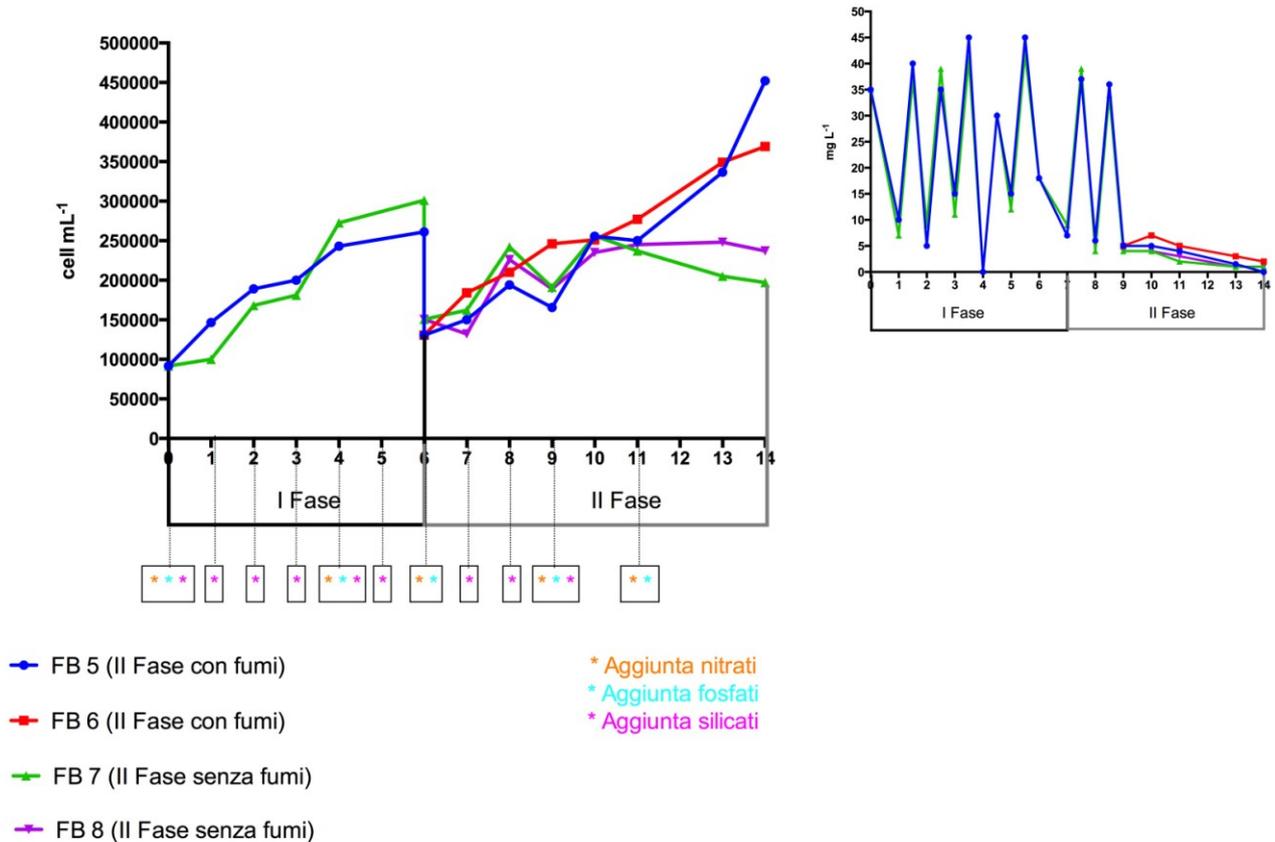


Figura 18 – Andamenti delle concentrazioni cellulari (cell mL^{-1}) di un classico ciclo a cascata in limitazione di Na_2SiO_3 : in I fase sono mostrate le curve dei Fb 3 e 4, mentre in II fase sono mostrate le curve dei Fb 5 e 6 (con i fumi) e Fb 7 e 8 (senza fumi). Gli asterischi indicano le aggiunte degli specifici macronutrienti. Nel riquadro in alto è mostrato l'andamento del consumo dei silicati durante tutto l'arco del ciclo a cascata

I valori medi delle biomasse e dei lipidi ottenuti alla fine della II fase sono stati raggruppati e confrontati secondo le diverse tipologie di crescita (Figura 19). In generale le densità cellulari medie raggiunte nelle diverse condizioni di crescita nella sperimentazione in campo sono più basse rispetto a quelle ottenute in laboratorio. Tuttavia, ogni ciclo di produzione settimanale (4000 L di coltura) permette di recuperare circa 1.2 kg di biomassa liofila con un contenuto medio di circa 200 g di lipidi.

Le quantità di biomassa liofila media (circa 200 mg L^{-1}) sono risultate abbastanza simili nelle varie prove, con un leggero incremento nelle crescite senza fumi (Figura 19). Come per la densità cellulare, i valori delle produttività di biomassa sono più basse nelle prove in campo rispetto alle corrispondenti sperimentazioni effettuate in laboratorio (Tabelle 5, 6 e 7) e in generale sono

leggermente maggiori nelle prove di limitazione di silicati (circa 220 mg L⁻¹ e 280 mg L⁻¹, rispettivamente, con e senza fumi). Anche le produttività lipidiche sono abbastanza paragonabili in tutte le prove, sia con che senza l'ausilio dei gas da motore (circa 55 mg L⁻¹ e 47 mg L⁻¹ di lipidi, rispettivamente). La migliore produttività lipidica si è ottenuta nella prova in limitazione di silicati, sia con che senza somministrazione dei fumi del motore.

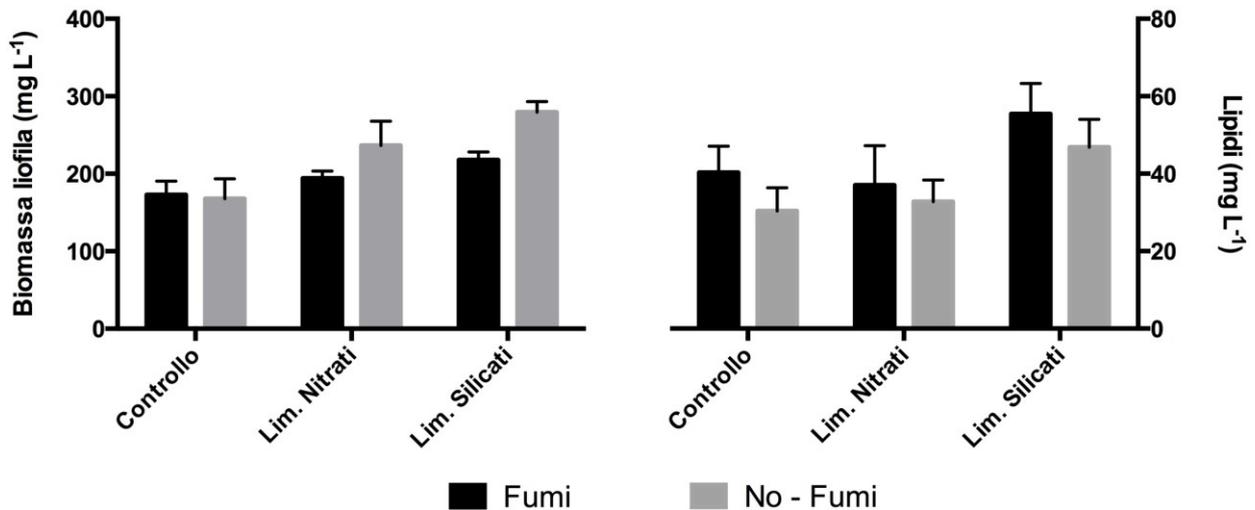


Figura 19 – Quantità medie di biomassa liofila e lipidi (mg L⁻¹) ottenute dalla sperimentazione in campo effettuata sia con che senza i fumi di un motore a combustione

Tuttavia, in queste condizioni sperimentali, l'analisi di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) ha mostrato l'assenza dei lipidi di riserva, (TAG), compensata da alte quantità dei lipidi di membrana (GL e PL) (Figura 20). Questo risultato in netto contrasto con quanto ottenuto in laboratorio è probabilmente dovuto alle basse intensità luminose registrate nel periodo (da settembre a dicembre) della sperimentazione in campo (Brown *et al.* 1996).

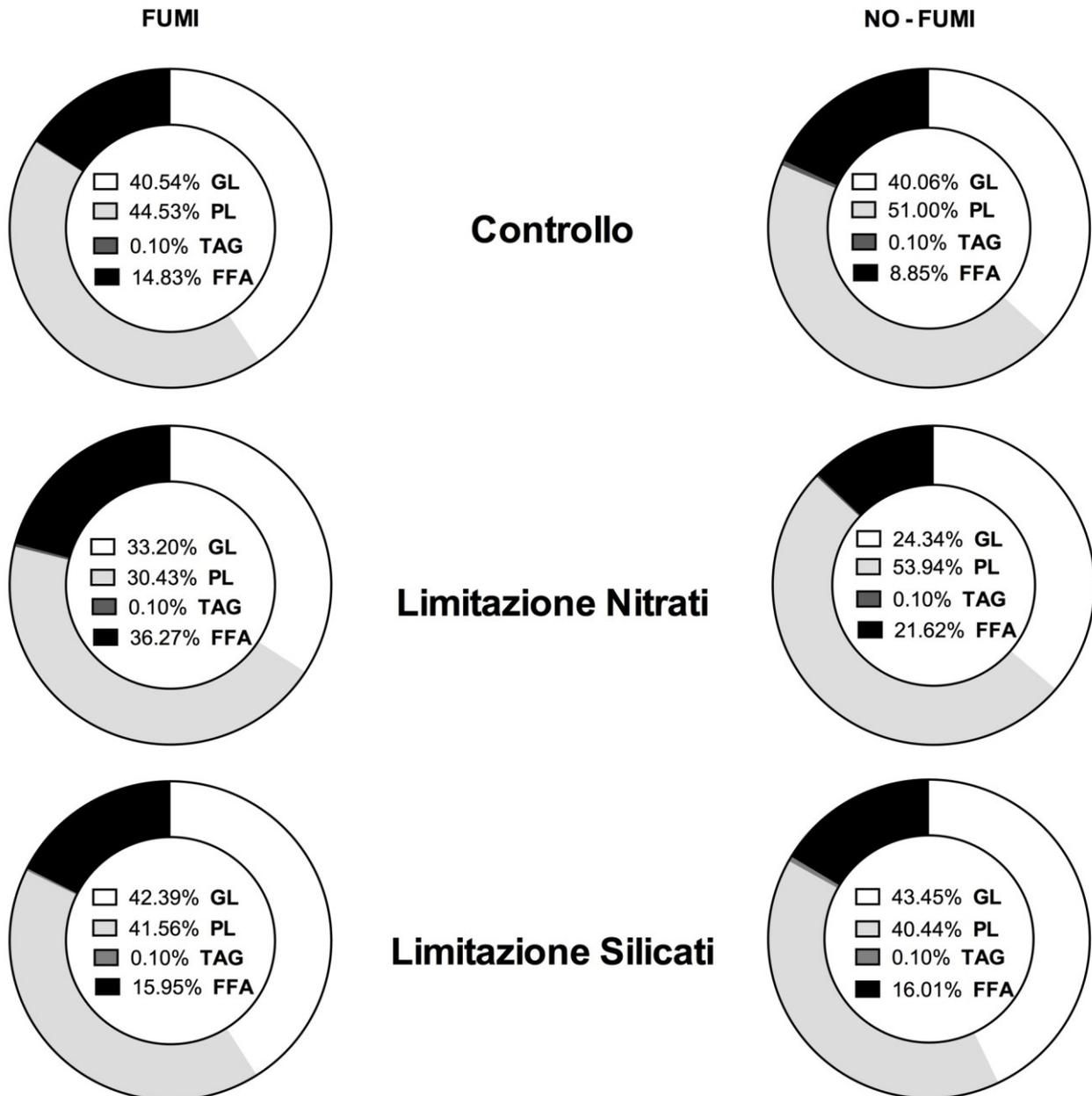


Figura 20 – Ripartizione media (%) delle varie classi lipidiche negli estratti delle prove condotte in campo nel periodo autunnale

Anche se più basse, le produttività dei carboidrati sono risultate comunque grossomodo paragonabili con alcune delle prove di laboratorio (Tabelle 5, 6 e 7). Le rese migliori sono state ottenute nelle prove in limitazione di N sia con che senza i fumi. Complessivamente da ogni ciclo settimanale è stato possibile recuperare circa 0.8 kg di biomassa liofila nella condizione di limitazione di nitrati con un contenuto di circa 84 g di carboidrati.

Tabella 5 - Valori di produttività di biomassa, lipidi e carboidrati per le prove sperimentali ad Alto Regime di Nutrienti e di deprivazione selettiva di *T. weissflogii* effettuate in laboratorio

Prova	Biomassa liofila (mg L ⁻¹ giorno ⁻¹)	Lipidi (mg L ⁻¹ giorno ⁻¹)	Carboidrati (mg L ⁻¹ giorno ⁻¹)
ARN	62.2 ± 3.4	12.7 ± 1.0	4.8 ± 0.4
-N	121.4 ± 3.8	22.1 ± 2.5	72.9 ± 6.8
-Si	58.7 ± 5.8	21.8 ± 1.9	7.2 ± 1.1

Tabella 6 - Valori di produttività di biomassa, lipidi e carboidrati per le prove sperimentali di *T. weissflogii* effettuate in campo senza la somministrazione dei fumi da motore a combustione

Prova	Biomassa liofila (mg L ⁻¹ giorno ⁻¹)	Lipidi (mg L ⁻¹ giorno ⁻¹)	Carboidrati (mg L ⁻¹ giorno ⁻¹)
Controllo	24.0 ± 3.7	4.3 ± 0.9	1.0 ± 0.2
-N	33.8 ± 4.5	4.7 ± 0.8	3.1 ± 1.2
-Si	40.0 ± 6.3	6.7 ± 1.0	2.1 ± 0.7

Tabella 7 - Valori di produttività di biomassa, lipidi e carboidrati per le prove sperimentali di *T. weissflogii* effettuate in campo con la somministrazione dei fumi da motore a combustione

Prova	Biomassa liofila (mg L ⁻¹ giorno ⁻¹)	Lipidi (mg L ⁻¹ giorno ⁻¹)	Carboidrati (mg L ⁻¹ giorno ⁻¹)
Controllo	24.7 ± 2.5	5.8 ± 1.0	1.7 ± 0.2
-N	27.8 ± 1.3	5.3 ± 1.5	3.4 ± 0.6
-Si	31.1 ± 1.5	7.9 ± 1.3	1.5 ± 0.5

6.3.2 Confronto delle produttività di biomassa annuali tra diversi tipi di impianti in campo

Nel confronto con altri studi di settore su applicazioni in campo di crescite massive di microalghe, i valori di produttività in biomassa liofila della linea di produzione presente nell'impianto di Palomonte (Sa) sono risultati inferiori rispetto ai sistemi aperti, ma abbastanza in linea con altri studi con fotobioreattori chiusi (Figura 21).

Gli studi di letteratura messi a confronto mostrano un'elevata variabilità nei risultati anche per tecnologie simili, questo ad indicare la forte dipendenza dalla geometria e dalle dimensioni della camera di coltura (in particolar modo rispetto alla raccolta della luce, alla sua distribuzione nella

coltura e alla dissipazione dell'energia termica), dalle condizioni di crescita utilizzate, dal ceppo algale adoperato per le colture massive (quasi tutte quelle utilizzate nelle applicazioni in campo proposte nei lavori di confronto sono microalghe verdi) e anche dall'ambito geografico e dalla stagione in cui vengono effettuate le sperimentazioni in campo.

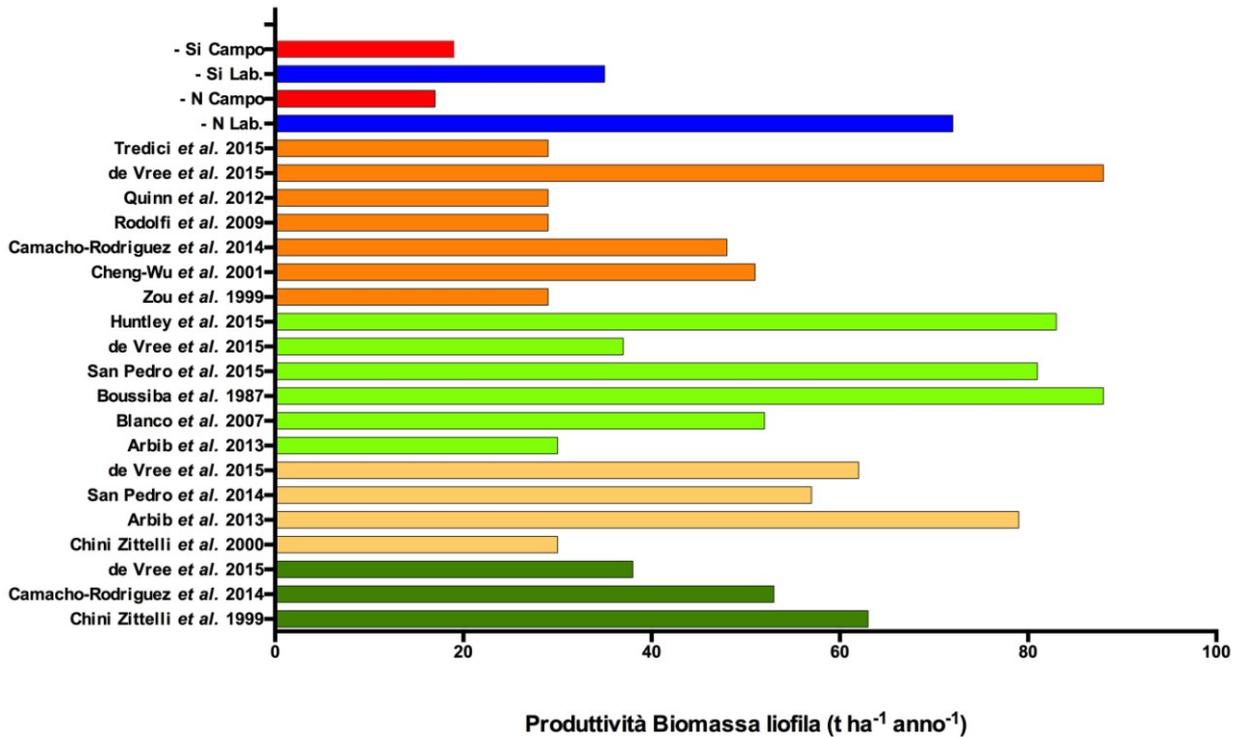


Figura 21 - Confronto tra le produttività di biomassa liofila (t ha⁻¹ anno⁻¹) della sperimentazione effettuata sulla linea di Palomonte, delle stesse tipologie di crescita ma effettuate in laboratorio e degli studi di settore sulle colture massive outdoor

La sperimentazione all'aperto nel suo complesso ha evidenziato le differenze nelle produttività in campo rispetto ai dati di laboratorio e di conseguenza l'errore che si rischia quando vengono traslati i dati ottenuti in condizioni controllate indoor ad applicazioni in condizioni outdoor.

In ogni caso sono emersi una serie di aspetti positivi e alcune criticità. Tra i primi vi sono (1) la flessibilità dell'impianto pre-industriale nel poter applicare più tipologie di crescita con il completamento di vari cicli in diverse condizioni sperimentali, anche in doppia fase, (2) la resistenza della specie alle diverse condizioni ambientali e (3) i risultati di produttività che risultano in linea con quelli ottenuti negli stessi periodi temporali e sulla stessa specie in prove all'esterno con fotobioreattori più piccoli (70 L).

La mancata produzione di triacilgliceroli è invece al momento la maggiore criticità soprattutto in ottica biotecnologica, così come i costi di produzione che, nonostante siano più bassi rispetto a quelli visti nelle altre tipologie di sistemi, sono ancora troppo elevati per essere competitivi con le altre forme di combustibili.

Il costo del biodiesel negli ultimi 5 anni ha avuto un andamento variabile con valori compresi tra 0.78 €/kg e 1.57 €/kg. Per il biodiesel di origine algale, considerando la non conflittualità con la filiera agroalimentare e gli incentivi della filiera corta, il valore economico raddoppia a 1.58 e 3.15 €/kg.

Considerando l'intero ciclo di produzione, dalla crescita algale fino ad arrivare al prodotto finito, il costo di produzione del biodiesel nell'impianto di Palomonte si aggirerebbe intorno a 16 €/kg. Per diventare competitivo il processo avrebbe bisogno di un sostanziale improvement tecnologico. Tuttavia questa possibilità non è così remota come potrebbe apparire a prima vista. In effetti una riduzione significativa dei costi di produzione può essere ottenuta attraverso una riduzione dei costi energetici. Un tale obiettivo può essere raggiunto nel caso in cui l'energia elettrica sia auto-prodotta, ipotesi possibile nel caso in cui all'impianto venga affiancato un sistema cogenerativo. Secondo le tecnologie attualmente disponibili, un impianto di co-generazione di media dimensione potrebbe permettere una riduzione superiore al 50% dei costi di produzione del biodiesel sull'impianto di Palomonte.

Un ulteriore passo verso la sostenibilità del processo può essere ottenuta sfruttando per scopi commerciali altri componenti della biomassa. In effetti l'olio costituisce solo una parte della

frazione organica ottenibile dalla coltivazione delle diatomee. Nel calcolo del prezzo del kg di biodiesel illustrato in precedenza non è stato preso in considerazione l'eventuale sfruttamento di altri composti ad alto valore aggiunto. Esempi di questi materiali sono: EPA e DHA (entrambi acidi grassi ω -3) recuperati dalla frazione lipidica; la componente silicea impiegata per la realizzazione di celle fotovoltaiche organiche; le proteine ottenute dopo estrazione della componente lipidica; composti antiossidanti e prodotti bioattivi destinabili all'industria nutraceutica, cosmetica e farmaceutica. Non è possibile calcolare in maniera precisa il valore di questi prodotti tuttavia è lecito ritenere che il loro sfruttamento possa rendere virtuoso l'intero processo produttivo.

6.4 CONCLUSIONI

La sperimentazione ha dimostrato che le produzioni in campo di un sistema biologico possono non rispecchiare perfettamente quelle ottenute in laboratorio. Questo a dimostrazione che le condizioni non controllate di luce e temperatura nelle crescite outdoor possono determinare una variabilità fisiologica che poi si riflette sulle crescita cellulare e sulla produttività in modo più rilevante di quanto sia generalmente riportato nella letteratura specializzata.

Anche se le produzioni in campo non hanno rispecchiato quelle di laboratorio, il sistema pre-industriale ha portato a risultati promettenti e, soprattutto, lascia intravedere una serie di possibili vie verso la completa sostenibilità. In primo luogo nella versatilità nel condurre in maniera completa e ripetuta interi cicli di crescita anche in periodi non particolarmente favorevoli per incidenza luminosa e temperatura, confermando le caratteristiche delle diatomee a sopravvivere anche a basse intensità luminose (Hildebrand *et al.* 2012). In secondo luogo un altro aspetto importante è che alcuni comportamenti fisiologici/metabolici osservati in laboratorio si sono riproposti anche in campo, in particolare nelle prove di limitazione di silicati.

Un importante aspetto biotecnologico messo a punto nel corso della sperimentazione in campo è l'applicazione di un protocollo di sedimentazione al buio per ridurre e concentrare i volumi di

coltura (4000 L di partenza per ogni ciclo di crescita) da cui recuperare la biomassa per centrifugazione. Infatti è stata sfruttata la capacità naturale di *T. weissflogii* di sedimentare nell'arco di un numero limitato di ore, in modo da ridurre anche di 20 volte il volume complessivo da dover centrifugare (Figura 22).



Figura 22 – (a) Contenitori di stoccaggio per la sedimentazione della biomassa; (b) biomassa umida post-centrifugazione

Nel confronto con altri studi di letteratura su colture outdoor i valori di produttività in biomassa liofila ottenuti presso l'impianto di Palomonte (Sa) sono risultati in linea con le crescite che sfruttano i fotobioreattori chiusi.

Il miglioramento tecnico del sistema, l'ottimizzazione delle condizioni di crescita e un approfondito studio sull'influenza fisiologica e metabolica anche degli altri componenti dei fumi di scarico (ad esempio NO_x ed SO_x) rappresentano passi necessari verso l'utilizzo dei risultati della sperimentazione condotta nel corso di questo lavoro di tesi dottorale e verso lo sviluppo di un sistema sostenibile per la produzione di biomasse di diatomee.

7. CONCLUSIONI FINALI

La finalità biotecnologica del presente studio è la produzione sostenibile di bio-oli, pertanto la presente tesi di dottorato ha permesso di studiare in laboratorio ed in campo su due diatomee centriche scelte come modello l'effetto sulle produzioni in biomassa liofila e lipidi, in particolare triacilgliceroli, dei nutrienti e di gas, sia CO₂ che gas di scarico da motore a combustione. Inoltre nell'ambito del lavoro di tesi sono stati sviluppati studi più approfonditi sul metabolismo lipidico e sulle sue variazioni a seguito di condizioni di stress provocate da nutrienti e gas, utilizzando metodiche di indagine spettrometrica (UHPLC/HRMS), spettroscopica (¹H-NMR) e trascrittomica. Le due specie di diatomee selezionate per il seguente lavoro (*Thalassiosira weissflogii* P09 e *Cyclotella cryptica* CCMP 331) hanno presentato già in fase di screening valori molto significativi di produttività di biomassa liofila, lipidi e triacilgliceroli, anche superiori a quelli delle più comuni microalghe verdi attualmente in uso per la produzione di biodiesel.

La risposta delle due specie è risultata altrettanto positiva anche alle successive fasi sperimentali con aggiunta dei gas quali la CO₂ e di scarico da motore a combustione e di stress da deprivazione dei nutrienti.

Per *T. weissflogii* sono stati raggiunti valori di produttività in biomassa liofila e lipidi pari a 26.4 mg L⁻¹ giorno⁻¹ e 5.5 mg L⁻¹ giorno⁻¹, rispettivamente, in condizioni di riferimento con aria (BRN), mentre nel caso di *C. cryptica* i valori di produttività di biomassa liofila e lipidi sono stati di 20.4 mg L⁻¹ giorno⁻¹ e 7.3 mg L⁻¹ giorno⁻¹, rispettivamente.

Nelle condizioni di crescita a due fasi in presenza di CO₂ al 10% e con deprivazione selettiva, *T. weissflogii* ha raggiunto valori di produttività di biomassa liofila e lipidi pari a 121.4 mg L⁻¹ giorno⁻¹ e 22.1 mg L⁻¹ giorno⁻¹, rispettivamente, nel caso della deprivazione da nitrati e 58.7 mg L⁻¹ giorno⁻¹ e 21.8 mg L⁻¹ giorno⁻¹, rispettivamente, nel caso della deprivazione da silicati.

Nel caso di *C. cryptica* invece nelle prove di crescita a due fasi in presenza di CO₂ al 10% e con deprivazione selettiva da nitrati si sono raggiunte produttività di biomassa liofila e lipidi di 75.0 mg L⁻¹ giorno⁻¹ e di 24.9 mg L⁻¹ giorno⁻¹, rispettivamente, mentre nel caso della deprivazione selettiva da silicati si sono avuti valori pari a 55.4 mg L⁻¹ giorno⁻¹ e 21.8 mg L⁻¹ giorno⁻¹, rispettivamente.

Per entrambe le specie c'è stato quindi un significativo incremento per le produttività di biomassa e soprattutto di lipidi, anche fino a 4 volte, in condizioni di crescita in doppia fase con stress da alte concentrazioni di CO₂ e carenza selettiva di nutrienti rispetto alla condizione di controllo iniziale con aria.

L'importanza della strategia di crescita a due fasi messa a punto e ottimizzata nel lavoro di tesi per incrementare la produzione di TAG e al tempo stesso avere buone rese in biomassa ha fatto registrare risultati positivi anche nelle successive sperimentazioni in campo.

A tal proposito, la specie selezionata per tale applicazione, *T. weissflogii*, e l'intero processo di sperimentazione in campo come primo passo verso lo sviluppo di un più ampio processo industriale, hanno mostrato degli aspetti incoraggianti dovuti alla resistenza del ceppo alle condizioni utilizzate, compresa la somministrazione di gas di scarico da motore a combustione, alle crescite outdoor e, per quanto riguarda il sistema, alla sua versatilità alle diverse risposte cellulari ed ambientali.

Questo tipo di sperimentazione ha dimostrato che le produzioni in campo di un sistema biologico possono non rispecchiare perfettamente quelle ottenute in laboratorio e quanto possano essere inesatte stime di produttività fondate su calcoli ottenuti da crescite effettuate in condizioni controllate di laboratorio. Questo a dimostrazione che le condizioni non controllate di luce e temperatura nelle crescite outdoor possono determinare una variabilità fisiologica che poi si riflette sulle crescita cellulare e sulla produttività in modo nettamente più significativo rispetto alle crescite indoor dove questi parametri ambientali sono tenuti sotto controllo.

Gli studi di letteratura messi a confronto hanno mostrano un'elevata variabilità nei risultati anche per tecnologie simili, questo ad indicare inoltre la forte dipendenza dalla geometria e dalle

dimensioni della camera di coltura (in particolar modo rispetto alla raccolta della luce, alla sua distribuzione nella coltura e alla dissipazione dell'energia termica), dalle condizioni di crescita utilizzate, dal ceppo algale adoperato per le colture massive (quasi tutte quelle utilizzate nelle applicazioni in campo proposte nei lavori di confronto sono microalghe verdi) e anche dall'ambito geografico e dalla stagione in cui vengono effettuate le sperimentazioni in campo.

Ad ogni modo nel confronto con altri studi di settore su applicazioni in campo di crescite massive di microalghe, i valori di produttività in biomassa liofila della linea di produzione presente nell'impianto utilizzato per la sperimentazione in campo sono risultati inferiori rispetto ai sistemi aperti, che sono i più diffusi, ma abbastanza in linea con le crescite che sfruttano i sistemi chiusi. Questo si pone come un buon punto di partenza per il miglioramento tecnico del sistema, l'ottimizzazione delle condizioni di crescita e un approfondito studio sull'influenza fisiologica e metabolica anche delle componenti dei fumi di scarico quali NO_x ed SO_x.

All'interno di uno scenario ancora oggi molto complesso e per certi versi ancora sconosciuto, quale quello strettamente legato al metabolismo lipidico delle diatomee, si è inserita l'altra attività di tesi, che con un triplice approccio (spettrometrico di massa, spettroscopico di risonanza magnetica e trascrittomico) si è posta come obiettivo quello di comprendere i meccanismi metabolici legati in particolar modo alla produzione di lipidi in condizioni di stress da deprivazione selettiva di nutrienti e presenza di alte percentuali di CO₂, che sono i parametri sperimentali applicati nelle condizioni di crescita a due fasi nelle prove in laboratorio.

I primi risultati ottenuti sulla specie selezionata per gli studi di carattere metabolico, *C. cryptica*, hanno permesso di osservare in maniera più evidente, accanto al processo di remodeling all'interno delle varie componenti lipidiche (soprattutto GL), un più ampio meccanismo di sintesi *de novo* degli acidi grassi per la produzione di TAG.

Ed è proprio all'interno della componente polare della frazione lipidica (GL e PL) che l'analisi di spettrometria di massa ha permesso di individuare, affiancata da un approccio statistico, le più significative variazioni dettate dalle condizioni di deprivazione selettiva e di presenza della CO₂.

Tale metodica ha permesso di individuare, quale effetto della CO₂, all'interno della classe lipidica degli MGDG un incremento delle combinazioni che presentano catene C18 in posizione *sn-2* ipotizzando quindi un percorso di sintesi di tipo eucariotico, situazione questa mantenuta anche nella componente PG dei fosfolipidi, dove si nota anche una riduzione degli abbinamenti che hanno il maggior numero di atomi di C e insaturazioni totali.

Le deprivazioni selettive (-N e -Si) hanno determinato anch'esse variazioni più significative nelle classi degli MGDG e dei PG portando ad un decremento delle combinazioni che presentano catene C18 in posizione *sn-2* e aumento dei digliceridi con catene C16 in posizione *sn-2*, quindi in questo caso un percorso di sintesi di tipo procariotico.

L'analisi differenziale del trascrittoma, in particolar modo per le prove di deprivazione selettiva, ha evidenziato alcune attività up- e down-regolate all'interno di specifici percorsi metabolici strettamente influenzati dal tipo di deprivazione, in accordo con i dati di letteratura e, all'interno del metabolismo lipidico, sia per le condizioni con sola CO₂ sia per quelle in deprivazione selettiva da nitrati e silicati, sono state individuate isoforme up-regolate che confermano i percorsi di sintesi procariotica ed eucariotica ipotizzati in seguito all'analisi lipidomica effettuata con UHPLC/HRMS. In definitiva l'attività di dottorato ha permesso di sviluppare, sia in laboratorio che in campo, una attività di ricerca ben pianificata e inseritasi perfettamente all'interno di un progetto PON europeo per lo "Sfruttamento Integrato di Biomasse Algali per una Filiera Energetica di Qualità, SIBAFEQ", che ha visto la partecipazione di partner di rilievo come la Ferrero S.p.A..

Nel suo insieme l'attività di ricerca ha prodotto risultati incoraggianti per quanto riguarda l'ottimizzazione delle condizioni di crescita a due fasi per le diatomee al fine di ottenere buone produttività di biomassa e lipidi, condizioni che sono state poi applicate anche a crescite massive in campo con l'ausilio di gas climalteranti. Per quanto riguarda lo studio sul metabolismo lipidico, il presente lavoro ha delineato delle prime ed interessanti informazioni che rappresenteranno un punto d'inizio per una maggiore conoscenza della tematica al fine di ottimizzare e, lì dove possibile, incrementare i prodotti finali del processo per future applicazioni biotecnologiche.

8. MATERIALI E METODI

8.1 SISTEMI PER LA CRESCITA INDOOR DELLE DIATOMEES

8.1.1 Ottimizzazione del sistema di lavoro per colture di diatomees con gas (CO₂)

Per realizzare un sistema di insufflazione della CO₂ per le prove di crescita indoor di diatomees in fotobioreattori e carboy in condizioni controllate, è stato progettato e realizzato un sistema semi-automatico per la gestione dei gas (CO₂).

Il sistema di gestione dei gas per l'attività di crescita microalgale, di seguito schematizzato su un solo fotobioreattore (Figura 1), regola le crescite all'interno di una camera isolata a temperatura controllata ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) in parallelo su:

- due fotobioreattori coassiali in PMMA da 15 L e 9 carboy da 2.3 L distribuiti su uno scaffale a tre ripiani all'interno di una cappa chimica;
- 18 carboy da 2.3 L posti all'interno di una cella climatica a temperatura controllata ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) e con impianto di illuminazione indipendente e programmabile.

Tutti i fotobioreattori e i carboy sono dotati di un sistema di micro e macroinsufflazione gestito da un apparato di manometri e flussimetri collegati direttamente al sistema di aria compressa del comprensorio nel quale è sito l'Istituto di Chimica Biomolecolare. Il flusso di CO₂ all'interno della camera è alimentato da bombole adeguatamente conservate in box di sicurezza. Solo uno dei due fotobioreattori posto sotto la cappa chimica è collegato alla linea per l'insufflazione della miscela di aria/CO₂.

Il sistema di illuminazione dei fotobioreattori e dei carboy, sia sotto la cappa chimica che nella cella climatica, è artificiale con lampade a fluorescenza e regolata con temporizzatori.

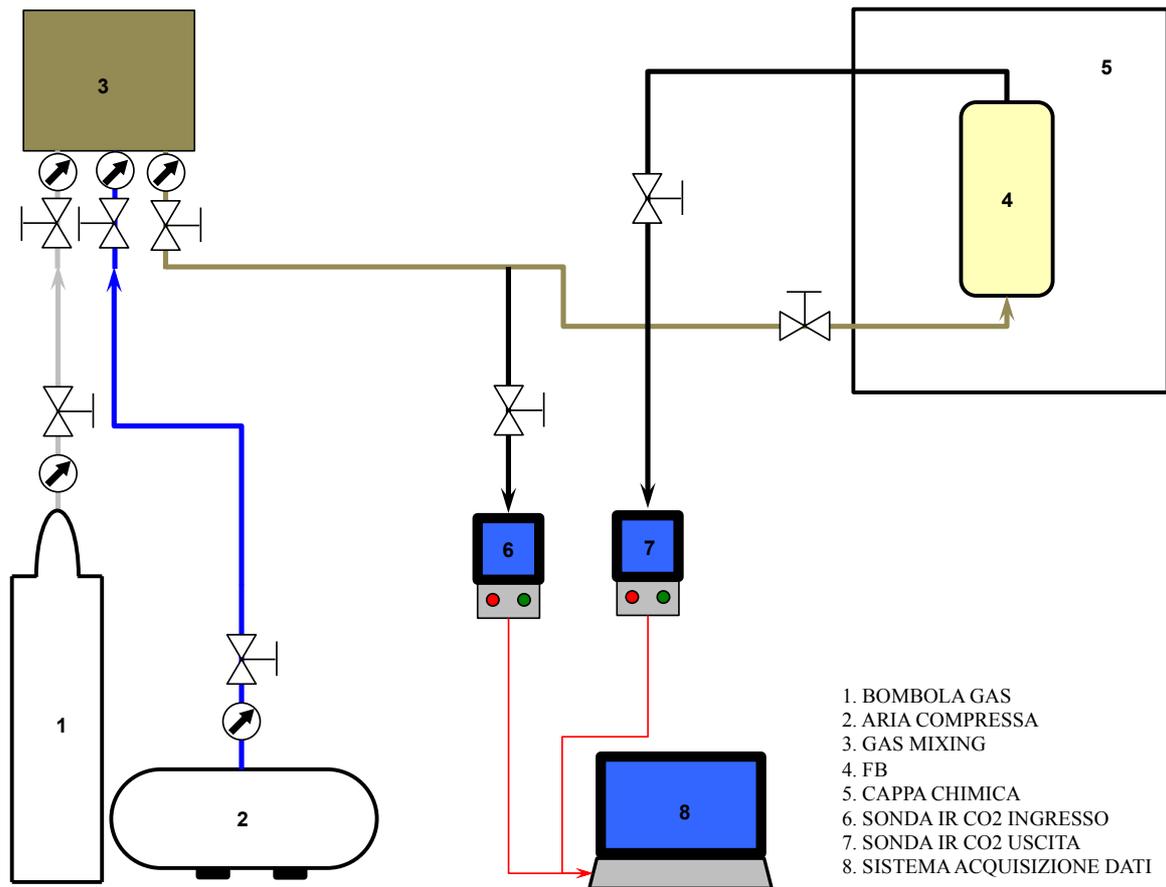


Figura 1 – Schema del sistema semi-automatico per la gestione dei gas per le crescite indoor delle diatomee

In figura 1 è schematizzato l'intero impianto: il flusso d'aria compressa (freccia azzurra) e quello del gas (CO_2 , freccia grigia) utilizzati per la crescita microalgale vengono miscelati all'interno di un gas mixing (box marrone). Il flusso miscelato (freccia marrone) viene insufflato all'interno del fotobioreattore e/o carboy nella cappa chimica o nella cella climatica, mentre un'aliquota della miscela viene prelevata ed inviata alla sonda ad infrarossi per monitorare la percentuale di CO_2 insufflata (freccia nera). Tramite una pompa di aspirazione, una seconda aliquota viene prelevata dallo spazio di testa del fotobioreattore o carboy e viene inviata alla sonda ad infrarossi per la misurazione istantanea della percentuale di CO_2 in uscita dal fotobioreattore o carboy (freccia nera). I sensori per la CO_2 a lettura IR hanno una scala di rivelazione compresa tra 0 - 25% e la lettura dei valori avviene mediante visualizzazione su display.

Al sistema a doppio canale bidirezionale per l'insufflazione della miscela aria/CO₂ è stato aggiunto un impianto di refrigerazione a trappola per abbattere i vapori di condensa generati dall'utilizzo dei gas. Tale sistema, installato all'ingresso delle sonde IR per il rilevamento della CO₂, ha permesso di ridurre le interferenze in fase di misurazione.

I valori monitorati dalle sonde vengono registrati ad intervalli di cinque secondi dal sistema di acquisizione dati posto all'esterno della camera isolata a temperatura controllata. I dati misurati con interfaccia di collegamento RS-232 sono monitorati e salvati con software di gestione MaMos II v. 8.9.3 (Figura 2).



Figura 2 - Sensori con visualizzazione digitale dei parametri monitorati (a sinistra) e postazione di controllo per il salvataggio dei dati (a destra)

Le prove di calibrazione dei sensori per la CO₂ sono state condotte effettuando verifiche con gas puro a concentrazione nota. Infatti in seguito all'installazione del sistema anticondensa, le sonde (Ingresso e Uscita) sono state calibrate attraverso analisi con un gas-cromatografo (Focus GC, Thermo Scientific) dotato di detector a termoconduttività (TCD), di colonna capillare Hayesep Q e che utilizza N₂ come gas carrier. In questo modo è stato possibile confrontare l'esatta corrispondenza tra i valori rilevati dalle sonde di misurazione e i valori ottenuti al GC.

Tutti i punti in ingresso e in uscita, così come quelli della curva di taratura, sono stati campionati in triplicato. L'intervallo di calibrazione della curva di taratura della CO₂ (0 – 20%) è stato definito utilizzando percentuali di CO₂ prelevate da una bombola a titolo noto e scelto sulla base delle

concentrazioni sperimentali che devono essere utilizzate per le prove di crescita delle diatomee con questo gas (Tabella 1 e Figura 3).

Tabella 1 - Valori dell'analisi gas-cromatografica per la definizione della curva di taratura della CO₂

CURVA DI TARATURA CO₂					
CO ₂ (%)	I Corsa	II Corsa	III Corsa	Media	Deviazione standard
2%	189220	211177	218320	206239	12383
4%	323022	312556	316940	317506	4291
10%	490604	497824	494144	494191	2948
14%	570208	577114	557089	568137	8305
20%	658979	631685	632704	641123	12633

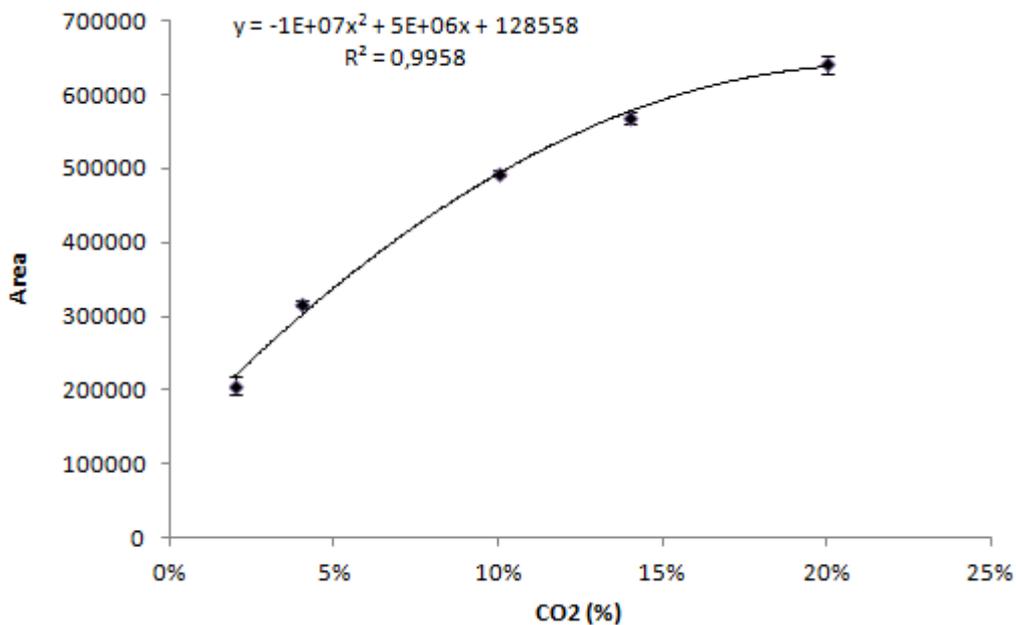


Figura 3 - Curva di taratura della CO₂ ottenuta graficando i valori in tabella 1

In tabella 2 sono riportate in nero le percentuali di CO₂ prelevate da una bombola a titolo noto, iniettate al GC e utilizzate per la definizione della curva di taratura, mentre i valori ottenuti dai prelievi del gas all'ingresso del sistema sono colorati.

Il controllo della percentuale di CO₂ presente all'ingresso del sistema è stato effettuato prelevando con una specifica siringa a tenuta un'aliquota di 1 mL della miscela aria/CO₂ al 10% in punti diversi:

- direttamente dal fotobioreattore/carboy in condizioni normali di lavoro (rosso);
- direttamente all'ingresso della sonda IR (verde).

In entrambi i casi i valori medi ottenuti al GC sono in linea con quelli della CO₂ al 10% proveniente da una bombola di gas puro.

Tabella 2 – Analisi al gas-cromatografo dei valori della CO₂ in ingresso nel fotobioreattore/carboy

TARATURA + INGRESSO CO₂					
CO₂ (%)	I Corsa	II Corsa	III Corsa	Media	Deviazione standard
2%	189220	211177	218320	206239	12383
4%	323022	312556	316940	317506	4291
10%	490604	497824	494144	494191	2948
10%	484021	484078	479935	482678	1940
10%	487974	489264	492280	489839	1804
14%	570208	577114	557089	568137	8305
20%	658979	631685	632704	641123	12633



(Ingresso) direttamente dal fotobioreattore/carboy in condizioni normali di lavoro

(Ingresso) direttamente all'ingresso della sonda IR

In tabella 3 sono riportate in nero le percentuali di CO₂ prelevate da una bombola a titolo noto, iniettate al GC e utilizzate per la definizione della curva di taratura, mentre i valori ottenuti dai prelievi del gas all'uscita del sistema sono colorati.

Il controllo della percentuale di CO₂ presente in uscita è stato effettuato prelevando con una siringa a tenuta un'aliquota di 1 mL della miscela aria/CO₂ al 10% in due punti specifici:

- direttamente all'ingresso della sonda IR con carboy vuoto (rosso);

➤ direttamente all'ingresso della sonda IR con carboy pieno (verde).

Tabella 3 – Analisi al gas-cromatografo dei valori della CO₂ in uscita dal fotobioreattore/carboy

TARATURA + USCITA CO₂					
CO ₂ (%)	I Corsa	II Corsa	III Corsa	Media	Deviazione standard
2%	189220	211177	218320	206239	12383
4%	323022	312556	316940	317506	4291
10%	490604	497824	494144	494191	2948
10%	484503	483435	478781	482240	2484
10%	476652	484001	489163	483272	5134
14%	570208	577114	557089	568137	8305
20%	658979	631685	632704	641123	12633



(Uscita) direttamente all'ingresso della sonda IR con carboy vuoto

(Uscita) direttamente all'ingresso della sonda IR con carboy pieno

I dati ottenuti nei diversi punti monitorati confermano, attraverso l'utilizzo dei coefficienti della curva di taratura ottenuta con CO₂ a titolo noto, la corretta calibrazione delle sonde IR (Tabella 4).

Tabella 4 - Confronto tra i valori di CO₂ "teorici" e quelli "reali" (calcolati utilizzando i coefficienti della curva di taratura ottenuta al GC) dei prelievi della miscela aria/CO₂ fatti in diversi punti del sistema

INGRESSO CO₂						
CO ₂ teorica (%)	I Corsa	II Corsa	III Corsa	Media	Deviazione standard	CO ₂ reale (%)
10%	484021	484078	479935	482678	1940	9.57
10%	487974	489264	492280	489839	1804	9.84



(Ingresso) direttamente dal fotobioreattore/carboy in condizioni normali di lavoro

(Ingresso) direttamente all'ingresso della sonda IR

USCITA CO₂

CO ₂ (%)	I Corsa	II Corsa	III Corsa	Media	Deviazione standard	CO ₂ reale (%)
10%	484503	483435	478781	482240	2484	9.56
10%	476652	484001	489163	483272	5134	9.58



(Uscita) direttamente all'ingresso della sonda IR con carboy vuoto

(Uscita) direttamente all'ingresso della sonda IR con carboy pieno

8.1.2 Caratteristiche della cappa chimica

All'interno della cappa chimica (Atsfaa – Linea Flex) è possibile condurre le crescite con miscele di aria/gas climalteranti su due fotobioreattori da 15 L e su 9 carboy da 2.3 L distribuiti su uno scaffale a tre ripiani (Figura 4). L'illuminazione è operata con lampade a fluorescenza ($250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), specifiche per le crescite di organismi fotosintetici, con intensità luminosa modulabile e fotoperiodo controllabile automaticamente con timer. Sia sotto la cappa chimica che all'interno della cella climatica l'intensità luminosa è stata misurata con un luxmetro DeltaOhm HD2102. Il sistema prevede l'espulsione verso l'esterno della camera dei gas utilizzati per le misurazioni delle sonde a IR e dei gas in eccesso in uscita dai carboy e dai fotobioreattori.



Figura 4 – Cappa chimica utilizzata per le colture in fotobioreattore/carboy con gas climalteranti e centrifuga a flusso tangenziale Alfa Laval

8.1.3 Caratteristiche della cella climatica

All'interno della cella climatica (Schneider Electric) è possibile condurre le crescite con miscele di aria/gas climalteranti su 18 carboy da 2.3 L distribuiti su tre ripiani (Figura 5). La cella è a temperatura controllata ($20 \pm 1^\circ\text{C}$); anche la luce al suo interno, prodotta da lampade a fluorescenza ($250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ha intensità modulabile e fotoperiodo controllabile automaticamente con timer. La cella è collegata alla cappa chimica per l'espulsione dei gas in uscita dai carboy.



Figura 5 – Cella climatica a temperatura e luce controllata con 9 carboy con colture di diatomee disposti sui tre ripiani

8.2 CEPPI UTILIZZATI PER LA SPERIMENTAZIONE E PREPARAZIONE DEI MEZZI DI CRESCITA

8.2.1 Ceppi utilizzati

Sono stati acquistati dal National Center of Marine Algae and Microbiota (Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, USA) i seguenti ceppi:

- le diatomee: *Chaetoceros curvisetus* CCMP 3260, *Chaetoceros socialis* CCMP 3263, *Chaetoceros affinis* CCMP 3259, *Thalassiosira rotula* CCMP 1647, *Thalassiosira rotula* CCMP 3264, *Thalassiosira weissflogii* CCMP 1010, *Thalassiosira weissflogii* CCMP 1336, *Thalassiosira pseudonana* CCMP 1335, *Cyclotella cryptica* CCMP 331, *Skeletonema marinoi* CCMP 2092, *Skeletonema marinoi* CCMP 2052, *Ditylum brightwelli* CCMP 358, *Melosira octogona* CCMP 483, *Cylindrotheca fusiformis* CCMP 343 e *Phaeodactylum tricornutum* CCMP 632;
- le microalghe verdi: *Nannochloropsis salina* CCMP 369, *Dunaliella tertiolecta* CCMP 1320 e *Chlamydomonas* sp. CCMP 222.

Dunaliella salina CCAP 19/18 è stata acquistata dalla Culture Collection of Algae and Protozoa (Oban, Scotland).

Thalassiosira weissflogii ICB CP09 è un subcampione di un isolamento ottenuto dalla Stazione Zoologica “A. Dohrn” di Napoli; anche *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* è stata ottenuta dalla Stazione Zoologica “A. Dohrn” di Napoli.

8.2.2 Preparazione inoculi e mezzi di crescita con acqua di mare naturale

Le specie utilizzate per la sperimentazione sono state cresciute in carboy autoclavabili in polipropilene e policarbonato da 2.3 L di volume totale con un volume di coltura di 2 L (Figura 6). Come base per il mezzo di crescita è stata utilizzata acqua di mare naturale, proveniente dal Golfo

di Napoli (salinità circa 40 g L^{-1}) o dal Golfo di Pozzuoli (salinità circa 38 g L^{-1}) misurata con rifrattometro (Sper Scientific 106 ATC).



Figura 6 – Classica crescita di diatomee in carboy autoclavabile con un volume di coltura di 2 L

Per ottenere crescite monospecifiche l'acqua di mare è stata filtrata mediante filtri Millipore con pori del diametro di $0.22 \mu\text{m}$ e successivamente sterilizzata in autoclave alla temperatura di 121°C ed alla pressione di 1 atm per 20 minuti, così come le soluzioni dei nutrienti del mezzo di crescita f/2 (Guillard *et al.* 1962), ad eccezione delle vitamine che, per la loro struttura chimica, risultano essere altamente sensibili alla temperatura e che per questa ragione sono state solamente filtrate (filtri Millipore $0.22 \mu\text{m}$).

I carboy con acqua di mare autoclavata sono stati utilizzati in condizioni sterili sotto cappa biologica a flusso laminare: gli inoculi sono stati fatti in modo da avere una concentrazione cellulare iniziale pari a $10000 \text{ cell mL}^{-1}$; sotto cappa biologica sono aggiunte anche le opportune aliquote delle soluzioni dei nutrienti nelle quantità e nei tempi specifici a seconda dell'esperimento da eseguire. Gli inoculi sono stati mantenuti a temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e illuminazione costante con un fotoperiodo di 14 ore di luce e 10 ore di buio.

In tutti gli esperimenti le colture sono state mantenute in costante agitazione mediante un sistema di insufflazione d'aria, resa sterile grazie alla presenza di filtri Midisart 2000 Sartorius di porosità 0.22

μm collegati al sistema di bubbling, regolato in maniera tale da evitare sia la deposizione delle cellule sul fondo dei carboy, sia un disturbo meccanico.

8.2.3 Mezzo di coltura standard f/2

All'acqua di mare che costituisce la base del terreno di crescita si aggiungono:

➤ MACRONUTRIENTI

- 1 mL L⁻¹ di Na₂SiO₃ x 9H₂O = 30 g L⁻¹ (concentrazione finale 106 μM);
- 1 mL L⁻¹ di NaNO₃ = 75 g L⁻¹ (concentrazione finale 882 μM);
- 1 mL L⁻¹ di NaH₂PO₄ x H₂O = 5 g L⁻¹ (concentrazione finale 36.2 μM);

➤ MICRONUTRIENTI

- 1 mL L⁻¹ della soluzione madre di oligoelementi costituita da:
 - Na₂EDTA x 2H₂O = 4.36 g L⁻¹;
 - FeCl₃ x 6H₂O = 3.15 g L⁻¹;
 - MnCl₂ x 4H₂O = 0.18 g L⁻¹;
 - CuSO₄ x 5H₂O = 0.01 g L⁻¹;
 - ZnSO₄ x 7H₂O = 0.022 g L⁻¹;
 - CoCl₂ x 6H₂O = 0.01 g L⁻¹;
 - NaMoO₄ x 2H₂O = 0.006 g L⁻¹;

➤ VITAMINE

- 0.5 mL L⁻¹ della soluzione madre di vitamine contenente:
 - biotina = 0.001 g L⁻¹;
 - cobalamina = 0.001 g L⁻¹;
 - tiamina-HCl = 0.2 g L⁻¹.

Per controllare il pH durante le fasi della crescita è stato usato come tampone il Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) 400 mM pH 7.8 (5 mL L⁻¹).

8.3 PROVE DI CRESCITA PER LA VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI CO₂ E NUTRIENTI SULLA FISIOLOGIA DELLE DIATOMEE

8.3.1 Crescite per le curve di controllo a Basso Regime di Nutrienti (BRN)

Per la prova in condizione di Basso Regime di Nutrienti, i nutrienti sono stati aggiunti solo al giorno 0; l'inoculo è stato fatto in modo da avere una concentrazione cellulare iniziale di 10000 cell mL⁻¹. Le colture sono state insufflate con aria (CO₂ allo 0.04%) tutti i giorni della curva di crescita. Per ciascuna delle due specie modello utilizzate tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato a 20 ± 1°C, ad un'intensità luminosa di 250 μE m⁻² s⁻¹ con ciclo luce-buio di 14/10 ore, in carboy autoclavabili in PC da 2.3 L con un volume di coltura di 2 L.

In tutte le prove oltre alla quantità assoluta (mg/L) e percentuale (sia rispetto al peso umido che liofilo) di lipidi, proteine e carboidrati, valutate nel giorno intermedio e finale della crescita, sono stati monitorati quotidianamente per tutta la durata della curva di crescita il pH (a temperatura ambiente con pHmetro MeterLab PHM210), la concentrazione cellulare (cell mL⁻¹) (due volte al giorno), la produzione qualitativa e quantitativa dei lipidi polari e neutri mediante spettri ¹H-NMR e il consumo di nitrati, silicati e fosfati (sia come % che come μM) (Tabella 5).

Per tutte le prove, al giorno intermedio e finale della curva di crescita sono stati prelevati 500 mL di ciascuna coltura e la biomassa è stata recuperata e aliquotata (come descritto nel paragrafo 8.4.2) per le successive analisi di lipidi, proteine e carboidrati (paragrafi da 8.5.1 a 8.5.5).

Tabella 5 – Schema riassuntivo del numero complessivo dei campioni saggiati per ciascuna delle analisi che sono state effettuate lungo le curve di crescita per entrambe le specie in tutte le prove di crescita delle specie modello (paragrafi da 8.3.1 a 8.3.6)

PROVA	ANALISI LIPIDI	ANALISI PROTEINE	ANALISI CARBOIDRATI	ANALISI NITRATI	ANALISI SILICATI	ANALISI FOSFATI	ANALISI ¹ H-NMR
Basso Regime di Nutrienti (BRN)	6	36	36	84	84	84	6
Basso Regime di Nutrienti + CO ₂ [BRN (CO ₂)]	6	36	36	84	84	84	6
Alto Regime di Nutrienti (ARN)	6	36	36	84	84	84	6
Alto Regime di Nutrienti + Sospensione Aggiunta Nutrienti (ARN + SAN)	12	72	72	168	168	168	12
Alto Regime di Nutrienti + Sospensione Aggiunta Nutrienti con CO ₂ [ARN + SAN (CO ₂)]	12	72	72	168	168	168	12
Alto Regime di Nutrienti con CO ₂ + Sospensione Aggiunta Nutrienti con CO ₂ [ARN (CO ₂) + SAN (CO ₂)]	12	72	72	168	168	168	12

8.3.2 Crescite per le curve a Basso Regime di Nutrienti (BRN) con CO₂ al 10%

Per entrambe le specie queste crescite sono state effettuate come quella di controllo con aria, ma insufflando quotidianamente CO₂ al 10% per sette ore al giorno durante la fase luminosa del fotoperiodo.

8.3.3 Crescite ad Alto Regime di Nutrienti (ARN)

Per entrambe le specie le crescite sono state condotte come descritto precedentemente, ma per tutta la durata della curva di crescita sono stati aggiunti quotidianamente i nutrienti tipici dell'f/2 (macronutrienti, micronutrienti, vitamine e tampone) e le colture sono state insufflate con aria (CO₂ allo 0.04%) tutti i giorni.

8.3.4 Crescite in doppia fase ad Alto Regime di Nutrienti seguito da Sospensione Aggiunta Nutrienti (ARN + SAN)

Per entrambe le specie le crescite sono state condotte come descritto precedentemente, ma sono stati aggiunti quotidianamente i nutrienti tipici dell'f/2 per i primi sette giorni della curva di crescita; nella seconda fase invece è stata effettuata la sospensione totale dell'aggiunta dei nutrienti. Le colture sono state insufflate con aria (CO₂ allo 0.04%) tutti i giorni.

8.3.5 Crescite in doppia fase ad Alto Regime di Nutrienti seguito da Sospensione Aggiunta Nutrienti ma in presenza di CO₂ al 10% (ARN + SAN (CO₂))

Per entrambe le specie le crescite sono state effettuate come per l'esperimento ARN + SAN, ma insufflando CO₂ al 10% per sette ore al giorno durante la fase luminosa del fotoperiodo nella fase di sospensione totale dell'aggiunta dei nutrienti.

8.3.6 Crescite in doppia fase ad Alto Regime di Nutrienti con CO₂ al 10% seguito da Sospensione Aggiunta Nutrienti in presenza di CO₂ al 10% (ARN (CO₂) + SAN (CO₂))

Per entrambe le specie le crescite sono state effettuate come per l'esperimento ARN + SAN, ma insufflando CO₂ al 10% per sette ore al giorno durante la fase luminosa del fotoperiodo per tutta la durata della curva di crescita.

8.3.7 Crescite in doppia fase ad Alto Regime di Nutrienti con CO₂ al 10% seguito da deprivazione selettiva di silicati, fosfati o nitrati in presenza di CO₂ al 10%

Per entrambe le specie le crescite sono state condotte in triplicato nelle condizioni di luce, temperatura e inoculo descritte precedentemente. Durante la prima fase della crescita (sette giorni) l'aggiunta quotidiana dei macronutrienti (silicati, nitrati e fosfati) è stata dosata in funzione del reale consumo cellulare tramite monitoraggio quotidiano con saggio quantitativo colorimetrico, mentre i micronutrienti (metalli in tracce, vitamine e tampone) sono stati aggiunti secondo le quantità classiche dell'*f*/2. Nella seconda fase è stato eliminato un solo macroelemento dal mezzo di crescita (silicati, nitrati o fosfati), mentre i restanti macronutrienti e micronutrienti sono stati aggiunti con la stessa metodica della prima fase. Le colture sono state insufflate con CO₂ al 10% per sette ore al giorno per tutto il periodo di crescita.

Tabella 6 – Schema riassuntivo del numero complessivo dei campioni saggiati per ciascuna delle analisi che sono state effettuate lungo le curve di crescita per entrambe le specie (paragrafo 8.3.7)

PROVA	ANALISI LIPIDI	ANALISI PROTEINE	ANALISI CARBOIDRATI	ANALISI NITRATI	ANALISI SILICATI	ANALISI FOSFATI	ANALISI ¹ H-NMR
Deprivazione selettiva (-P)	12	72	72	168	168	168	12
Deprivazione selettiva (-N)	12	72	72	168	168	168	12
Deprivazione selettiva (-Si)	12	72	72	168	168	168	12

8.3.8 Crescite di *C. cryptica* per le analisi di lipidomica e trascrittomica

Le crescite in triplicato sono state condotte nelle condizioni di luce, temperatura e inoculo descritte precedentemente. Sono state avviate quattro tipi diversi di coltura con *C. cryptica*:

- Regime Controllato di Nutrienti (RCN): aggiunta quotidiana dei macronutrienti (silicati, nitrati e fosfati) dosata in funzione del reale consumo tramite monitoraggio quotidiano con saggio quantitativo colorimetrico, mentre i micronutrienti (metalli in tracce, vitamine e tampone) sono stati aggiunti secondo le quantità classiche dell' $f/2$. Le colture sono state insufflate con aria (CO₂ allo 0.04%) tutti i giorni della curva di crescita;
- Regime Controllato di Nutrienti con CO₂ al 10% (RCN CO₂): condotta come la prova precedente, ma insufflando il 10% di CO₂ per sette ore al giorno durante la fase luminosa del fotoperiodo per tutta la durata della curva di crescita;
- -Si: nei primi sette giorni della curva di crescita è stata effettuata l'aggiunta quotidiana dei macronutrienti (silicati, nitrati e fosfati) in funzione del reale consumo delle cellule tramite monitoraggio quotidiano con saggio quantitativo colorimetrico, mentre i micronutrienti (metalli in tracce, vitamine e tampone) sono stati aggiunti secondo le quantità classiche dell' $f/2$. Nella seconda fase è stato eliminato un solo macroelemento del mezzo di crescita (silicati), mentre i restanti macronutrienti e micronutrienti sono stati aggiunti con la stessa metodica della prima fase. Le colture sono state insufflate con CO₂ al 10% per sette ore al giorno per tutto il periodo di crescita;

- -N: condotta come la prova precedente, ma l'elemento scelto per la deprivazione selettiva è stato l'azoto.

8.4 TECNICHE PER IL MONITORAGGIO DELLE CRESCITE CELLULARI

8.4.1 Metodi diretti e indiretti per la determinazione cellulare

Un metodo diretto per monitorare la crescita è la conta cellulare quotidiana con camera di Bürker e l'osservazione dello stato morfologico delle cellule utilizzando un microscopio ottico a contrasto di fase (Zeiss Axio) dotato di fotocamera AxioCam MRc5 e con un ingrandimento di 20x.

La camera di Bürker è costituita da nove quadrati delimitati da tre linee affiancate e possiede un volume totale di 0.1 mm^3 (1 mL) (Figura 7); la concentrazione di cellule per mL (cell mL^{-1}) è stata determinata mediante il seguente calcolo:

$$\text{cell mL}^{-1} = \text{conteggio medio per quadrato} \times \text{fattore di diluizione} \times 10^4$$

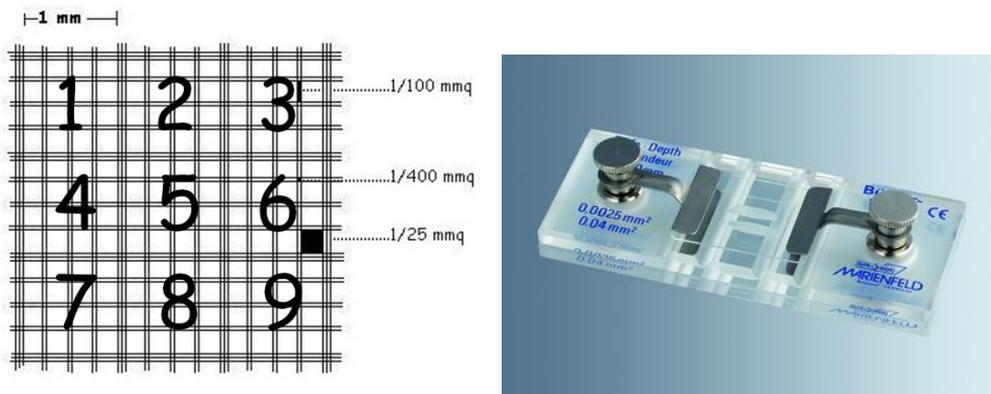


Figura 7 – Schema dei nove quadrati (a sinistra) e foto di una classica camera di Bürker per la conta cellulare (a destra)

Un'altra metodica per la quantificazione della biomassa è la determinazione del peso secco, che prevede il prelievo di una quantità nota di coltura, che viene centrifugata a 3750 rpm per 10 minuti a 4°C (Allegra X12R, Beckman Coulter) in una falcon pesata. Successivamente il surnatante viene allontanato e la biomassa così ottenuta è ricentrifugata a 3750 rpm per 1 minuto a 4°C, in modo da

eliminare ogni possibile residuo di acqua esterna alle cellule. La biomassa risultante è congelata a -20°C per il tempo necessario e poi liofilizzata (MicroModulyo, Thermo Fisher Scientific). Successivamente per differenza tra il peso lordo e la tara è possibile ricavare il peso secco della biomassa.

8.4.2 Recupero della biomassa per le analisi biochimiche

500 o 200 mL di coltura sono prelevati dal carboy, aliquotati all'interno di falcon da 50 mL e centrifugati a 3750 rpm per 10 minuti a 4°C (Allegra X12R, Beckman Coulter). Successivamente il surnatante è recuperato e un'aliquota filtrata con filtri Millipore 0.22 µm per i saggi colorimetrici quantitativi di silicati, fosfati e nitrati. Con la parte residua del surnatante le cellule sono risospese e concentrate in un'unica falcon pesata. L'insieme delle cellule concentrate è poi ripartito in tre parti (1 falcon da 50 mL e 2 da 15 mL):

- 44 mL per la quantificazione della biomassa liofila e dei lipidi (estrazione di Folch modificata o metodo MTBE);
- 5 mL per la quantificazione dei carboidrati (metodo di DuBois);
- 1 mL per la quantificazione delle proteine (metodo di Lowry).

Le tre falcon sono centrifugate a 3750 rpm per 10 minuti a 4°C, allontanato il surnatante e ricentrifugate a 3750 rpm per 1 minuto a 4°C per allontanare il residuo d'acqua.

Al termine di queste operazioni i campioni sono pesati, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C fino al loro utilizzo. I surnatanti filtrati per i saggi quantitativi di silicati, fosfati e nitrati sono conservati a -20°C.

8.5 ANALISI BIOCHIMICHE DELLE COMPONENTI CELLULARI

8.5.1 Determinazione del contenuto di carboidrati (Metodo di DuBois)

La determinazione del contenuto di carboidrati totali è stato effettuato mediante il saggio fenolo/acido solforico (DuBois *et al.* 1956). La retta di taratura è stata costruita con diverse concentrazioni di D-glucosio, partendo da una soluzione nota (1 mg mL^{-1}).

Le cellule microalgali umide sono state risospese in $400 \mu\text{L}$ di H_2O distillata e filtrata a $0.22 \mu\text{m}$. Le cellule risospese in H_2O sono state trasferite in vial di vetro e sottoposte a idrolisi acida tramite l'aggiunta di 1.6 mL di H_2SO_4 98% per 20 ore. Al termine dell'incubazione le vial sono state poste in ghiaccio e al loro interno sono stati aggiunti 4 mL di H_2O distillata raggiungendo così un volume finale di 6 mL . In seguito, 1 mL di campione è stato trasferito in eppendorf e centrifugato a 10000 rpm per 5 minuti a 4°C (Hermle Z326K): sul surnatante è stato effettuato il saggio di Dubois.

Aliquote di campione da 50 , 100 e $200 \mu\text{L}$ sono state aggiunte in provetta insieme ad H_2O distillata per un volume finale complessivo pari a $500 \mu\text{L}$, poi sono stati aggiunti $25 \mu\text{L}$ di reattivo di DuBois (40 g fenolo + 160 mL di H_2O) ed infine 1.25 mL di H_2SO_4 98%. Le miscele sono state agitate tramite vortex ed incubate per 30 minuti a temperatura ambiente. Le letture spettrofotometriche sono state effettuate a $\lambda = 490 \text{ nm}$ (Jasco V-650) contro un bianco contenente tutti i reattivi sopra elencati ad eccezione del campione.

8.5.2 Determinazione del contenuto proteico (Metodo di Lowry)

Il contenuto proteico totale è stato determinato mediante saggio colorimetrico di Lowry (Bio-Rad DC Protein Assay), utilizzando una retta di taratura preparata con quantità note di albumina di siero bovino (BSA, 1 mg mL^{-1}) (Lowry *et al.* 1951).

Il campione liofilizzato (MicroModulyo, Thermo Fisher Scientific) è stato sospeso in $100 \mu\text{L}$ di tampone fosfato 50 mM pH 7 + $20 \mu\text{L}$ Triton X-100 25% (v/v) e mediante un bagnetto a ultrasuoni

100 MHz (UltraSONIK NDI) si è provveduto per tre minuti alla rottura delle cellule in ghiaccio; successivamente il campione è stato lasciato a temperatura ambiente per 15 minuti. Trascorso questo tempo sono stati aggiunti 380 μL di tampone fosfato 50 mM pH 7.0 e dopo aver sonicato in ghiaccio per un altro minuto il campione è stato trasferito in eppendorf. A questo punto il campione è stato centrifugato a 10000 rpm per 5 minuti a 4°C (Hermle Z326K).

Sono state saggiate aliquote da 5, 10 e 20 μL del surnatante del campione centrifugato: in provette di plastica vengono aggiunti 50 μL di tampone fosfato 50 mM pH 7.0, Triton X-100 1% (v/v) e il campione per un volume totale di 50 μL , 100 μL di reattivo A + S (20 μL di reattivo S/980 μL di reattivo A; soluzione alcalina di tartrato di rame) e 800 μL di reattivo B (reagente di Folin). Tutte le provette sono state agitate tramite vortex e incubate a temperatura ambiente per 15 minuti al buio. Le letture spettrofotometriche sono state effettuate a $\lambda = 740 \text{ nm}$ (Jasco V-650) contro un bianco contenente tutti i reattivi sopra elencati ad eccezione del campione. Il caratteristico colore blu è dovuto alla presenza degli amminoacidi triptofano e tirosina e, in misura minore, cisteina e istidina.

8.5.3 Determinazione del contenuto lipidico totale (*Estrazione di Folch modificata*)

L'estratto lipidico totale è stato ottenuto mediante estrazione con il metodo di Folch modificato (Folch *et al.* 1957). Ad una quantità nota di biomassa liofilizzata (MicroModulyo, Thermo Fisher Scientific) e polverizzata (50 mg) è stato aggiunto metanolo (CH_3OH) nella quantità 1 mL/50 mg biomassa liofila e lo standard CPHS (4-clorofenil-triesadecilsilano, 50 mg mL^{-1} in THF conservato a 4°C) nella quantità di 1 mg/50 mg biomassa liofila. Dopo aver sonicato il campione in ghiaccio per 2 minuti a 100 MHz (UltraSONIK NDI) è stato aggiunto cloroformio (CHCl_3) nella quantità di 2 mL/50 mg biomassa liofila. Successivamente, dopo un altro minuto di sonicazione in ghiaccio, il campione è stato centrifugato a 3750 rpm per 5 minuti a 4°C (Allegra X12R, Beckman Coulter). La fase organica è stata recuperata all'interno di una falcon, mentre al pellet residuo è stata aggiunta una miscela di cloroformio/metanolo ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$) 2:1 (v/v) (3 mL/50 mg biomassa liofila). Il campione è stato nuovamente sonicato in ghiaccio per un minuto e centrifugato per altri 5 minuti a

4°C a 3750 rpm. La fase organica ottenuta dalla seconda estrazione è stata recuperata ed aggiunta a quella precedentemente posta in falcon. A tutta la fase organica è stata poi aggiunta H₂O distillata e filtrata a 0.22 µm nella quantità di ¼ del volume della fase organica. Il campione è stato centrifugato per 5 minuti a 4°C a 3750 rpm; si ottiene così una miscela a tre fasi: la fase superiore, corrispondente alla fase acquosa; la fase intermedia costituita dal pellet residuo e la fase inferiore corrispondente alla fase organica. Dopo aver rimosso la fase acquosa, la fase organica è stata recuperata all'interno di un pallone di vetro e portata a secco mediante evaporatore rotante (Buchi Rotavapor R-210). Il campione portato a secco è risospeso nel minimo volume di una miscela cloroformio/metanolo (CHCl₃/CH₃OH 2:1 v/v) e trasferito in vial di vetro pesata, e riportato a secco sotto costante flusso di azoto. Prima di essere pesato e conservato a -80°C, il campione è stato messo sotto pompa ad aria per eliminare eventuali residui di acqua.

Gli estratti lipidici sono stati analizzati quantitativamente mediante misurazione del peso secco dell'estratto e qualitativamente con ¹H-NMR 600 MHz (metodo ERETIC) per la determinazione delle diverse classi di composti lipidici.

8.5.4 Determinazione del contenuto lipidico totale (Metodo Metil-Tert-ButilEtere – MTBE)

Ad una quantità nota di biomassa liofilizzata (MicroModulyo, Thermo Fisher Scientific) e polverizzata (50 mg) sono stati aggiunti 400 µL di metanolo (CH₃OH) e 500 µL di standard 4,4'-diidrossibenzofenone (DHBP, 0.5 mg/0.5 mL in metanolo). Dopo aver agitato mediante vortex sono stati aggiunti 3 mL di metil-tert-butiletere (MTBE) (Matyash *et al.* 2008): il campione è stato lasciato per un'ora sotto agitazione a temperatura ambiente. In seguito, al campione sono stati aggiunti 750 µL di H₂O distillata e filtrata a 0.22 µm ed è stato lasciato per altri 10 minuti in agitazione a temperatura ambiente e successivamente centrifugato a 1000 g per 10 minuti a 4°C (Allegra X12R, Beckman Coulter). Si ottiene così una miscela a due fasi: la fase superiore è quella organica, mentre quella inferiore è quella acquosa. Dopo aver recuperato la fase organica all'interno di un pallone di vetro, è stato aggiunto alla fase acquosa 1 mL di MTBE. In seguito il campione è

stato messo nuovamente in agitazione per 10 minuti a temperatura ambiente e poi centrifugato a 1000 g a 4°C per 10 minuti. La fase organica ottenuta da questa seconda estrazione è stata recuperata ed aggiunta alla prima precedentemente recuperata all'interno del pallone di vetro. Ultimato il recupero, il pallone di vetro è stato portato a secco mediante rotavapor (Buchi Rotavapor R-210). Il campione a secco è stato sciolto nel minor volume di una miscela metanolo/MTBE 8:2 (v/v), trasferito in vial di vetro pesata e successivamente portato a secco sotto costante flusso di azoto. Il campione portato a secco, prima di essere pesato e conservato a -80°C, è stato messo sotto pompa ad aria per eliminare eventuali residui di acqua.

L'estratto lipidico totale, sia proveniente da estrazione con metodo di Folch modificato che con metodo MTBE, è stato analizzato dal punto di vista qualitativo mediante cromatografia su strato sottile (TLC) su lastre in gel di silice (10 x 20 cm), eluite in etere di petrolio/etere etilico (9:1 e 6:4 v/v) e $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (6.5:2.5:0.4 v/v/v) e rivelate mediante reagenti specifici quali:

- reattivo di Dittmer e Lester per i fosfolipidi (Dittmer e Lester 1964);
- α -naftolo per i glicolipidi (Kundu 1981);
- solfato di cerio ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) per individuare tutti i lipidi (sia polari che neutri).

8.5.5 *Analisi quantitativa e qualitativa dei lipidi totali mediante Risonanza Magnetica Nucleare ($^1\text{H-NMR}$)*

Il protocollo messo a punto utilizza un segnale elettronico di riferimento come standard esterno (metodo ERETIC, Nuzzo *et al.* 2013) e permette la valutazione del contenuto totale di lipidi, del grado di saturazione e della distribuzione di ciascuna classe sia per un lavoro di screening della produzione lipidica delle microalghe che per analisi metaboliche (Figura 8).

Gli estratti lipidici grezzi sono stati sciolti in 700 μL di $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1 (v/v) e trasferiti in tubicini NMR da 5 mm. La calibrazione è stata effettuata sul segnale dell'acqua del metanolo deuterato (segnale δ 3.34). La valutazione quantitativa è stata eseguita con il metodo ERETIC calibrato sul segnale del doppietto a δ 7.40 dello standard DHBP.

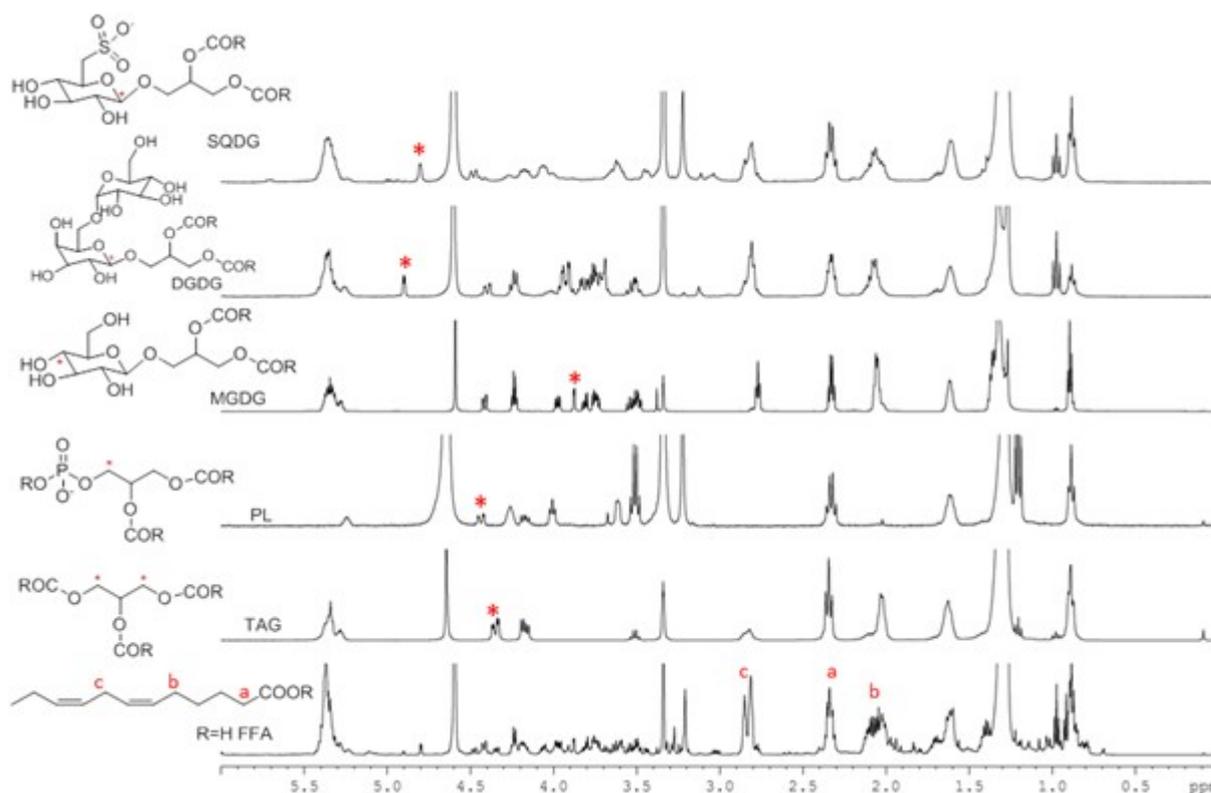


Figura 8 – Spettri $^1\text{H-NMR}$ in $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1 v/v) che mostrano l'identificazione dei segnali diagnostici delle diverse classi lipidiche degli estratti microalgali

8.5.6 Analisi qualitativa e quantitativa delle varie classi lipidiche con UHPLC/HRMS

Su 1 mg di biomassa liofila delle colture di *C. cryptica* (cresciuta come descritto nel paragrafo 8.3.8) sono state effettuate estrazioni del contenuto lipidico totale con il metodo MTBE. Un mix di cinque standard (β -SQDG (19:0/19:0) e MGDG (19:0/19:0) di sintesi; PG (17:0/17:0), PC (17:0/17:0) e TAG (17:0/17:0/17:0) commerciali) è stato usato per l'analisi quantitativa. Successivamente è stata effettuata l'analisi di Cromatografia Liquida ad Ultra Alta Prestazione/Spettrometria di Massa ad Alta Risoluzione (UHPLC/HRMS) sugli estratti così ottenuti. La separazione cromatografica è stata effettuata su un sistema UHPLC Infinity 1290 (Agilent Technologies) dotato di colonna Kinetex Biphenyl 2.6 μm , 150 x 2.1 mm (Phenomenex) a 28°C. L'eluente A utilizzato è l'acqua, mentre l'eluente B è il metanolo e il programma di eluizione è un gradiente che va dal 40% all'80% di B in 2 minuti, poi al 100% di B in 13 minuti, mantenendosi poi in isocratica per 7 minuti. Il flusso è di 0.3 mL min^{-1} , mentre il volume di

iniezione è di 10 μL e l'autocampionatore ha una temperatura di 10°C. Un passaggio di riequilibrio di 5 minuti è stato incluso prima di ogni analisi.

Le scansioni di MS sono state acquisite nel range 200 - 1800 con una risoluzione di massa di 70000. Per le analisi ddMS2 è stato utilizzato il metodo Top10. I dieci picchi più intensi sono stati selezionati per la frammentazione con un'energia normalizzata di 25-28-35 e del 20% - 40% nella modalità di ionizzazione in positiva e negativa, rispettivamente.

Ogni corsa è stata effettuata in triplicato. Per l'identificazione e la quantificazione delle varie specie lipidiche i dati LC/MS/MS per ogni campione sono stati processati con i software Xcalibur 3.0.63 e LipidSearch 4.1.16 (Thermo Scientific). I dati quantitativi assoluti sono riportati come mg lipidi g^{-1} di biomassa liofila (media \pm DS) (Cutignano *et al.*, sottomesso).

8.5.7 Hierarchical Cluster Analysis dei dati qualitativi e quantitativi ottenuti con UHPLC/HRMS

La Cluster Analysis è una tecnica di analisi multivariata attraverso la quale è possibile raggruppare le unità statistiche (specie lipidiche), in modo da minimizzare la “lontananza logica” interna a ciascun gruppo e di massimizzare quella tra i gruppi. La “lontananza logica” viene quantificata definendo opportune metriche come misure di similarità/dissimilarità definite tra le unità statistiche. Si parte dalla matrice dei dati X di dimensione $n \times p$ e la si trasforma in una matrice $n \times n$ di dissimilarità o di distanze tra le n coppie di osservazioni (vettori di p elementi, ovvero i \log_2 fold change degli incrementi lipidici calcolati a differenti condizioni di crescita). Nel nostro caso è stata scelta la distanza euclidea $d(i,h) = (\sum_j (x_{ij} - x_{hj})^2)^{1/2}$ per ogni coppia di unità statistiche i e h per ogni j -ma variabile. Il metodo di classificazione utilizzato è del tipo gerarchico aggregativo: l'algoritmo realizza fusioni successive di dati aggregando quelli con distanza minore in un unico cluster e via via procedendo aggiungendo unità allo stesso cluster o creando nuovi cluster. Nel nostro caso, il criterio che definisce le regole su come raggruppare le unità in sottogruppi è il metodo del centroide: per ogni gruppo si calcola il baricentro (un elemento che come modalità delle diverse variabili, presenta le modalità medie del gruppo). La distanza tra un'unità e un gruppo o tra due

gruppi viene calcolata come distanza tra i baricentri. Ad ogni step l'analisi ricalcola la matrice delle distanze partendo non dalle distanze precedenti, ma dai baricentri di ciascun cluster.

Lo scopo finale è quello di identificare un minor numero di gruppi tali che gli elementi appartenenti ad un gruppo siano più simili tra loro che non agli elementi appartenenti ad altri gruppi. Il dendrogramma è la rappresentazione grafica che visualizza secondo ordinate crescenti il livello di aggregazione delle unità o cluster. La heatmap rappresenta i valori dei \log_2 fold change su scale di colore di tutte le specie lipidiche misurate in funzione delle diverse condizioni di crescita. La significatività ($*p < 0.05$ e $**p < 0.001$) per ogni valore è stata calcolata effettuando un t test su ciascun misura ottenuta nelle diverse condizioni di crescita con i relativi controlli.

8.5.8 Marcatura delle gocce lipidiche con il reattivo fluorescente BODIPY

Le cellule sono state colorate con il colorante fluorescente 1,3,5,7-tetrametil-8-fenil-4,4-difluoroboradiazaindacene (BODIPY 493/503) (Traller e Hildebrand 2013).

Da un'aliquota (1 mL) di coltura, centrifugata a 3750 rpm per 10 min a 4°C (Allegra X12R, Beckman Coulter), è stato allontanato il surnatante e le cellule così ottenute sono state risospese in 500 μL di acqua di mare e trasferite in eppendorf. E' stato poi aggiunto 1.3 μL del reattivo BODIPY (1 mg mL⁻¹ in DMSO) e il campione è stato incubato al buio in ghiaccio per almeno 10 min. E' stato scelto il BODIPY perchè è più fotostabile del Nile Red e lo spettro di emissione nel verde permette di visualizzare anche l'autofluorescenza della clorofilla, senza sovrapporsi. Le cellule colorate con BODIPY sono state osservate con un microscopio Zeiss Axio, con obiettivo 100x, sistema a fluorescenza FluoArc e fotografate tramite macchina fotografica Zeiss AxioCam MRc5.

8.5.9 Analisi elementare (CHNS) e del Carbonio Organico Totale (TOC) della biomassa

Per la determinazione delle percentuali di C, H, N e S presenti nella biomassa, aliquote (circa 5 mg) di pellet microalgale liofilizzato (MicroModulyo, Thermo Fisher Scientific) sono state pesate

all'interno di capsule di stagno; le capsule sono di argento nel caso dei campioni provenienti da crescite con CO_2 al 10% per il rilevamento del carbonio organico totale (TOC).

Nelle capsule contenenti i campioni (10 mg) su cui occorre determinare il contenuto del carbonio organico totale (TOC) è stata aggiunta una quantità di acido cloridrico 35% 1:1 (w/v) con il pellet pesato. Le capsule successivamente sono state poste su piastra riscaldata (65°C) per il tempo necessario alla completa evaporazione dell'acido cloridrico (Figura 9).

In tutti i casi è stata aggiunta una piccola quantità di pentossido di vanadio per migliorare la combustione dello zolfo.

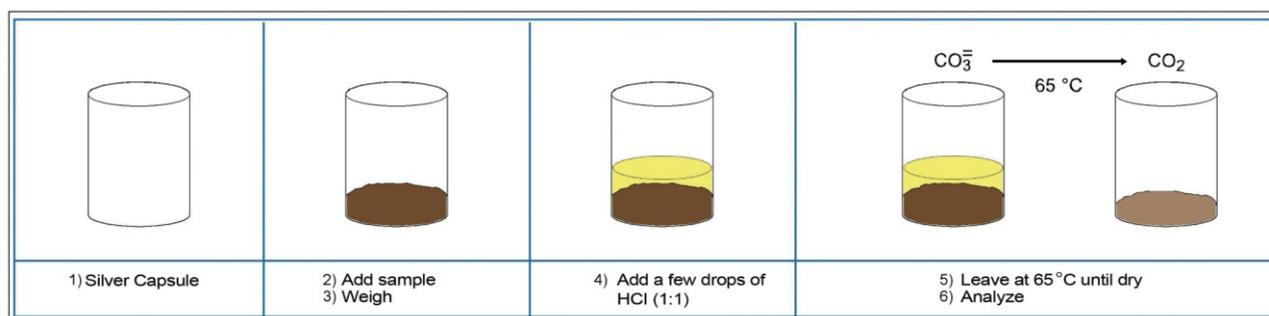


Figura 9 – Metodica di preparazione dei campioni per la determinazione del carbonio organico totale

Le capsule, richiuse manualmente, sono state caricate nell'autocampionatore dello strumento FLASH 2000 Analyzer (Thermo Fisher Scientific) (Figura 10) per l'analisi elementare eseguita con secondo il metodo:

- temperatura forno CHNS: 950°C ;
- temperatura forno: 65°C ;
- flusso del carrier: 140 mL min^{-1} di elio (grado di purezza 5.6);
- flusso di riferimento: 100 mL min^{-1} .

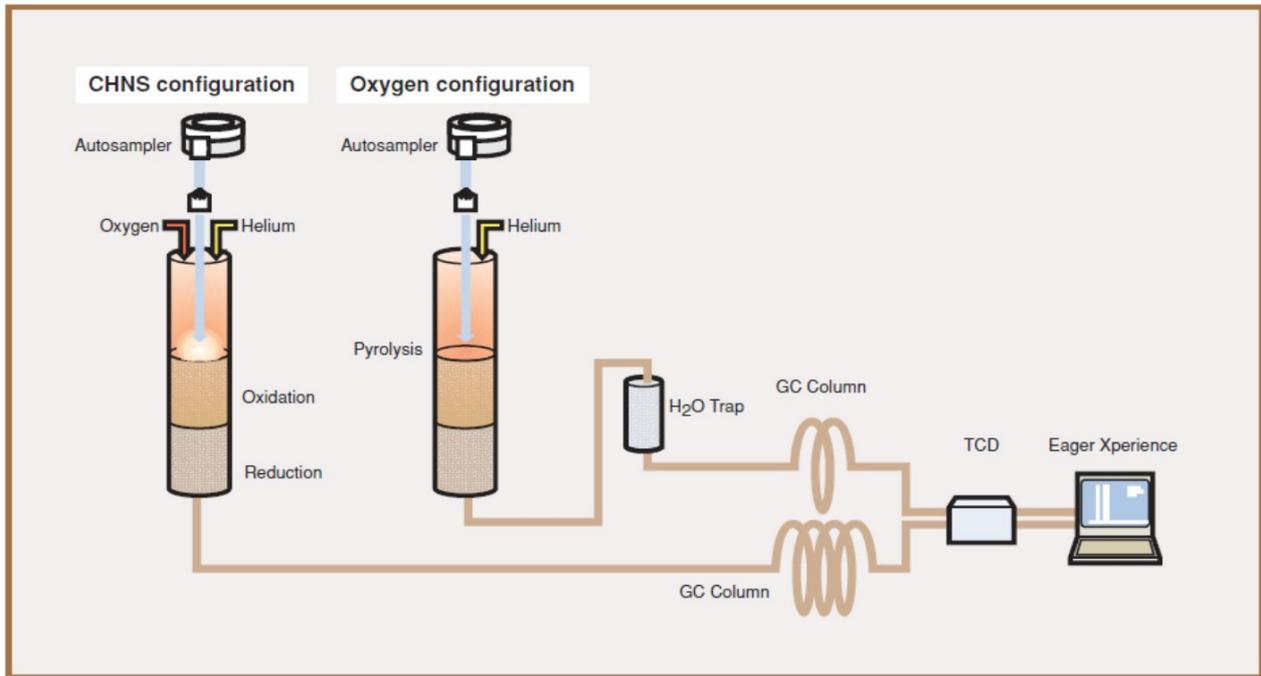


Figura 10 – Schema del principio di base per la determinazione di C, H, N e S nelle biomasse

Lo strumento è stato precedentemente calibrato con specifici standard, quali sulfanilamide, BBOT, cistina e metionina.

8.5.10 Tasso di fissazione della CO_2

Il tasso di fissazione della CO_2 ($mg\ L^{-1}\ giorno^{-1}$) (P_{CO_2}) è un parametro determinato con la seguente equazione (Singh *et al.* 2015):

$$\text{Tasso di fissazione della } CO_2 = P \times C \times (M_{CO_2}/M_C)$$

dove:

- P è la produttività della biomassa espressa in $mg\ L^{-1}\ giorno^{-1}$;
- C è il contenuto in carbonio nella biomassa (espresso in $g\ g^{-1}$) e ricavato dall'analisi elementare;
- M_{CO_2} è la massa molecolare della CO_2 ;
- M_C è la massa molecolare del C.

8.6 DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEI MACRONUTRIENTI INORGANICI (SILICATI, NITRATI E FOSFATI)

8.6.1 Determinazione quantitativa dei silicati

Il contenuto dei silicati nel surnatante, filtrato con filtro 0.22 μm , è stato quantificato tramite saggio spettrofotometrico utilizzando come standard una retta di taratura preparata con quantità note di Na_2SiO_3 (soluzione madre 105 μM) (Strickland e Parsons 1972).

In provette di plastica in polietilene sono aggiunti 1000 μL di ammonio molibdato e poi una quantità totale tra campione e acqua distillata e filtrata 0.22 μm pari a 2500 μL . Dopo aver agitato le provette e atteso 10 minuti vengono aggiunti 1500 μL di agente riducente. Infine i campioni vengono nuovamente agitati e conservati al buio per due ore. Trascorso tale periodo si effettua la lettura spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 810 nm (Jasco V-650) contro un bianco contenente tutti i reattivi sopra elencati ad eccezione del campione.

Preparazione dei componenti dell'Agente Riducente:

- soluzione di ammonio molibdato: sciogliere 4 g di paramolibdato di ammonio tetraidrato in 300 mL di acqua distillata e filtrata 0.22 μm . Aggiungere 12 mL di HCl concentrato e agitare delicatamente la soluzione; infine portare a volume finale di 500 mL. La soluzione è stabile diversi mesi e va conservata a 4°C in bottiglia di plastica in polietilene e ripreparata se si forma un precipitato bianco;
- soluzione di metol-solfito: sciogliere 6 g di solfito anidro di sodio in 500 mL di acqua distillata e filtrata 0.22 μm ; aggiungere poi 10 g di metolo. Quando questo si è completamente sciolto, filtrare la soluzione su carta da filtro da 0.22 μm e successivamente conservarla all'interno di una bottiglia di vetro. La soluzione va ripreparata ogni mese e deve mantenersi limpida e incolore;

- soluzione di acido ossalico: sciogliere 50 g di acido ossalico diidrato in 500 mL di acqua distillata e filtrata 0.22 μm . La soluzione va conservata a 4°C all'interno di una bottiglia di vetro e i cristalli che si formano vanno risospesi prima di utilizzarla; la soluzione è stabile per lungo tempo;
- soluzione di acido solforico al 50% (v/v): diluire 250 mL di acido solforico concentrato in 500 mL di acqua distillata e filtrata 0.22 μm . L'operazione va effettuata in recipiente graduato in vetro immerso in ghiaccio e la soluzione va conservata all'interno di una bottiglia di vetro.

Preparazione dell'Agente Riducente:

- soluzione di metol-solfito (25 mL);
- soluzione di acido ossalico (15 mL);
- soluzione di acido solforico 50% (v/v) (15 mL);
- acqua distillata e filtrata 0.22 μm (20 mL).

L'agente riducente va preparato, miscelato, messo in ghiaccio e usato immediatamente.

8.6.2 Determinazione quantitativa dei nitrati

Il contenuto dei nitrati nel surnatante, filtrato con filtro 0.22 μm , è stato quantificato tramite saggio spettrofotometrico con resorcinolo utilizzando come standard una retta di taratura preparata con quantità note di NaNO_3 (soluzione madre 882 μM) (Zhang e Fischer 2006).

In vial o provette di vetro vengono aggiunti, tra volume di campione e acqua distillata e filtrata 0.22 μm , una quantità totale di 1000 μL . Dopo aver agitato la miscela si aggiungono 120 μL di soluzione di resorcinolo 2% (w/v). Si agita nuovamente la miscela e si aggiungono 1000 μL di acido solforico concentrato.

Si agita il tutto e si incubano le vial (o le provette) al buio per 30 minuti. Una volta trascorso questo tempo, si pongono le vial (o le provette) in ghiaccio e in ognuna si aggiungono 2120 μL di H_2O distillata e filtrata 0.22 μm . Una volta che la miscela si è raffreddata, si agita e si effettua la lettura

spettrofotometrica dei campioni ad una lunghezza d'onda di 505 nm (Jasco V-650) contro un bianco contenente tutti i reattivi sopra elencati ad eccezione del campione.

8.6.3 Determinazione quantitativa dei fosfati

Il contenuto dei fosfati nel surnatante, filtrato con filtro 0.22 μm , è stato quantificato mediante saggio spettrofotometrico utilizzando come standard una retta di taratura preparata con quantità note di NaH_2PO_4 (soluzione madre 100 μM) (Elardo 1997).

In provette di plastica in polietilene vengono aggiunti, tra volume di campione e acqua distillata e filtrata 0.22 μm , una quantità totale di 1000 μL . Poi vengono aggiunti 100 μL di mix di reagenti, si agita l'intera miscela e si incuba tutto al buio per 30 minuti. Trascorso il tempo necessario si effettua la lettura spettrofotometrica dei campioni ad una lunghezza d'onda di 885 nm (Jasco V-650) contro un bianco contenente tutti i reattivi sopra elencati ad eccezione del campione.

Preparazione dei componenti del mix di reagenti:

- soluzione di ammonio molibdato: sciogliere 15 g di paramolibdato di ammonio tetraidrato in 500 mL di acqua distillata e filtrata 0.22 μm . La soluzione è stabile per tre mesi e va conservata in bottiglia di plastica a 4°C lontano dalla luce diretta. La soluzione va ripreparata se si forma un precipitato;
- soluzione di acido ascorbico: sciogliere 27 g di acido ascorbico in 500 mL di acqua distillata e filtrata 0.22 μm . La soluzione va conservata a -20°C in falcon di plastica e scongelata al momento dell'utilizzo;
- soluzione di potassio antimonil-tartrato: sciogliere 0.68 g di potassio antimonil-tartrato in 500 mL di acqua distillata e filtrata 0.22 μm . La soluzione è stabile per tre mesi.

Preparazione del mix di reagenti:

- acido ascorbico (1000 μL);

- potassio antimonil-tartrato (500 μ L);
- acido solforico concentrato (400 μ L);
- ammonio molibdato (1000 μ L).

Il mix di reagenti va preparato in vial di vetro rivestita da carta alluminio, miscelato e usato immediatamente.

8.7 ANALISI BIOMOLECOLARI

8.7.1 Assemblaggio de novo del trascrittoma e successiva analisi differenziale dei trascritti

L'estrazione dell'RNA, tutti i processi di sequenziamento e analisi del trascrittoma di biomasse di *C. cryptica* cresciute come descritto nel paragrafo 8.3.8 e l'analisi bioinformatica degli stessi sono stati effettuati presso i laboratori della Genomix4Life S.r.l., Servizi di Genomica e Bioinformatica Spin-Off dell'Università degli Studi di Salerno c/o Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica (Baronissi, Salerno).

La condizione RCN (Aria) è stata definita A e usata come controllo per la valutazione dei trascritti differenzialmente up- o down-regolati nella condizione RCN CO₂ (CO₂, definita B). Quest'ultima è stata a sua volta usata come controllo per i campioni -Si e -N, definiti rispettivamente C e D.

Utilizzando i Transcript ID e il database Uniprot è stato possibile ricavare i nomi e la funzione delle proteine conosciute, se note per omologia con altri organismi.

Per assegnare le proteine note agli specifici pathway è stato usato il database KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) e i pathway di *Thalassiosira pseudonana* come riferimento, in modo da annotare le proteine up-regolate o down-regolate.

BIBLIOGRAFIA

Allen AE, Dupont CL, Oborník M, Horák A, Nunes-Nesi A, McCrow JP, Zheng H, Johnson DA, Hu H, Fernie AR, Bowler C. Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature* 2011,473:203–207

Al-Widyan MI, Al-Shyoukh AO. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. *Bioresource Technology* 2002,85:253-256

Anderson LA. On the hydrogen and oxygen content of marine phytoplankton. *Deep Sea Research Part I* 1995,42:1675-1680

Antolín G, Tinaut FV, Briceño Y, Castaño V, Pérez C, Ramírez AI. Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresource Technology* 2002,83:111-114

Appeltans W. *et al.* The magnitude of global marine species diversity. *Current Biology* 2012,22:2189–2202

Arbib Z, Ruiz J, Álvarez-Díaz P, Garrido-Pérez C, Barragan J, Perales JA. Effect of pH control by means of flue gas addition on three different photo-bioreactors treating urban wastewater in long-term operation. *Ecological Engineering* 2013,57:226–235

Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter C, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov VV,

Kröger N, Lau WWY, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, Medina M, Montsant A, Obornik M, Schnitzler Parker M, Palenik B, Pazour GJ, Richardson PM, Rynearson TA, Saito MA, Schwartz DC, Thamatrakoln K, Valentin K, Vardi A, Wilkerson FP, Rokhsar DS. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 2004,306:79-86

Armbrust EV. The life of diatoms in the world's oceans. *Nature* 2009,459:185-192

Avancini M, Cicero AM, Di Girolamo I, Innamorati M, Magaletti E, Sertorio Zunini T. Guida al riconoscimento del plancton dei mari italiani – Volume I Fitoplancton. Ministero dell'Ambiente della Tutela del Territorio e del Mare 2006

Bailleul B., Berne N., Murik O., Petroutsos D., Prihoda J., Tanaka A., Villanova V., Bligny R., Flori S., Falconet D., Krieger-Liszkay A., Santabarbara S., Rappaport F., Joliot P., Tirichine L., Falkowski PG., Cardol P., Bowler C., Finazzi G. Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO₂ assimilation in diatoms. *Nature* 2015,524:366-369

Barrow C, Shahidi F. Marine nutraceuticals and functional foods. CRC Press 2007

Bates PD, Browse J. The significance of different diacylglycerol synthesis pathways on plant oil composition and bioengineering. *Frontiers in Plant Science* 2012,3:147

Benning C, Garavito RM, Shimojima M. Sulfolipid biosynthesis and function in plants. Capitolo 10, Sulfur Metabolism in Phototrophic Organisms 2008,185–200

Bernard O. Hurdles and challenges for modeling and control of microalgae for CO₂ mitigation and biofuel production. *Journal of Process Control* 2011,21:1378-1389

- Blanco AM, Moreno J, Del Campo JA, Rivas J, Guerrero MG. Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2007,73:1259–1266
- Bouaid A, Martinez M, Aracil J. Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. *Fuel* 2007,86:2596-2602
- Boussiba S, Vonshak A, Cohen Z, Avissar Y, Richmond A. Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass* 1987,12:37-47
- Bowler C, Vardi A, Allen AE. Oceanographic and biogeochemical insights from diatom genomes. *Annual Review of Marine Science* 2010,2:333–365
- Brown MR, Dunstan GA, Norwood SJ, Miller KA. Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology* 1996,32:64-73
- Bunyakiat K, Makmee S, Sawangkeaw R, Ngamprasertsith S. Continuous production of biodiesel via transesterification from vegetable oils in supercritical methanol. *Energy Fuels* 2006,20:812-817
- Burrows EH, Bennette NB, Carrieri D, Dixon JL, Brinker A, Frada M, Baldassano SN, Falkowski PG, Dismukes GC. Dynamics of lipid biosynthesis and redistribution in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* under nitrate deprivation. *BioEnergy Research* 2012,5:876–885
- Cabrini M, Bernardi Aubry F, Guardiani B. Phytoplankton – Le diatomee/Diatoms. *Biologia Marina Mediterranea* 2010,17:686-753

Camacho-Rodríguez J, González-Céspedes AM, Cerón-García MC, Fernández-Sevilla JM, Ación-Fernández FG, Molina-Grima E. A quantitative study of eicosapentaenoic acid (EPA) production by *Nannochloropsis gaditana* for aquaculture as a function of dilution rate, temperature and average irradiance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2014,98:2429–2440

Carvalho AP, Meireles LA, Malcata FX. Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress* 2006,22:1490:1506

Chauton MS, Olsen Y, Vadstein O. Biomass production from the microalga *Phaeodactylum tricorutum*: nutrient stress and chemical composition in exponential fed-batch cultures. *Biomass and Bioenergy* 2013;58:87–94

Chen P, Min M, Chen Y, Wang L, Li Y, Chen Q, Wang C, Wan Y, Wang X, Cheng Y, Deng S, Hennessy K, Lin X, Liu Y, Wang Y, Martinez B, Ruan R. Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* 2009,2:1-30

Cheng-Wu Z, Zmora O, Kopel R, Richmond A. An industrial-size flat plate glass reactor for mass production of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). *Aquaculture* 2001,195:35–49

Chini Zittelli G, Lavista F, Bastianini A, Rodolfi L, Vincenzini M, Tredici MR. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. *Journal of Biotechnology* 1999,70:299–312

Chini Zittelli G, Pastorelli R, Tredici MR. A modular flat panel photobioreactor (MFPP) for indoor mass cultivation of *Nannochloropsis* sp. under artificial illumination. *Journal of Applied Phycology* 2000,12:521–526

Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 2007,25:294-306

Climate Change 2014: Synthesis report. The intergovernmental panel on climate change 2014

Coleman RA, Lee DP. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in Lipid Research* 2004,43:134–176

Cutignano A, Luongo E, Nuzzo G, Pagano D, Manzo E, Sardo A, Fontana A. Profiling of complex lipids in marine microalgae by UHPLC/Tandem Mass Spectrometry. *Sottomesso*

d'Ippolito G, Cutignano A, Briante R, Febbraio F, Cimino G, Fontana A. New C16 fatty-acid-based oxylipin pathway in the marine diatom *Thalassiosira rotula*. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2005,3:4065-4070

d'Ippolito G, Sardo A, Paris D, Vella FM, Adelfi MG, Botte P, Gallo C, Fontana A. Potential of lipid metabolism in marine diatoms for biofuel production. *Biotechnology for Biofuels* 2015,8:28-37

de Castro Araújo S., Tavano García VM. Growth and biochemical composition so the diatom *Chaetoceros cf wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. Proteins, carbohydrates and lipids. *Aquaculture* 2005,246:405-412

de Jesús Paniagua-Michel J, Olmos-Soto J, Morales-Guerrero E. Microalgal biotechnology: Biofuels and Bioproducts. Springer Handbook of Marine Biotechnology 2015,62:1355-1370

de Vree JH, Bosma R, Janssen M, Barbosa MJ, Wijffels RH. Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors. Biotechnology for Biofuels 2015,8:215-226

Dipasquale L, d'Ippolito G, Gallo G, Vella FM, Gambacorta A, Picariello G, Fontana A. Hydrogen production by the thermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* from storage polysaccharides of the CO₂-fixing diatom *Thalassiosira weissflogii*. International Journal of Hydrogen Energy 2012,37:12250-12257

Dittmer JC, Lester RL. A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. The Journal of Lipid Research 1964,5:126-127

Douskova I, Doucha J, Livansky K, Machat J, Novak P, Umysova D, Zachleder V, Vitova M. Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. Applied Microbiology and Biotechnology 2009,82:179-185

DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 1956,28:350-356

Elardo K. The determination of phosphorus in sea water. Capitolo 11, BATS Methods 1997

Energy needs, choices and possibilities. Scenarios to 2050. Shell International 2001

Falkowski PG, Stone DP. Nitrate uptake in marine phytoplankton: energy sources and the interaction with carbon fixation. *Marine Biology* 1975,32:77-84

Falkowski PG, Katz ME, Milligan AJ, Fennel K, Cramer BS, Aubry MP, Berner RA, Novacek MJ, Zapol WM. The rise of oxygen over the past 205 million years and the evolution of large placental mammals. *Science* 2005,309:2202–2204

Falkowski PG, Fenchel T, Delong EF. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science* 2008,320:1034–1039

Fields MW, Hise A, Lohman EJ, Bell T, Gardner RD, Corredor L, Moll K, Peyton BM, Characklis GW, Gerlach R. Sources and resources: importance of nutrients, resource allocation, and ecology in microalgal cultivation for lipid accumulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2014,98:4805-4816

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 1957,226:497-509

Fontana A, d'Ippolito G, Cutignano A, Miralto A, Ianora A, Romano G, Cimino G. Chemistry of oxylipin pathways in marine diatoms. *Pure and Applied Chemistry* 2007,79:481-490

Fu W, Wichuk K, Brynjólfsson S. Developing diatoms for value-added products: challenges and opportunities. *New Biotechnology* 2015,32:547-551

Gardner RD, Cooksey KE, Mus F, Macur R, Moll K, Eustance E, Carlson RP, Gerlach R, Fields MW, Peyton BM. Use of sodium bicarbonate to stimulate triacylglycerol accumulation in the

chlorophyte *Scenedesmus* sp. and the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Journal of Applied Phycology 2012,24:1311-1320

Gong Y, Zhang J, Guo X, Wan X, Liang Z, Hu CJ, Jiang M. Identification and characterization of PtDGAT2B, an acyltransferase of the DGAT2 acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransferase family in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. FEBS Letters 2013,587:481–487

Goold H, Beisson F, Peltier G, Li-Beisson Y. Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. Plant Cell Reports 2015,34:545-555

Granum E, Myklestad SM. A simple combined method for determination of β -1,3-glucan and cell wall polysaccharides in diatoms. Hydrobiologia 2002,477:155–161

Griffiths MJ, Harrison STL. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. Journal of Applied Phycology 2009,21:493–507

Guihéneuf F, Leu S, Zarka A, Khozin-Goldberg I, Khalilov I, Boussiba S. Cloning and molecular characterization of a novel acyl-CoA:Diacylglycerol acyltransferase 1-like gene (PtDGAT1) from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. FEBS Journal 2011,278:3651–3666

Guillard RRL, Ryther JH. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. Canadian Journal of Microbiology 1962,8:229-239

Guiry MD. How many species of algae are there? Journal of Phycology 2012,48:1057–1063

Hasle GR, Lange CB. Freshwater and brackish water *Thalassiosira* (Bacillariophyceae): taxa with

tangentially undulated valves. *Phycologia* 1989,28:120-135

Helbling EW, Villafañe VE. UV radiation effects on phytoplankton primary production: a comparison between arctic and antarctic marine ecosystems. *UV Radiation and Arctic Ecosystems* 2002,153:203-226

Hendey NI. Electron microscope studies and classification of diatoms. *The Micropalaeontology of Oceans*, Cambridge University Press 1971,625-631

Hennon GMM, Quay P, Morales RL, Swanson LM, Armbrust EV. Acclimation conditions modify physiological response of the diatom *Thalassiosira pseudonana* to elevated CO₂ concentrations in a nitrate-limited chemostat. *Journal of Phycology* 2014,50:243–253

Hildebrand M, Davis AK, Smith SR, Traller JC, Abbriano R. The place of diatoms in the biofuels industry. *Biofuels* 2012,3:221-240

Hockin NL, Mock T, Mulholland F, Kopriva S, Malin G. The response of diatom central carbon metabolism to nitrogen starvation is different from that of green algae and higher plants. *Plant Physiology* 2012,158:299-312

Hopkinson BM, Dupont CL, Allen AE, Morel FFM. Efficiency of the CO₂-concentrating mechanism of diatoms. *PNAS* 2011,108:3830-3837

Hu Q. Environmental effects on cell composition. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* 2004,83-93

Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 2008,54:621-639

Huntley ME, Johnson ZI, Brown SL, Sills DL, Gerber L, Archibald I, Machesky SC, Granados J, Beal C, Greene CH. Demonstrated large-scale production of marine microalgae for fuels and feed. *Algal Research* 2015,10:249–265

Ishida Y, Hiragushi N, Kitaguchi H, Mitsutani A, Nagai S, Yoshimura M. A highly CO₂-tolerant diatom, *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. *Fisheries Science* 2000,66:655-659

Jeffryes C, Rosenberger J, Rorrer GL. Fed-batch cultivation and bioprocess modeling of *Cyclotella* sp. for enhanced fatty acid production by controlled silicon limitation. *Algal Research* 2013,2:16–27

Jeon H, Lee Y, Chang KS, Lee CG, Jin ES. Enhanced production of biomass and lipids by supplying CO₂ in marine microalga *Dunaliella* sp. *Journal of Microbiology* 2013,51:773-776

Knothe G. “Designer” biodiesel: Optimizing fatty ester composition to improve fuel properties. *Energy Fuels* 2008,22:1358–1364

Kumar K, Banerjee D, Das D. Carbon dioxide sequestration from industrial flue gas by *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology* 2014,152:225-233

Kundu SK. DEAE-silica gel and DEAE-controlled porous glass as ion exchangers for the isolation of glycolipids. *Methods in Enzymology* 1981,72:174-185

Lane TW, Morel FMM. Regulation of carbonic anhydrase expression by zinc, cobalt, and carbon dioxide in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Plant Physiology* 2000,123:345-352

Lee DY, Park JJ, Barupal DK, Fiehn O. System response of metabolic networks in *Chlamydomonas reinhardtii* to total available ammonium. *Molecular & Cellular Proteomics* 2012,11:973–988

Levitan O, Dinamarca J, Hochman G, Falkowski PG. Diatoms: a fossil fuel of the future. *Trends in Biotechnology* 2014,32:117-124

Levitan O, Dinamarca J, Zelzion E, Lun DS, Guerra LT, Kim MK, Kim J, Van Mooy BAS, Bhattacharya D, Falkowski PG. Remodeling of intermediate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* under nitrogen stress. *PNAS* 2015,112:412-417

Lewin JC, Guillard RRL. Diatoms. *Annual Review of Microbiology* 1963,17:373-414

Liang Y, Osada K, Sunaga Y, Yoshino T, Bowler C, Tanaka T. Dynamic oil body generation in the marine oleaginous diatom *Fistulifera solaris* in response to nutrient limitation as revealed by morphological and lipidomic analysis. *Algal Research* 2015,12:359-367

Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, DeBono A, Durrett TP, Franke RB, Graham IA, Katayama K, Kelly AA, Larson T, Markham JE, Miquel M, Molina I, Nishida I, Rowland O, Samuels L, Schmid KM, Wada H, Welti R, Xu C, Zallot R, Ohlrogge J. Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book* 2010,8:e0133

Liu B, Benning C. Lipid metabolism in microalgae distinguishes itself. *Current Opinion in Biotechnology* 2013,24:300–309

Lower SK. Carbonate equilibria in natural waters. *Environmental Chemistry* 1999

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 1951,193:265–275

Mann DG, Droop SJM. Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. *Hydrobiologia* 1996,336:19-32

Mata TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010,14:217-232

Mathieu R, Bellier JP, Granier B. *Manuel de Micropaléontologie* 2011, ISBN 978-2-916733-04-3

Matsumoto H, Shioji N, Hamasaki A, Ikuta Y, Fukuda Y, Sato M, Endo N, Tsukamoto T. Carbon dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual flue gas discharged from a boiler. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1995,51-52:681-692

Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia TV, Shevchenko A, Schwudke D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research* 2008,49:1137-1146

McCallum I, Fritz S, Khabarov N, Fuss S, Szolgayova J, Rydzak F, Havlik P, Kraxner F, Obersteiner M, Aoki K, Schill C, Quinten M, Heumesser C, Bouma J, Reyers B, Schneider U,

Pignatelli F, Pavanello L, Borzacchiello MT, Craglia M. Identifying and quantifying the benefits of GEOSS. earthzine.org 2010

Medlin LK, Williams DM, Sims PA. The evolution of the diatoms (Bacillariophyta). I. Origin of the group and assessment of the monophyly of its major divisions. *European Journal of Phycology* 1993,28:261-275

Merchant SS, Kropat J, Liu B, Shaw J, Warakanont J. TAG, You're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. *Current Opinion in Biotechnology* 2012,23:352-363

Mohan SV, Rohit MV, Chiranjeevi P, Chandra R, Navaneeth B. Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. *Bioresource Technology* 2015,184:169-178

Molina Grima E, Belarbi EH, Ación Fernández FG, Robles Medina A, Chisti Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* 2003,20:491–515

Moll KM, Gardner RD, Eustance EO, Gerlach R, Peyton BM. Combining multiple nutrient stresses and bicarbonate addition to promote lipid accumulation in the diatom RGd-1. *Algal Research* 2014,5:7-15

Morel FMM, Cox EH, Kraepiel AML, Lane TW, Milligan AJ, Schaperdoth I, Reinfelder JR, Tortell PD. Acquisition of inorganic carbon by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Functional Plant Biology* 2002,29:301-308

Mortensen SH, Børsheim KY, Rainuzzo JR, Knutsen G. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 1988,122:173-185

Mus F, Toussaint JP, Cooksey KE, Fields MW, Gerlach R, Peyton BM, Carlson RP. Physiological and molecular analysis of carbon source supplementation and pH stress-induced lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013,97:3625-3642

Nagase H, Yoshihara KI, Eguchi K, Okamoto Y, Murasaki S, Yamashita R, Hirata K, Miyamoto K. Uptake pathway and continuous removal of nitric oxide from flue gas using microalgae. *Biochemical Engineering Journal* 2001,7:241-246

Napoléon C, Raimbault V, Claquin P. Influence of nutrient stress on the relationships between PAM measurements and carbon incorporation in four phytoplankton species. *PLoS ONE* 2013,8:e66423

Nascimento IA, Marques SSI, Cabanelas ITD, Pereira SA, Druzian JI, Oliveira de Souza C, Vich DV, Correia de Carvalho G, Nascimento MA. Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *BioEnergy Research* 2013,6:1-13

Negoro M, Hamasaki A, Ikuta Y, Makita T, Hirayama K, Suzuki S. Carbon dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual flue gas discharged from a boiler. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1993,39-40:643-653

Nelson DL, Cox MM. I principi di biochimica di Lehninger. Zanichelli 2014

Niu YF, Zhang MH, Li DW, Yang WD, Liu JS, Bai WB, Li HY. Improvement of neutral lipid and polyunsaturated fatty acid biosynthesis by overexpressing a type 2 diacylglycerol acyltransferase in marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Drugs* 2013,11:4558-4569

Nuzzo G, Gallo C, d'Ippolito G, Cutignano A, Sardo A, Fontana A. Composition and quantification of microalgal lipids by ERETIC ¹H NMR method. *Marine Drugs* 2013,11:3742-3753

Obata T, Fernie AR, Nunes-Nesi A. The central carbon and energy metabolism of marine diatoms. *Metabolites* 2013,3:325-346

Ohlrogge J, Browse J. Lipid biosynthesis. *The Plant Cell* 1995,7:957-970

Olaizola M. Microalgal removal of CO₂ from flue gases: changes in medium pH and flue gas composition do not appear to affect the photochemical yield of microalgal cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2003,8:360-367

Pedroni PM, Lamenti G, Prosperi G, Ritorto L, Scolla G, Capuano F, Valdiserri M. 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 the 7th International Conference on Greenhouse Gas Control Technologies* 2004

Peterson CL, Reece DL, Thompson JC, Beck SM, Chase C. Ethyl ester of rapeseed used as a biodiesel fuel – a case study. *Biomass and Bioenergy* 1996,10:331-336

Petroutsos D, Amiar S, Abida H, Dolch LJ, Bastien O, Rébeillé F, Jouhet J, Falconet D, Block MA, McFadden GI, Bowler C, Botté C, Maréchal E. Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways – from cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Progress in Lipid Research* 2014,54:68–85

Picardo MC, de Medeiros JL, Araújo OF, Moreira Chaloub R. Effects of CO₂ enrichment and nutrients supply intermittency on batch cultures of *Isochrysis galbana*. *Bioresource Technology* 2013,143:242-250

Prasad AKSK, Nienow JA, Livingston RJ. The genus *Cyclotella* (Bacillariophyta) in Choctawhatchee Bay, Florida, with special reference to *C. striata* and *C. choctawhatcheeana* sp. nov.. *Phycologia* 1990,29:418-436

Pulz O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001,57:287-293

Quinn JC, Yates T, Douglas N, Weyer K, Butler J, Bradley TH, Lammers PJ. *Nannochloropsis* production metrics in a scalable outdoor photobioreactor for commercial applications. *Bioresource Technology* 2012,117:164–171

Razeghifard R. Algal biofuels. *Photosynthesis Research* 2013,117:207-219

Redfield AC, Ketchum BH, Richards FA. The influence of organisms on the composition of seawater. In “The Sea” 1963,2:26-77

Renaud SM, Thinh LV, Lambrinidis G, Parry DL. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 2002,211:195-214

Riedl R. Fauna e flora del Mediterraneo. Franco Muzzio Editore 2010

Roberts K, Granum E, Leegood RC, Raven JA. Carbon acquisition by diatoms. *Photosynthesis Research* 2007,93:79–88

Roberts SB, Lane TW, Morel FMM. Carbonic anhydrase in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 1997,33:845–850

Rodolfi L, Chini Zittelli G, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Bonini G, Tredici MR. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 2009,102:100-112

Roessler PG. Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1988,267:521–528

Round FE, Crawford RM, Mann DG. The Diatoms: biology and morphology of the genera. Cambridge University Press 1990

Salih FM. Microalgae tolerance to high concentrations of carbon dioxide: A review. *Journal of Environmental Protection* 2011,2:648-654

San Pedro A, González-López CV, Acién FG, Molina-Grima E. Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production. *Bioresource Technology* 2013,134:353–361

San Pedro A, González-López CV, Acién FG, Molina-Grima E. Outdoor pilot-scale production of *Nannochloropsis gaditana*: Influence of culture parameters and lipid production rates in tubular photobioreactors. *Bioresource Technology* 2014,169:667–676

San Pedro A, González-López CV, Acién FG, Molina-Grima E. Outdoor pilot production of *Nannochloropsis gaditana*: Influence of culture parameters and lipid production rates in raceway ponds. *Algal Research* 2015,8:205–213

Scott SA, Davey MP, Dennis JS, Horst I, Howe CJ, Lea-Smith DJ, Smith AG. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology* 2010,21:277-286

Sforza E, Simionato D, Giacometti GM, Bertucco A, Morosinotto T. Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. *PLoS ONE* 2012,7:e38975

Shakhashiri BZ. Carbon Dioxide, CO₂. www.scifun.org 2008

Sheehan J, Dunahay T, Benemann J, Roessler P. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program — Biodiesel from algae. US Department of Energy 1998

Shrestha RP, Tesson B, Norden-Krichmar T, Federowicz S, Hildebrand M, Allen AE. Whole transcriptome analysis of the silicon response of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. BMC Genomics 2012,13:499

Singh D, Yadav K, Singh RS. Biofixation of carbon dioxide using mixed culture of microalgae. Indian Journal of Biotechnology 2015,14:228-232

Sito web: <http://www.algaebase.org>

Staats N, De Winder B, Stal L, Mur L. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. European Journal of Phycology 1999,34:161–169

Stonik V, Stonik I. Low-molecular-weight metabolites from diatoms: structures, biological roles and biosynthesis. Marine Drugs 2015,13:3672-3709

Streble H, Krauter D. Atlante dei microrganismi acquatici. Franco Muzzio Editore 2010

Strickland JDH, Parsons TR. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada 1972 modificato in Determination of reactive silicate in sea water. Capitolo 12, BATS Methods 1997

Sukenik A, Carmeli Y, Berner T. Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. Journal of Phycology 1989,25:686–692

Tang H, Chen M, Garcia MED, Abunasser N, Ng KYS, Salley SO. Culture of microalgae *Chlorella minutissima* for biodiesel feedstock production. *Biotechnology and Bioengineering* 2011,108:2280-2287

Traller JC, Hildebrand M. High throughput imaging to the diatom *Cyclotella cryptica* demonstrates substantial cell-to-cell variability in the rate and extent of triacylglycerol accumulation. *Algal Research* 2013;2:244–252

Tredici MR, Bassi N, Prussi M, Biondi N, Rodolfi L, Chini Zittelli G, Sampietro G. Energy balance of algal biomass production in a 1-ha “Green Wall Panel” plant: How to produce algal biomass in a closed reactor achieving a high Net Energy Ratio. *Applied Energy* 2015,154:1103-1111

Valenzuela J, Mazuerie A, Carlson RP, Gerlach R, Cooksey KE, Peyton BM, Fields MW. Potential role of multiple carbon fixation pathways during lipid accumulation in *Phaeodactylum tricoratum*. *Biotechnology for Biofuels* 2012,5:40

Valenzuela J, Carlson RP, Gerlach R, Cooksey K, Peyton BM, Bothner B, Fields MW. Nutrient resupplementation arrests bio-oil accumulation in *Phaeodactylum tricoratum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013,97:7049–7059

van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM. *Algae. An introduction to phycology*. Cambridge University Press 1995

Verma NM, Mehrotra S, Shukla A, Mishra BN. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. *African Journal of Biotechnology* 2010,9:1402-1411

Voronova EN, Konyukhov IV, Kazimirko YV, Pogosyan SI, Rubin AB. Changes in the condition of photosynthetic apparatus of a diatom alga *Thalassiosira weissflogii* during photoadaptation and photodamage. Russian Journal of Plant Physiology 2009,56:753–760

Wang LK, Hung YT, Lo HH, Yapijakis C. Handbook of industrial and hazardous wastes treatment. Marcel Dekker Inc 2004

Wang XW, Liang JR, Luo CS, Chen CP, Gao YH. Biomass, total lipid production, and fatty acid composition of the marine diatom *Chaetoceros muelleri* in response to different CO₂ levels. Bioresource Technology 2014,161:124–130

Wen Z, Johnson MB. Microalgae as a feedstock for biofuel production. Virginia Cooperative Extension 2009, publication 442-886

Werner D. The biology of diatoms. University of California Press 1977, ISBN 0520034007

Xu J, Kazachkov M, Jia Y, Zheng Z, Zou J. Expression of a type 2 diacylglycerol acyltransferase from *Thalassiosira pseudonana* in yeast leads to incorporation of docosaehaenoic acid β -oxidation intermediates into triacylglycerol. FEBS Journal 2013,280:6162-6172

Yongmanitchai W, Ward OP. Growth of and omega-3 fatty acid production by *Phaeodactylum tricornutum* under different culture conditions. Applied and Environmental Microbiology 1991,57:419-425

Yu ET, Zendejas FJ, Lane PD, Gaucher S, Simmons BA, Lane TW. Triacylglycerol accumulation and profiling in the model diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum* (Baccilariophyceae) during starvation. *Journal of Applied Phycology* 2009;21:669–681

Zeng X, Danquah MK, Chen XD, Lu Y. Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2011,15:3252-3260

Zhang JZ, Fischer CJ. A simplified resorcinol method for direct spectrophotometric determination of nitrate in seawater. *Marine Chemistry* 2006,99:220-226

Zhao B, Su Y, Zhang Y, Cui G. Carbon dioxide fixation and biomass production from combustion flue gas using energy microalgae. *Energy* 2015,89:347-357

Zou N, Richmond A. Effect of light-path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp. *Journal of Biotechnology* 1999,70:351–356