



Università
Ca'Foscari
Venezia

Corso di Laurea magistrale
in Scienze Ambientali
Tesi di Laurea

Valutazione delle cinetiche di crescita
di *Chlorella vulgaris* su impianto pilota
a luce pulsata

Relatrice

Prof.ssa Cristina Cavinato

Correlatore

Dr. Marco Biasiolo

Laureando

Luca Furlanetto
Matricola 883170

Anno Accademico

2021 / 2022

Ringraziamenti

Ringrazio innanzitutto la professoressa Cristina Cavinato per avermi permesso di svolgere quest'esperienza sperimentale.

Ringrazio Veritas e il dottor Graziano Tassinato per avermi ospitato al Green Propulsion Lab.

Ringrazio in particolare Marco Biasiolo per avermi supportato nel mio lavoro di tesi ed essermi stato vicino durante tutto il periodo.

Ringrazio Dio e tutte le persone che hanno creduto in me durante tutto il percorso accademico, specialmente la mia ragazza Anastasia, la mia musa ispiratrice.

Abstract

Le microalghe sono microorganismi unicellulari fotosintetici, in grado di utilizzare l'energia luminosa per fissare l'anidride carbonica sotto forma di sostanza organica. Negli ultimi anni il numero di lavori riguardanti il loro utilizzo in ambito biotecnologico è cresciuto notevolmente, specialmente grazie alla varietà di prodotti che ne possono essere ricavati: la biomassa - ricca in azoto e fosforo, può essere utilizzata per produrre biofertilizzanti; i lipidi estratti possono essere utilizzati per la produzione di biocarburanti di terza generazione; le proteine e i pigmenti possono essere utilizzati come additivi alimentari per l'acquacoltura e per l'allevamento; possono essere ricavati prodotti secondari ad alto valore aggiunto come carboidrati, antiossidanti, omega-3 etc. inoltre vi sono promettenti applicazioni nell'ambito del trattamento di reflui e della bio-fissazione della CO₂. Le applicazioni a piena scala della tecnologia sono ad oggi limitate alla produzione di additivi alimentari e prodotti nutraceutici ad alto valore aggiunto, mentre non vi è ancora un know-how sufficiente ad applicare il processo su scala industriale per la produzione di biofuels, per il trattamento dei reflui o per la fissazione della CO₂. Affinché il processo diventi applicabile anche per questi settori economicamente meno attraenti, è necessario ottimizzare le condizioni operative e i parametri di processo, in maniera tale da massimizzare la crescita microalgale e l'accumulo dei prodotti di interesse, minimizzando i costi di produzione. Questo lavoro ha investigato le potenzialità di *Chlorella vulgaris* su un fotobioreattore pilota da 200L illuminato internamente da 5 colonne a LED. Sono state svolte due RUN, una con fotoperiodo 12:12 e una a illuminazione pulsata, impostate in maniera tale che nell'arco della giornata la coltura fosse sottoposta alla stessa quantità di radiazione luminosa. Con l'illuminazione pulsata la biomassa microalgale massima raggiunta è risultata pari a 0,765 g·L⁻¹, il 65,4 % in più rispetto quanto ottenuto nella prova con fotoperiodo 12:12 a luce fissa 0,463 g·L⁻¹. I risultati ottenuti, molto inferiori rispetto a quanto ottenuto da letteratura su scala da laboratorio, evidenziano quanto sia complesso ottenere rese di produzione soddisfacenti in impianti pilota a volumetrie elevate. Malgrado ciò, l'utilizzo di luce LED pulsata ha permesso di ottenere cinetiche di crescita superiori, evidenziando come questa strategia di illuminazione possa essere un tassello importante nell'abbattimento dei costi di produzione e nell'avvicinare l'uso delle microalghe a settori finora non adeguatamente soddisfatti.

1. Introduzione	7
1.1 Le microalghe	8
1.1.1 Il metabolismo microalgale	8
1.2 <i>Chlorella vulgaris</i>	10
1.3 Configurazione impiantistiche.....	14
1.3.1 I sistemi aperti (open ponds).....	15
1.3.2 I sistemi chiusi (fotobioreattori).....	16
1.4 Parametri di processo.....	20
1.4.1 Nutrienti	20
1.4.2 Illuminazione	21
1.4.3 Temperatura.....	23
1.4.4 Il ruolo dei pigmenti	23
1.4.5 La clorofilla	24
2. Scopo	29
3. Materiali e metodi	30
3.1 Reattore.....	30
3.2 Ceppo microalgale e condizioni operative	31
3.3 Monitoraggio della coltura microalgale e dei parametri di crescita	33
3.3.1 Misura del pH	33
3.3.2 Conta cellulare.....	33
3.3.3 Analisi del peso secco.....	34
3.3.4 Quantificazione Clorofille a, b e Carotenoidi	35
4. Risultati e discussione	37
4.1 pH	37
4.2 Conta cellulare e peso secco	38
4.3 Clorofilla a, b e Carotenoidi.....	40
5. Conclusioni	44
6. Bibliografia	45

1. Introduzione

Le riserve petrolifere insufficienti, l'estrema dipendenza dalle risorse energetiche straniere e le attuali preoccupazioni ambientali hanno spinto gli scienziati a trovare energie alternative rispettose dell'ambiente e rinnovabili.

Le microalghe sono considerate la materia prima più probabile per sostituire il petrolio, per alti livelli di produzione di biocarburante, brevi cicli di vita e sequestro del carbonio (Ahmad et al., 2011).

Inoltre, sono studiate da decenni perché la grande varietà di prodotti metabolici possono essere ottenuti attraverso la loro coltivazione, come pigmenti, enzimi e soprattutto lipidi che possono essere convertiti in biocarburanti (Perez-Garcia et al., 2011). Tuttavia, la difficoltà di produzione commerciale di biocarburanti da microalghe risale all'alto costo del processo di coltivazione, il processo di estrazione e il processo di transesterificazione (Nadezhda et al., 2017). L'alto costo del processo di coltivazione comprende la creazione e l'utilizzo di impianti per la crescita delle microalghe in termini di biomassa.

La qualità spettrale della luce e l'intensità (quantità) della luce devono essere considerate nella scelta della sorgente luminosa per la coltivazione delle microalghe.

I LED rappresentano una tecnologia promettente per la coltivazione e presentano vantaggi tecnici rispetto alle sorgenti di illuminazione tradizionali (Mitchell et al. 2012).

Inoltre, sono la prima sorgente di luce con possibilità di controllo dello spettro di emissione, consentendo di abbinare le lunghezze d'onda ai fotorecettori delle piante per fornire una produzione più ottimale e per influenzarne la morfologia e la composizione (Morrow 2008).

L'obiettivo generale della tesi è determinare gli effetti dell'utilizzo di illuminazione a LED pulsata sulla crescita di biomassa di *Chlorella vulgaris*, una tra le microalghe con elevata capacità di accumulo di acidi grassi adatti per la produzione di biocarburante.

1.1 Le microalghe

Le microalghe sono un vasto ed eterogeneo gruppo di microorganismi fotosintetici, accomunati dalla capacità di sfruttare l'energia proveniente da una fonte luminosa per fissare la CO₂ sotto forma di zuccheri. Sono organismi eucarioti unicellulari, distribuiti in maniera ubiquitaria sia in ambiente acquatico che terrestre. Vengono spesso identificate anche con il termine di fitoplancton, e rappresentano la base della catena trofica in tutti gli ecosistemi acquatici, sia marini che di acqua dolce. Le dimensioni microscopiche e l'assenza di una strutturazione complessa (tipica, ad esempio, nelle piante superiori) rendono questi microorganismi estremamente efficienti nella conversione dell'energia solare.

Complessivamente, il processo fotosintetico (Eq 1) può essere riassunto come:



Il meccanismo attraverso il quale le microalghe compiono la fotosintesi viene comunemente schematizzato in due fasi: la *fase luminosa* e la *fase oscura*.

Durante la *fase luminosa* l'energia messa a disposizione da una fonte luminosa viene assorbita dai pigmenti fotosintetici (*clorofilla a* e *clorofilla b*) e utilizzata per generare intermedi energetici come ATP e NADPH. Durante il processo vengono scisse molecole d'acqua e viene liberato ossigeno molecolare (Luan et al., 2020).

Nella *fase oscura*, che può avvenire indifferentemente sia alla luce che al buio, gli intermedi energetici prodotti durante la fase luminosa vengono impiegati dalla cellula per ridurre dell'anidride carbonica a glucosio. L'insieme di reazioni caratteristiche di questa fase è noto come Ciclo di Calvin. Il glucosio così prodotto può essere utilizzato dalla cellula durante la respirazione cellulare, oppure può essere immagazzinato dalla cellula sotto forma di lipidi o amido.

1.1.1 Il metabolismo microalgale

Il metabolismo microalgale può essere di tre tipologie: autotrofo, eterotrofo o mixotrofo.

Con il metabolismo autotrofo le microalghe riescono a sfruttare una fonte di energia luminosa per convertire la CO₂ disciolta in acqua in carbonio organico da utilizzare per la loro crescita.

Il metabolismo eterotrofo avviene in assenza di luce, utilizzando una fonte di carbonio organico per la produzione dell'energia necessaria alla crescita della cellula. (Safi, 2014). Il metabolismo mixotrofo consiste nella produzione di biomassa tramite l'uso simultaneo sia dell'energia luminosa che della CO₂ e del carbonio organico (Clement-Larosière, 2012). Questa via metabolica risulta vantaggiosa rispetto a quella autotrofa, in quanto la disponibilità di luce (specialmente in colture molto dense e con un alto tasso di estinzione) non risulta essere un fattore limitante per la crescita microalgale. Inoltre, rispetto al metabolismo eterotrofo, la possibilità di organizzare la CO₂ garantisce un consumo inferiore di substrato a parità di biomassa prodotta (Safi, 2014). L'andamento di crescita di una coltura microalgale può essere diviso in 5 fasi (Figura 1):

- 1- **lag** – fase iniziale di adattamento fisiologico dell'inoculo alle nuove condizioni ambientali
- 2- **crescita esponenziale** – fase successiva alla fase lag, in cui l'abbondanza di nutrienti porta le cellule a crescere e moltiplicarsi in maniera esponenziale;
- 3- **lineare** – fase di rallentamento della crescita della coltura cellulare, dovuto al progressivo esaurimento dei nutrienti e ad eventuali fenomeni di auto-ombreggiamento che limitano la penetrazione della luce all'interno della coltura;
- 4- **stazionaria** – fase in cui il rallentamento della crescita è tale da portare ad un equilibrio tra il tasso di crescita e di morte delle cellule;
- 5- **morte cellulare** – fase di declino della coltura cellulare causata dal completo esaurimento dei nutrienti. L'equilibrio tra tasso di crescita e di morte della coltura si rompe, portando a una progressiva diminuzione della biomassa.

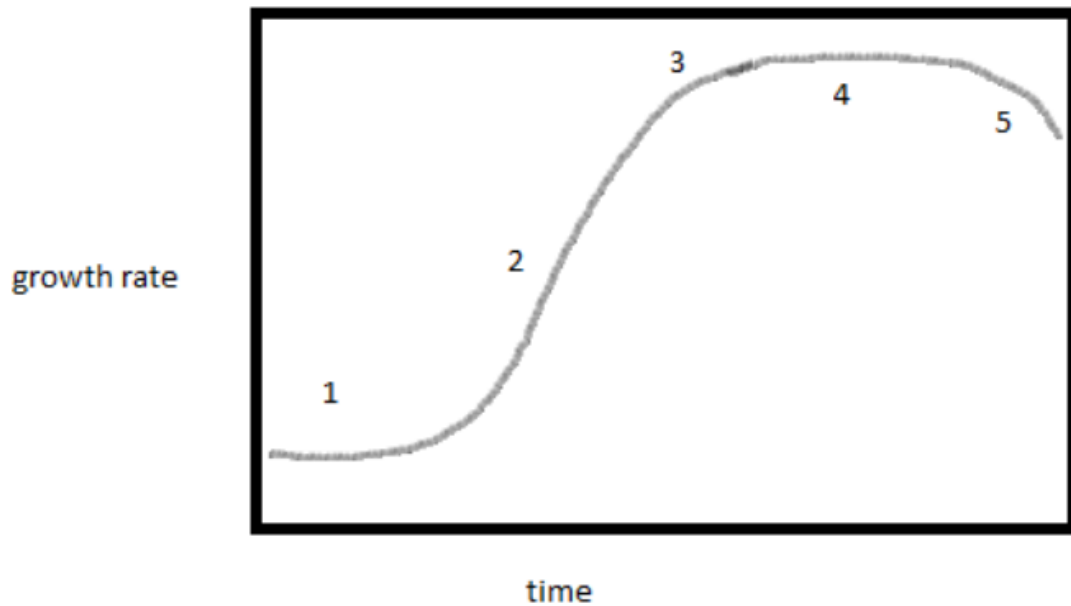


Figura 1 – Ciclo di vita microalghe (Mata et al., 2010).

1.2 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris (dominio Eukaryota, regno Protista, divisione Chlorophyta, classe Trebouxiophyceae, ordine Chlorellales, famiglia Chlorellaceae, genere *Chlorella*, specie *Chlorella vulgaris*) fu scoperta nel 1890 da Beijerinck ed è la prima specie microalgale con nucleo ben definito ad essere stata identificata.

C. vulgaris è una microalga unicellulare che cresce in acqua dolce, composta da una cellula sferica di diametro compreso da 2 a 10 μm . È caratterizzata da un elevato tasso di crescita (il tempo di raddoppio della biomassa cellulare è di circa 19 ore) (Yamamoto et al., 2005), dovuto alla rapida riproduzione asessuata delle cellule.

Per quanto riguarda i mitocondri, incaricati a svolgere i processi metabolici con i quali *C. vulgaris* ottiene energia, sono costituiti da doppie membrane, proteine e fosfolipidi.

Altra caratteristica peculiare di *C. vulgaris* è la presenza di un singolo cloroplasto ben definito, facilmente individuabile a microscopio (Figura 2).

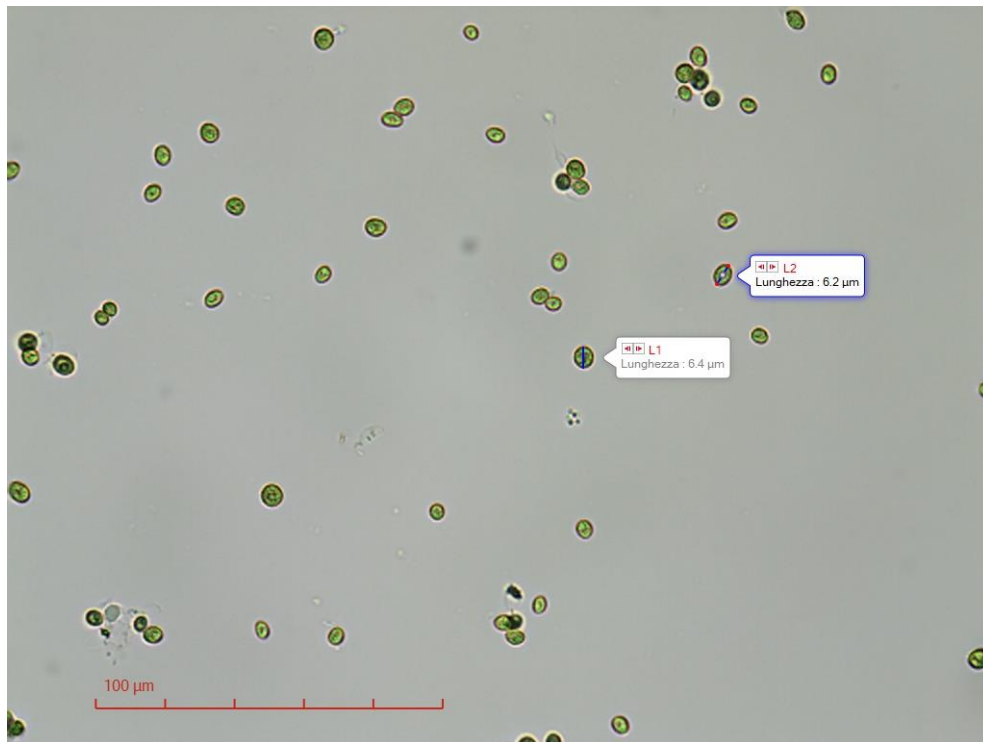


Figura 2 - Fotografia di *Chlorella vulgaris* al microscopio, ingrandimento 400X.

C. vulgaris è una microalga che nel suo mezzo di crescita ha un'organizzazione sia isolata che individuale, oltre ad essere in grado di formare colonie con un massimo di 64 cellule (Coronado-Reyes et al., 2020) (Figura 3).

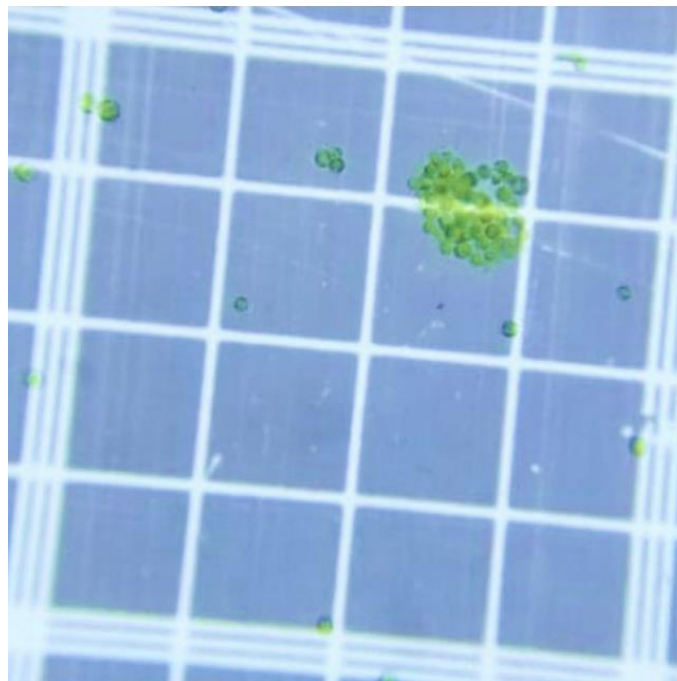


Figura 3 - Organizzazione tipo di *C. vulgaris* (Coronado-Reyes et al., 2020)

C. vulgaris in condizioni di crescita mixotrofica ha registrato una resa maggiore rispetto alle condizioni autotrofe ed eterotrofe (Moon et al., 2013). Per questo è raccomandato utilizzare questa via metabolica durante la coltivazione di *C. vulgaris* poiché sono state riportate concentrazioni di biomassa comprese tra 2 e 5 g/L al giorno di crescita (Safi, 2014).

C. vulgaris è una delle microalghe più studiate nella letteratura scientifica, grazie alle sue rapide cinetiche di crescita, all'elevato tasso di bio-fissazione della CO₂ (Ho S. et al., 2010), e alla possibilità di accumulare una grande quantità di lipidi se sottoposta a particolari condizioni di crescita, caratteristica che la rende un candidato molto promettente per la produzione di biocarburante (Ahmad et al., 2011).

I lipidi sono un gruppo eterogeneo di composti solubili in solventi non polari e relativamente insolubili in acqua (Bajguz, 2000).

In studi condotti da Safi (2014) riportano che *C. vulgaris* sotto normali condizioni di crescita riesca a raggiungere il 40% di lipidi del peso secco nella biomassa generata. In condizioni di stress con concentrazioni di azoto basse, l'accumulo di lipidi può raggiungere il 58%.

Inoltre, *C. vulgaris* è anche un'ottima produttrice di proteine e carboidrati, i quali possono raggiungere determinate concentrazioni (Lardon et al., 2009) (Tabella 1).

Tabella 1 - Composizione proteine e carboidrati di *C. vulgaris* in diverse condizioni (Lardon et al., 2009)

	Condizioni normali	Basse concentrazioni di azoto
Proteine (g·Kg ⁻¹)	282	67
Carboidrati (g·Kg ⁻¹)	495	529

Le proteine sono importanti perché molto utilizzate nell'industria agro-alimentare e farmaceutica. *C. vulgaris* risulta avere proteine con capacità migliori di quelle degli ingredienti commerciali (Ursu et al., 2014).

I carboidrati invece rappresentano un gruppo di zuccheri e polisaccaridi come l'amido, il quale abbondante in *C. vulgaris* (Ru et al., 2020).

I carboidrati sono importanti perché attraverso la saccarificazione di essi si può produrre bioetanolo (Matsumoto et al., 2003).

C. vulgaris può potenzialmente produrre clorofilla raggiungendo il 2% del peso secco della biomassa generata (Safi, 2014). Inoltre, contiene grosse quantità di carotenoidi, i quali insieme alle clorofille hanno molte proprietà terapeutiche, come ad esempio attività antiossidanti (Gouveia et al., 2005) e altre proprietà che fortificano il sistema immunitario (Cha et al., 2008; Tanaka et al., 1984).

Altri componenti biochimici come le proteine, sono le vitamine e i minerali.

Le vitamine sono sostanze organiche essenziali all'organismo umano, il quale non può produrle in quantità sufficienti. Per questo motivo deve necessariamente inserirle nella dieta (Ru et al., 2020).

I minerali sono sostanze inorganiche necessarie al corpo umano per essere in buona salute.

C. vulgaris contiene vitamina A, B₁₂, C ed E (Safi, 2014; Maruyama et al., 1997) e minerali come calcio, potassio e zinco (Yusof et al., 2011).

C. vulgaris è un microorganismo di ampia applicazione a livello biotecnologico, in quanto presenta una notevole produzione di metaboliti a seconda di come è coltivata, di seguito una tabella riassuntiva delle possibili applicazioni dei metaboliti derivati da *C. vulgaris* (Tabella 2):

Tabella 2 - Applicazioni dei metaboliti derivati da *C. vulgaris*

Categoria	Applicazioni
Lipidi	Biocarburante
Proteine	Integratore alimentare, uso farmaceutico
Carboidrati	Bioetanolo
Pigmenti	Uso farmaceutico
Vitamine e minerali	Integratore alimentare

Molti studi dimostrano come *C. vulgaris* riesca a fissare la CO₂ quando coltivata in un fotobioreattore (Keffer et al., 2002) e rimuovere azoto e fosforo da acque reflue (Aslan & K.,

2006). Inoltre, il risparmio di uso di acqua dolce utilizzando acque reflue per la produzione di biomassa è uno dei punti principali della ricerca sulle microalghe (Brennan & Owend., 2010). Grazie alla capacità di rimuovere il 100% dello ione ammonio (NH_4^+) e alle capacità di biorisanamento di acque reflue, *C. vulgaris* è considerata una delle migliori microalghe per la fitodepurazione (González et al., 1997).

Sulla base di una ricerca condotta da Coronado-Reyes (2020), viene consigliato di coltivare *C. vulgaris* utilizzando fotobioreattori in cui è possibile posizionare sensori per monitorare ossigeno, temperatura, pH e intensità della luce. Inoltre, consiglia l'uso di luci LED perché possono essere collocate all'interno del fotobioreattore così da irradiare la coltura.

1.3 Configurazione impiantistiche

A livello industriale, la coltivazione di colture microalgali può avvenire utilizzando diverse tipologie di reattore, che differiscono principalmente per lo spazio in pianta occupato, per la qualità della biomassa ottenuta, per la strategia di alimentazione e di raccolta della biomassa, e per la precisione nel controllo dei vari parametri operativi.

Per quanto riguarda la strategia di alimentazione, i reattori possono essere divisi in: batch, fed-batch, semi-continui e continui.

La coltura in batch è un sistema chiuso, in cui tutti i nutrienti necessari alla crescita cellulare (terreno di coltura) vengono forniti ad inizio sperimentazione, senza aggiunte successive.

La coltura in fed-batch è un sistema semi-aperto (o a volume variabile), in cui non si hanno flussi in uscita fino a fine sperimentazione, ma vi è un flusso in entrata, finalizzato al reintegro dei nutrienti consumati durante la crescita microalgale.

Nei reattori che lavorano in semicontinuo, un volume definito di coltura cellulare viene periodicamente raccolto e sostituito da terreno di crescita, con l'obiettivo di reintegrare i nutrienti consumati e mantenere la coltura nella condizione di crescita ottimale. I sistemi in continuo lavorano analogamente, prelevando e reintegrando la coltura costantemente (Yin et al., 2020). Nei reattori in semi-continuo ed in continuo, è fondamentale definire adeguatamente i flussi in entrata e in uscita dal sistema, in modo tale da garantire un tempo di ritenzione idraulico (HRT) sufficiente alle microalghe per replicarsi in fase esponenziale.

Per quanto riguarda le caratteristiche costruttive invece, i reattori possono essere raggruppati in tre macrocategorie: sistemi aperti (*open ponds*), sistemi chiusi (fotobioreattori) o sistemi ibridi.

1.3.1 I sistemi aperti (*open ponds*)

Gli *open ponds* sono delle vasche aperte in cui la coltura microalgale è tenuta in sospensione meccanicamente tramite pale o giranti. Sono generalmente collocati all'esterno e illuminati per mezzo della luce solare. Questi sistemi hanno trovato fin da subito un largo utilizzo a livello industriale grazie alla semplicità di installazione e alle elevate volumetrie coltivabili. Le caratteristiche di costruzione di questi sistemi, però, li rendono estremamente suscettibili alle variabili ambientali. Ad esempio, l'illuminazione e la temperatura non possono essere costanti e controllate, perché soggette agli eventi meteorologici; allo stesso modo è difficile mantenere un volume costante in vasca, a causa della pioggia o dell'eccessiva evaporazione nelle giornate più soleggiate. In questi sistemi, generalmente mantenuti ad un livello di circa 30 cm per garantire un'illuminazione sufficiente in tutta la colonna di liquido, l'eccessiva evaporazione risulta essere una problematica particolarmente grave, in quanto può comportare un consistente utilizzo di acqua di reintegro, con un conseguente aggravio dei costi di esercizio e andando inevitabilmente a pesare sull'impronta idrica e sulla sostenibilità del processo. Un'altra criticità importante di questi sistemi è legata al fatto che, essendo sistemi aperti, è difficile evitare contaminazioni esterne e garantire la purezza del ceppo coltivato.

Uno degli *open ponds* più utilizzati è il tipo *Raceway pond* (Figura 4), costituito da un circuito chiuso e progettato per garantire il ricircolo continuo della coltura, evitandone la sedimentazione.

Altri sistemi utilizzati sono i *Circular open pond system* (Figura 5).

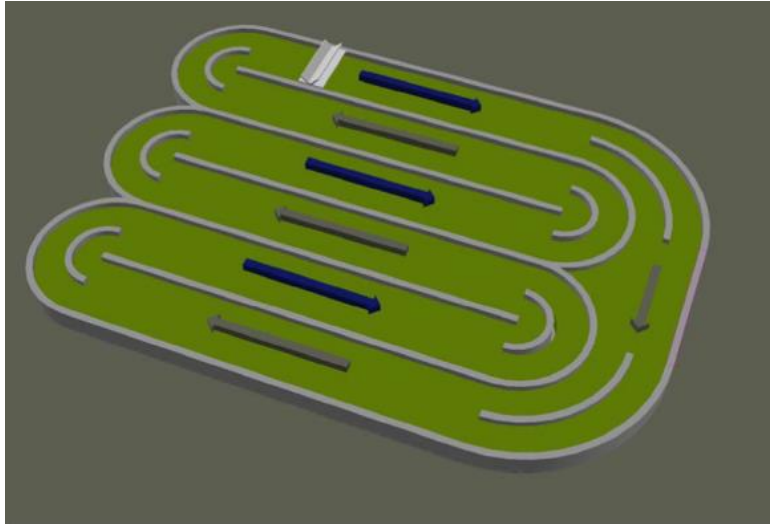


Figura 4 - Raceway pond (Shaikh Abdur Razzak et al., 2017).

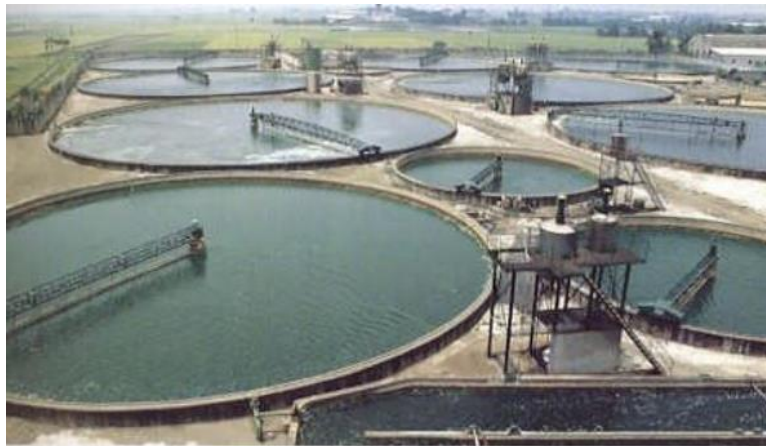


Figura 5 - Circular open pond system (Making Biodiesel Books).

1.3.2 I sistemi chiusi (fotobioreattori)

Per risolvere alcune delle criticità legate ai sistemi *open ponds* è possibile utilizzare dei fotobioreattori chiusi (PBR -*PhotoBioReactor*-) Questi sistemi permettono un controllo più mirato dei vari parametri di processo, permettono di gestire i flussi in entrata ed in uscita dal sistema, e limitano la possibilità di contaminazione della coltura (Bellucci et al., 2020)

I PBR possono essere posizionati sia all'esterno, sfruttando quindi la luce solare per l'illuminazione, oppure all'interno. In questo caso possono essere utilizzate varie fonti

artificiali di illuminazione, tra queste le più comunemente impiegate sono lampade alogene, tubi a fluorescenza, e LED.

Le sorgenti luminose possono essere collocate esternamente o internamente al reattore. Nel caso in cui l'illuminazione sia fornita esternamente, le pareti del reattore vengono realizzate in materiali trasparenti, come vetro o più comunemente Plexiglas.

Utilizzare sorgenti luminose artificiali permette di garantire costantemente il mantenimento delle condizioni ottimali per la coltura, sia in termini di illuminazione che di lunghezze d'onda, così da massimizzare la produzione di biomassa e aumentare l'efficienza fotosintetica

Lo svantaggio principale dei PBR consiste nella maggiore complessità del sistema, che conseguentemente influisce sui costi di installazione e di esercizio.

A seconda di come sono realizzati, i PBR possono essere raggruppati in: *bag-systems*, *bubble-columns*, *air-lifts*, *tubular systems* e *flat-panels*. Tutte queste categorie differiscono per quanto riguarda le caratteristiche costruttive, ma hanno l'obiettivo comune di massimizzare le rese di produzione, o di minimizzare i costi di installazione e gestione.

I fotobioreattori più semplici da un punto di vista costruttivo sono i *bag-systems* (Figura 6), costituiti da borse di plastica di diversa dimensione. Il primo svantaggio che si riscontra su questi reattori è la difficoltà nell'installazione di sistemi di aerazione e miscelazione, portando facilmente la coltura a sedimentare. I vantaggi principali riguardano i bassi costi di installazione e la possibilità di utilizzare buste molto capienti.



Figura 6 - Bag system (Indoor algae culture system – WUR).

I sistemi *bubble-columns* e *air-lifts* consistono in colonne verticali, illuminate esternamente o internamente. I reattori *bubble-columns* (Figura 7a) mantengono la miscelazione della coltura sfruttando il sistema di aerazione, posto generalmente sul fondo della colonna. Nei sistemi *air-lifts* vengono implementate particolari configurazioni o ripartizioni interne in maniera tale da massimizzare il rimescolamento della coltura, separando il flusso ascendente da quello discendente (Figura 7b). Il flusso d'aria alimentato nel sistema per mantenere la miscelazione può, inoltre, essere addizionato con percentuali variabili di CO₂, per implementare la produttività e l'efficienza fotosintetica (Barahoei 2020).

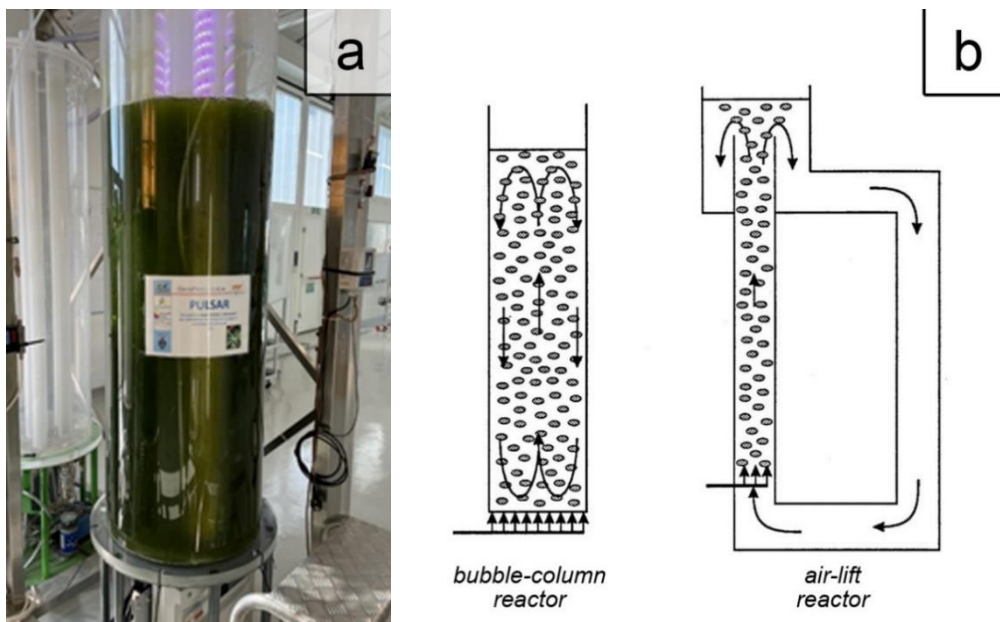


Figura 7 - (a) PBR Bubble column utilizzato durante la sperimentazione, GreenPropulsion Laboratory, Fusina, Porto Marghera. (b) rappresentazione schematica delle differenze di moto della coltura microalgale in un sistema bubble-columns e in una delle possibili configurazioni air-lift (R. Mudde & T. Saito, 2001, modificato).

I *tubular reactors* (Figura 8) sono costituiti da un sistema tubolare a serpentina, generalmente con un diametro di 10-15 cm, in cui la coltura è tenuta in costante movimento da pompe di ricircolo. Questa conformazione permette di incrementare notevolmente il rapporto superficie/volume del reattore, al fine di massimizzare l'efficienza fotosintetica della coltura. La conformazione a serpentina permette di ridurre per quanto possibile lo spazio in pianta occupato. Tuttavia, questi sistemi presentano degli svantaggi per quanto riguarda i fenomeni di sedimentazione della coltura e la manutenzione del sistema.



Figura 8 - Sistema tubolare (Terraevita.edagricole.it).

1.4 Parametri di processo

1.4.1 Nutrienti

I fattori che influenzano la crescita delle microalghe comprendono due categorie: fattori nutrizionali e fattori ambientali. I fattori nutrizionali includono la composizione e la quantità delle specie chimiche nel mezzo di coltura, le più importanti sono la fonte di carbonio, azoto, fosforo. Il tipo e la concentrazione della fonte di carbonio e della fonte di azoto condizionano l'efficacia della strategia di coltivazione. Il secondo fattore è quello ambientale, tra cui il pH dell'ambiente di coltivazione, la temperatura, l'intensità della luce e l'intensità dell'aerazione del sistema. (Faramarzi et al., 2010).

Spesso, per aumentare l'apporto di CO₂, viene utilizzato un flusso d'aria arricchito di CO₂ in percentuale. Montoya et al. (2014) hanno implementato la coltivazione di *C. vulgaris* in un fotobioreattore tubolare autotrofico, ottenendo la massima concentrazione di biomassa e la massima efficienza di produzione di lipidi, con aria contenente l'8% di CO₂, rispettivamente di 6,8 g L⁻¹ e 29,56 mg L⁻¹ d⁻¹.

Tra tutti i fattori ecologici capaci di influenzare la crescita algale, la disponibilità di nutrienti è senza dubbio uno dei più importanti. Le microalghe necessitano di micronutrienti in quantità minime per catalizzare le loro reazioni enzimatiche, i più importanti sono Cu, Mn, Fe, Zn, Co e Mo.

Inoltre necessitano in grande quantità di macronutrienti che sono i componenti strutturali delle cellule, come per esempio C, H, O, N, P, S, Mg, Ca, K, Na, Cl e Si.

L'azoto, uno degli elementi fondamentali per il metabolismo microalgale, è possibile trovarlo nelle acque in varie forme, specialmente sotto forma inorganica.

Il fosforo invece può essere organico o inorganico. Sotto forma di inorganico è prevalentemente presente come ortofosfato ed è l'unica forma che può essere utilizzata dalle microalghe.

Tra i parametri che incidono sulla crescita delle microalghe c'è il pH; il valore di pH più appropriato per la crescita di *C. vulgaris* è compreso tra 10 e 10,5. (Gong et al., 2014).

Durante l'assimilazione fotosintetica della CO₂, si verifica un costante aumento del pH dovuto all'accumulo dello ione idrossido (OH⁻) nel mezzo di coltura (Richmond, 2004).

Una diminuzione del pH della soluzione altera l'equilibrio chimico, accelerando così la formazione di CO₂. Tuttavia, fornire un'elevata quantità di CO₂ può portare ad un incremento nella concentrazione di HCO₃⁻ nel sistema, con conseguente diminuzione del pH ed inibizione della crescita microalgale (Larsdotter, 2006).

Un valore di pH elevato influenza la concentrazione di fosforo nelle microalghe, che possono causare la precipitazione di fosfati attraverso la formazione di fosfati di calcio limitando quindi la disponibilità di fosforo per le microalghe (Larsdotter, 2006).

Una maggiore concentrazione di ammoniaca in linea con un pH elevato può compromettere l'efficienza della fotosintesi. Inoltre, un pH elevato può causare la flocculazione delle microalghe, portando alla riduzione della crescita delle microalghe e dell'assorbimento dei nutrienti (Larsdotter et al., 2006).

1.4.2 Illuminazione

L'illuminazione è caratterizzata da due parametri: intensità e lunghezza d'onda della luce. La luce influenza la fotosintesi, la crescita e la respirazione cellulare, e in particolare quando non sussistono condizioni di limitazione da nutrienti.

Il metabolismo del carbonio, come tutte le reazioni endotermiche, necessita di energia per potersi compiere. Nella fotosintesi questa energia è fornita dalla luce.

L'illuminazione è un fattore importante nel processo di fotosintesi per convertire l'anidride carbonica e acqua in ossigeno e composti organici, come carboidrati e proteine.

La biomassa delle microalghe riflette i fotoni che vengono forniti alla coltura, riducendo la disponibilità di luce nelle parti interne dei fotobioreattori. Infatti, le microalghe vicine alla superficie in un fotobioreattore assorbono la maggior parte dei fotoni, limitando la luce ricevuta nella parte interna. Questo è noto come self-shading o shadow-effect (González et al., 2019).

Avere zone nel fotobioreattore che sono molto illuminate e altre del tutto buie, non sarebbe adatto per la crescita cellulare a causa, rispettivamente, dei fenomeni di fotoinibizione e fotolimitazione.

Tuttavia, alcuni risultati suggeriscono una strategia di illuminazione non continua, perché i tassi di crescita rimangono elevati e i costi di produzione si riducono.

Questo perché la divisione cellulare per la coltura fotosintetica unicellulare di solito avviene in condizioni di oscurità.

Invece, per altri casi, la divisione cellulare avviene sia nella fase scura che in quella chiara, ma per le microalghe appartenenti al genere *Chlorella*, si verifica una maggiore divisione cellulare dopo l'interruzione della fase di illuminazione. Inoltre, alcuni meccanismi enzimatici possono essere disabilitati durante l'illuminazione (Hultberg et al., 2014; Al-Qasmi et al., 2012).

Se la sorgente luminosa avesse uno spettro limitato che si sovrappone allo spettro di assorbimento fotosintetico, l'emissione di luce a frequenze inutilizzabili non ci sarebbe, rendendola molto efficiente.

Tra le sorgenti luminose attualmente disponibili, i diodi a emissione di luce (LED) sono le uniche che soddisfano i criteri precedenti. I LED sono leggeri e sufficientemente piccoli da essere inseriti in qualsiasi fotobioreattore e i loro altri vantaggi includono una minore generazione di calore, una maggiore efficienza di conversione e una maggiore tolleranza per l'accensione e lo spegnimento (luce pulsata).

Inoltre, i LED hanno uno spettro di emissione di luce ristretto compreso tra 20 e 30 nm, che può sopperire alle esigenze fotosintetiche. Ad esempio, la lunghezza d'onda di assorbimento del LED blu e del LED rosso è rispettivamente di circa 450–470 nm e 645–665 nm (Yeh et al., 2009).

Nel lavoro di Katsuda et al. (2004) è stato verificato l'effetto della luce LED blu su *Haematococcus pluvialis*, con un tasso di crescita massimo di 0,026 h⁻¹.

Lo stesso autore in un articolo successivo (Katsuda et al., 2006) ha evidenziato come anche l'uso di luce pulsata LED blu sia conveniente per incrementare le cinetiche di crescita, ottenendo 0,030 h⁻¹.

Molti altri risultati suggeriscono invece che i LED rossi a 660 nm sono in grado di sostenere la crescita della biomassa con la massima efficienza energetica.

Infine, i LED possono essere utilizzati per far crescere le alghe sotto una luce pulsata personalizzata tramite modulazione dell'ampiezza dell'impulso, che aumenta la produzione di biomassa e potrebbe consentire alle microalghe di superare l'efficienza fotosintetica massima proposta del 17% (Blanken et al., 2013).

1.4.3 Temperatura

La temperatura rappresenta un fattore limitante per la coltivazione di microalghe sia in sistemi aperti che in sistemi chiusi. Può influenzare le reazioni enzimatiche, il sistema della membrana cellulare e altre caratteristiche (Zeng et al., 2011).

Le condizioni di crescita a bassa temperatura portano a una reazione spontanea e cambiano il meccanismo cellulare e quindi una riduzione della fluidità delle membrane cellulari.

La bassa temperatura limita la velocità di crescita cellulare e quindi riduce la produzione di biomassa (Nishida et al., 1996).

La temperatura ottimale per *C. vulgaris* è di circa 30°C, in cui si ottiene la massima produttività della biomassa (Chinnasamy et al., 2009).

Converti et al., (2009) hanno riportato che il tasso di crescita di *C. vulgaris* a 35°C diminuisce del 17% rispetto a 30°C. Un eccessivo aumento della temperatura fino a 38°C porta a un brusco arresto della crescita delle microalghe portando alla morte le cellule.

1.4.4 Il ruolo dei pigmenti

Qualsiasi composto che assorbe lunghezze d'onda specifiche esibisce di conseguenza un colore distintivo, ed è chiamato pigmento (Mauseth 1991).

L'assorbimento di energia da parte degli organismi fotosintetici dipende quindi dalla natura chimica dei loro pigmenti costitutivi.

I principali gruppi di pigmenti presenti nelle microalghe, vale a dire clorofille, ficobiline e carotenoidi (caroteni e xantofille), sono descritti nella tabella (Tabella 3) (Masojidek et al. 2004).

Tabella 3 - Pigmenti nelle microalghe (Carvalho,2011).

Gruppo di pigmenti	Colore	Intervallo delle bande di assorbimento (nm)	Pigmenti
Clorofille	Verde	450-475	Clorofilla a
		630-675	Clorofilla b
			Clorofilla c ₁ ,c ₂ , d
Ficobiline	Blu, Rosse	500-650	Ficocianine
			Ficoeretrine
			Alloficocianine
Carotenoidi	Giallo, Arancione	400-550	β-Carotene
			α-Carotene
			Luteine
			Violaxantine
			Fucoxantine

1.4.5 La clorofilla

Le clorofille rappresentano il gruppo più importante; la loro struttura comprende una coda di fitolo e un anello di porfirina.

Questi due composti fungono da antenna per catturare la luce, con l'atomo di magnesio al centro che trasporta gli elettroni necessari per le reazioni di fotosintesi.

All'interno del suddetto gruppo principale, la molecola più importante è la clorofilla a.

I pigmenti accessori includono le clorofille b e c, nonché i carotenoidi; i primi assorbono altre lunghezze d'onda dello spettro di radiazione e trasmettono la loro energia alla clorofilla a, mentre il ruolo dei carotenoidi sembra essere l'assorbimento della luce in eccesso (e quindi la protezione dell'integrità della clorofilla).

I carotenoidi sono solitamente rossi, gialli o arancioni, quindi non assorbono la luce nel range tipico delle clorofille, ma invece nelle regioni viola/blu e blu/verde della luce visibile (Kommareddy et al., 2003).

Le ficobiline sono pigmenti idrosolubili, costituiti da molti composti strettamente correlati, ad esempio la ficocianina, un pigmento blu presente nelle microalghe blu-verdi.

Di seguito l'immagine dello spettro di assorbimento di alcuni pigmenti fotosintetici (Figura 9):

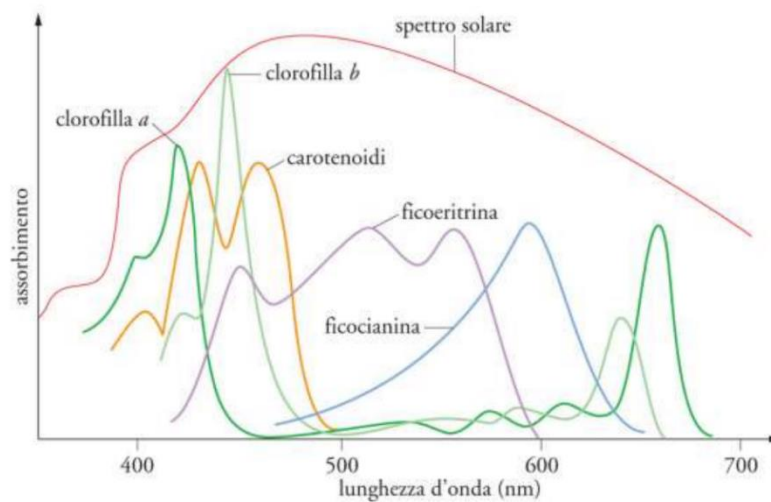


Figura 9- Spettro di assorbimento di alcuni pigmenti fotosintetici. Fonte: www.treccani.it.

In *C. vulgaris* la clorofilla può raggiungere l'1-2% in peso secco, inoltre questi pigmenti possono essere estratti per ricavare prodotti ad uso terapeutico, come attività antiossidante e come prevenzione da malattie croniche (Safi, 2014).

Al fine di stimolare la produzione di carotenoidi in *C. vulgaris*, è possibile coltivare queste microalghe in condizioni di stress come alta intensità della luce e bassi livelli di nutrienti (Gouveia et al., 1996). Di seguito una tabella con i principali pigmenti di *C. vulgaris* (Tabella 4):

Tabella 4 - Possibili pigmenti contenuti in *C. vulgaris* in differenti condizioni di crescita (Safi, 2014)

Pigmenti	Ug g⁻¹ (dw)
β-Carotene	7-12000
Astaxantina	550000
Cantaxantina	362000
Clorofilla a	52-3830
Clorofilla b	72-5770
Feofitina a	2310-5640
Feofitina b	N/A
Violoxantina	10-37

1.5 Stato dell'arte

L'utilizzo di luce LED come sistema di illuminazione dei fotobioreattori è molto promettente ed ha attirato l'attenzione della comunità scientifica negli ultimi anni. Rendón et al. (2013) nel suo studio sull'effetto della concentrazione di CO₂ nella crescita di *C. vulgaris* sotto quattro differenti illuminazioni LED, ha registrato valori di biomassa massima quando la coltura era illuminata da luce blu ottenendo 1.5 g·L⁻¹. Invece, Kim et al. (2014) ha sperimentato come la biomassa prodotta da *C. vulgaris* incrementi del 30% cambiando le lunghezze d'onda dei LED da blu a rosso durante la sperimentazione.

Anche lo studio riportato da Atta et al. (2013) ha rivelato che *C. vulgaris* mostra la massima produttività di biomassa, utilizzando LED blu con fotoperiodo 12:12, ottenendo concentrazioni maggiori di 2,5 g·L⁻¹.

Fu et al. (2012) invece, ha fornito dati sui tentativi di ottenere prestazioni ottimali utilizzando illuminazioni LED ma cambiando il mezzo di coltura arricchito di nutrienti durante la sperimentazione, ottenendo per *C. vulgaris* una produttività di 2,11 g·L⁻¹·d⁻¹ con una concentrazione di biomassa massima di 20 g·L⁻¹. Queste metodologie sono state dispendiose ma gli autori hanno voluto dimostrare quale strategia sia migliore per l'utilizzo di un fotobioreattore *bubble column* di 300 mL con luce LED per produrre biomassa nell'industria delle microalghe.

Abu-Gosh et al. (2016) e Lima et al. (2021) riportano come la luce pulsata, utilizzando i LED, abbia effetti positivi anche sulla produzione di pigmenti, lipidi e proteine.

Viste le loro caratteristiche costitutive, le luci LED risultano particolarmente adatte all'applicazione di luce pulsata, in quanto la loro risposta rapida permette pulsazioni anche di alta intensità, con un tempo di vita maggiore di 25000 ore (Lima et al., 2021).

C. vulgaris e *C. pyrenoidosa* sono state coltivate con luce pulsata da Keramati et al. (2021) e Matthijs et al. (1996) rispettivamente. Keramati ha utilizzato un fotobioreattore a membrana da 12 L e Matthijs una beuta da 232 ml, ottenendo tassi di crescita massimi 0,30 g·L⁻¹·d⁻¹ e 0.1 h⁻¹ rispettivamente.

Sempre Keramati nel medesimo studio (2021) ha applicato una frequenza di 1 Hz ottenendo 1,37 g·L⁻¹. Invece utilizzando luce continua 24h ha ottenuto una concentrazione di 1,87 g·L⁻¹.

Un'applicazione a scala pilota è stata ottenuta da Lam et al. (2014) che ha utilizzato un fotobioreattore *sequential bagged* con capacità 100L, ottenendo una biomassa di 0,38 g·L⁻¹. Un'applicazione interessante, invece, è stata ottenuta da McClure et al. (2019) che ha utilizzato un fotobioreattore *bubble column* da 50L, illuminato da LED bianco, per produrre Luteina (pigmento carotenoidico che trova applicazioni nel settore alimentare e nutraceutico) ottenendo valori massimi di 1,6 mg·L⁻¹·day⁻¹.

Di contro, Schulze et al. (2017) ha riportato in una review sull'utilizzo di luce pulsata, mostrando risultati di diversi autori, come la luce pulsata a lunghezze d'onda e frequenze d'impulso diverse, non abbiano influenzato né la crescita di biomassa né la produzione di prodotti di valore nelle cellule microalgali.

Sempre Schulze et al. (2020) in uno studio ha riportato come *Tetraselmis chui* e *Chlorella stigmatophora* non abbiano beneficiato della luce pulsata, con nessuna frequenza e intensità possibile.

Tuttavia, ad oggi la letteratura risulta alquanto limitata per quanto riguarda l'utilizzo di reattori su scala pilota che implementino luci LED e luce pulsata.

2. Scopo

Attualmente sono pochi gli studi fatti sull'utilizzo di illuminazione LED pulsata per la crescita delle microalghe, specialmente per *C. vulgaris*, ma sono ancora meno gli studi fatti utilizzando impianti pilota per le sperimentazioni. La decisione quindi di sperimentare la crescita di *C. vulgaris* su un impianto pilota è stata dettata dalla mancanza di studi sulle coltivazioni stesse. I protocolli per la coltivazione di microalghe sono numerosi e si diversificano tra di loro per gli impianti di produzione e per la tipologia, per i parametri chimico fisici quali luce, pH e temperatura.

L'obiettivo della sperimentazione è focalizzato quindi nel trovare quali condizioni possono essere ottimali per la crescita di *C. vulgaris* in un impianto pilota da 200 litri illuminato da 5 colonne LED.

Le analisi effettuate per il monitoraggio della crescita sono la misura del pH, conta cellulare, analisi del peso secco, quantificazione di clorofille e carotenoidi.

Per questa sperimentazione sono stati svolti due test, il primo con illuminazione pulsata e il secondo con fotoperiodo 12:12, impostati in maniera tale che nell'arco della giornata la coltura fosse sottoposta alla stessa quantità di radiazione luminosa.

3. Materiali e metodi

3.1 Reattore

I test sono stati effettuati su un fotobioreattore di capacità 200 L di tipo *bubble-column*, caratterizzato da un cilindro in plexiglass all'interno del quale sono contenute 5 colonne contenenti strisce di LED (Samsung) da 58 W, le quali forniscono una luminosità massima di 5500 lux misurata mediante luximetro (Dr. Meter LX1330B).

Il reattore è stato mantenuto costantemente in aerazione utilizzando una soffiante (Nitto Kohki) (Figura 10a), mantenendo un flusso d'aria di circa 10 NL min^{-1} , corrispondenti a 0,05 vvm. L'aerazione è stata fornita al sistema dal fondo del reattore, collegando la pompa ad un tubo circolare forato (fori da 4 mm distribuiti equamente su tutta la lunghezza del tubo, Figura 10b).

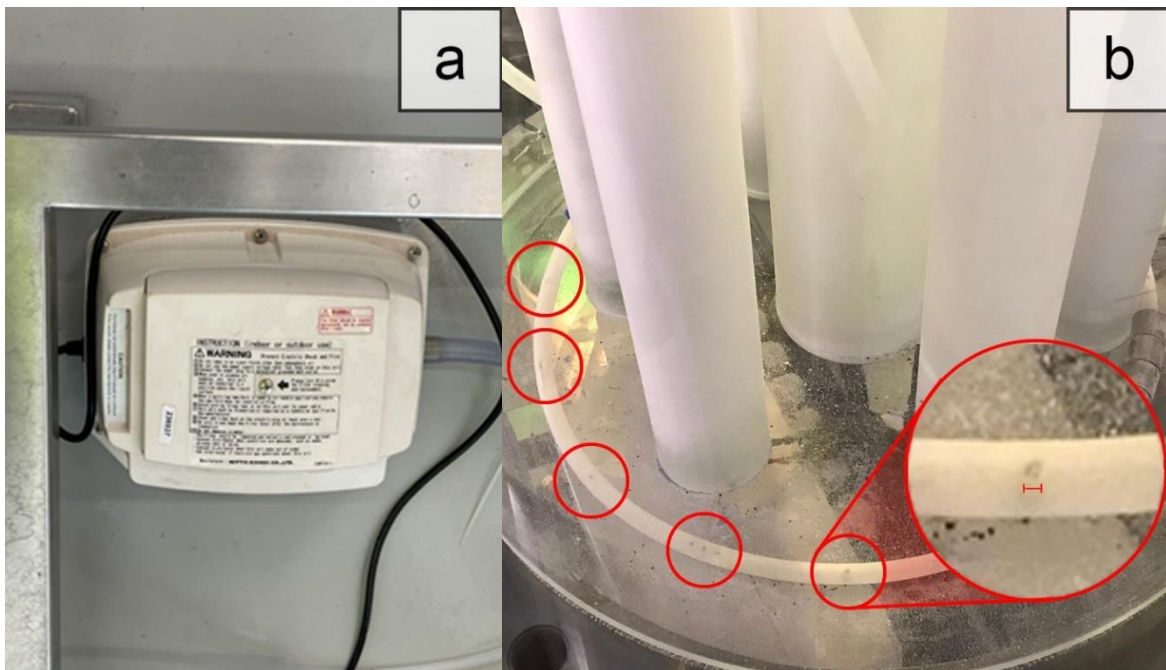


Figura 10, (a) soffiante Nitto Kohki utilizzata durante la sperimentazione per garantire l'aerazione della coltura microalgale; (b) dettaglio del sistema di aerazione e della disposizione dei fori di ingresso dell'aria

3.2 Ceppo microalgale e condizioni operative

In questo studio è stato utilizzato un ceppo microalgale di *Chlorella vulgaris*. L'inoculo è stato prelevato da un fotobioreattore da 4 L, dove era in utilizzo per il finissaggio dell'effluente di un digestore per il trattamento di scarti vinicoli. Una volta prelevato il ceppo è stato mantenuto su mezzo sintetico BG-11 su un fotobioreattore da 30 L, alimentandolo una volta a settimana in modo da garantire il mantenimento del ceppo e l'adattamento alla nuova tipologia di alimentazione.

Come terreno di crescita, sia per il mantenimento dell'inoculo sia durante la sperimentazione, è stato utilizzato un terreno standard BG-11 (Rippka et al., 1979). In Tabella 5 le concentrazioni dei sali utilizzati per la preparazione del terreno.

Tabella 5 - composizione del terreno di crescita standard BG-11

Composto	Concentrazione (g L ⁻¹)
NaNO ₃	1,5
K ₂ HPO ₄ ·3 H ₂ O	0,04
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,075
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,036
Acido citrico	0,006
Citrato ferrico di ammonio	0,006
EDTA	0,001
Na ₂ CO ₃	0,02
Soluzione di metalli in tracce*	1 mL

* la soluzione di metalli in tracce è stata preparata con: H₃BO₃ 2,86 g L⁻¹; MnCl₂·4 H₂O 1,81 g L⁻¹; ZnSO₄·7 H₂O 0,222 g L⁻¹; Na₂MoO₄·2 H₂O 0,390 g L⁻¹; CuSO₄·5 H₂O 0,079 g L⁻¹; Co(NO₃)₂·6 H₂O 0,0494 g L⁻¹

In queste due sperimentazioni *C. vulgaris* è stata coltivata in batch, attraverso l'uso di un fotobioreattore *bubble column* da 200L, per un periodo di 28 giorni.

La prima sperimentazione prevedeva l'utilizzo di illuminazione LED a luce pulsata, con una frequenza di 0,5 Hz mantenuta 24h.

Nella seconda sperimentazione invece, la luce era fissa con fotoperiodo 12:12 (l'illuminazione è stata regolata utilizzando una presa temporizzata, in modo tale che fosse attiva dalle 7 di mattina alle 19 di sera).

Di seguito una tabella riassuntiva delle condizioni operative (Tabella 6):

Tabella 6 - Riassunto condizioni operative

	Tipo di illuminazione	Frequenza (Hz)	Illuminazione giornaliera media	Volume (L)	Biomassa iniziale ($g L^{-1}$)
Run 1	Luce pulsata	0,5	2250	200	0,05 $g L^{-1}$
Run 2	Luce fissa	-	2250	200	0,05 $g L^{-1}$

3.3 Monitoraggio della coltura microalgale e dei parametri di crescita

3.3.1 Misura del pH

Il pH viene controllato ogni giorno attraverso un pH-metro. Il pH-metro viene lavato con acqua distillata e asciugato prima dell'uso.

Per una corretta misura del pH, il procedimento di misura viene ripetuto più volte. La taratura dello strumento viene effettuata una volta a settimana.

3.3.2 Conta cellulare

La conta cellulare determina quante cellule ci sono per millilitro di soluzione. La concentrazione cellulare è stata stimata tramite conta con l'ausilio di un microscopio (Leica DME) e una camera di conta Bürker (Figura 11).

La camera di conta (Figura 12) è dotata di due griglie separate, composte da un quadrato suddiviso a sua volta in 9 quadrati chiamati settori di conta, ulteriormente suddivisi in 16 quadrati più piccoli.

La conta del campione diluito è stata effettuata su tre dei settori di conta.

L'equazione che determina il numero di cellule è la seguente (Eq 2):

$$x10^6 \text{cell mL}^{-1} = \frac{CC \times FD}{V} \times \frac{1}{10^6} \quad \text{Eq 2}$$

Dove CC indica il numero di cellule contate nella camera di Bürker, FD il fattore di diluizione applicato, V il volume effettivo in mL di soluzione contata (in questa sperimentazione è pari a 0,0003 mL dato il numero di settori contati e le dimensioni caratteristiche della camera di conta); $\frac{1}{10^6}$ infine è il fattore di conversione utilizzato per esprimere il risultato in milioni di cellule mL⁻¹.

Il risultato delle conte è espresso in milioni di cellule per millilitro di soluzione.

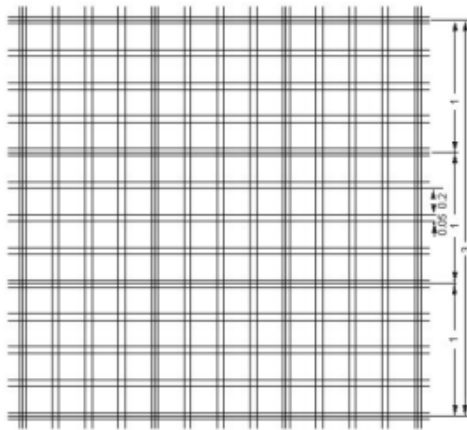


Figura 11 - Camera di conta Bürker.

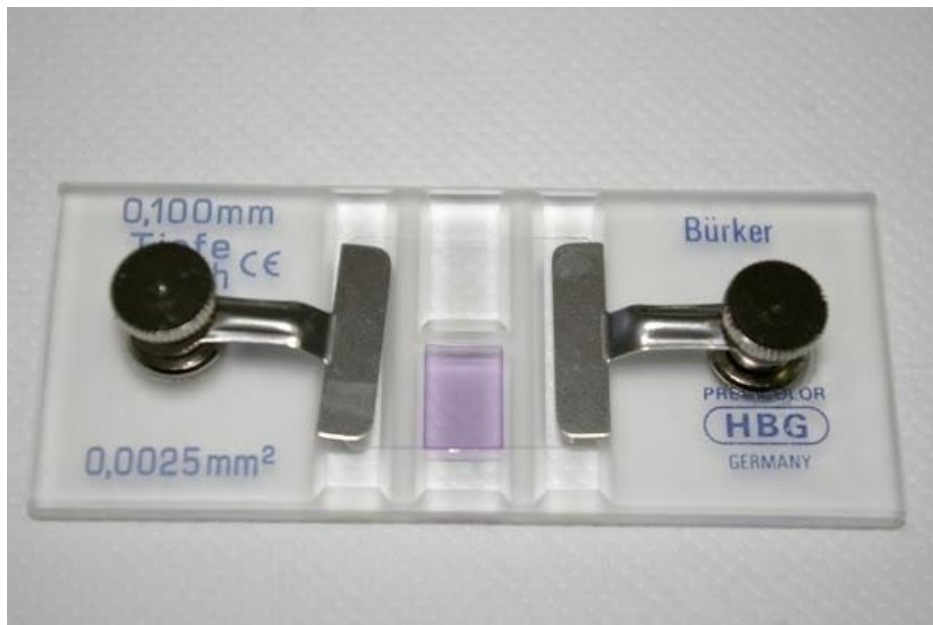


Figura 12– Foto camera di Bürker

3.3.3 Analisi del peso secco

L'analisi del peso secco misura quanta biomassa effettiva è rimasta dopo 24 ore in forno a 105°C.

Il peso secco è stato monitorato giornalmente, attraverso l'uso di filtri in acetato di cellulosa (ArtiGlass) con porosità 0,45µm e diametro 47mm. I filtri essiccati per almeno 24 ore a 105 °C, sono stati pesati tramite bilancia analitica (Mettler-Toledo B204-S).

Un'aliquota nota di campione viene filtrata, la biomassa filtrata viene lavata con acqua distillata e posta in forno a 105°C per almeno 24 ore, per poi essere nuovamente pesata.

I filtri sono stati filtrati su un sistema di filtraggio collegato ad una pompa a vuoto (ILMVAC MPC301Z).

Il valore del peso secco è determinato dall'equazione seguente (Eq 3):

$$Peso\ secco\ (gL^{-1}) = \frac{P_1 - P_0}{V} \quad Eq\ 3$$

Dove:

P_1 = peso del filtro con campione dopo passaggio in forno;

P_0 = peso del filtro vuoto.

V = volume di coltura microalgale filtrato

Il tasso di crescita massimo (μ_{max}) (d^{-1}) e la produttività massima ($g\ L^{-1}\ d^{-1}$) sono state determinate basandosi sul peso secco (Eq 4-5):

$$\mu_{max} = \frac{\ln C_1 - \ln C_0}{t} \quad Eq\ 4$$

$$P_{max} = \frac{C_1 - C_0}{t} \quad Eq\ 5$$

Dove C_1 indica la concentrazione della biomassa finale e C_0 la concentrazione iniziale; t indica il tempo trascorso in giorni.

3.3.4 Quantificazione Clorofille a, b e Carotenoidi

Le clorofille e i carotenoidi sono dei pigmenti fotorecettori responsabili della cattura dell'energia luminosa che consente alle cellule microalgali di svolgere il processo fotosintetico, in particolare la clorofilla a. Le due tipologie di clorofilla esistenti (a e b), differiscono nella composizione della catena laterale: la prima presenta un gruppo metilico (-CH₃) mentre la seconda presenta un gruppo aldeidico (-CHO).

Ciò si traduce in diversi spettri di assorbimento della luce: la clorofilla a, infatti, presenta i picchi di assorbimento della luce approssimativamente a 430 nm e 662 nm, mentre la clorofilla b a 453 nm e 642 nm. Clorofilla B e carotenoidi svolgono soprattutto il ruolo di pigmenti accessori; con questo termine vengono indicati i pigmenti che assorbono lunghezze d'onda che la clorofilla a assorbe di meno.

L'analisi dei pigmenti è stata effettuata utilizzando un'aliquota nota di campione (1-2 mL di coltura cellulare, a seconda del contenuto di pigmenti atteso) successivamente centrifugata a 9000 rpm per 5 min in modo da separare la biomassa dal surnatante.

Dopo la rimozione del surnatante sono stati aggiunti 3 mL di soluzione estraente. Come soluzione estraente è stato utilizzato metanolo (Sigma Aldrich, purezza 99%). L'estrazione è avvenuta su un bagnetto termico a 60°C per 60 min. Al termine dell'estrazione le provette sono state nuovamente centrifugate a 9000 rpm per 5 min in modo da separare la biomassa dal surnatante, al quale è stata letta l'assorbanza a 470,0 nm, 652,4 nm e 665,2 nm utilizzando uno spettrofotometro (marca, modello), sulla base del metodo riportato da Lichtenthaler and Wellburn (Lichtenthaler & Wellburn, 1985).

Questi valori sono quindi stati utilizzati per determinare il contenuto di clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi totali, tramite equazione 6, 7 e 8 rispettivamente:

$$\text{Ch a } (\mu\text{g mL}^{-1}) = ((16,72 \times \text{Abs}_{665,2}) - (9,16 \times \text{Abs}_{652,4})) \times \frac{V_{\text{solvente}}}{V_{\text{campione}}} \quad \text{Eq 6}$$

$$\text{Ch b } (\mu\text{g mL}^{-1}) = ((34,09 \times \text{Abs}_{652,4}) - (15,28 \times \text{Abs}_{665,2})) \times \frac{V_{\text{solvente}}}{V_{\text{campione}}} \quad \text{Eq 7}$$

$$\text{Carotenoidi } (\mu\text{g mL}^{-1}) = \left(\frac{(1000 \times \text{Abs}_{470,0}) - (1,63 \times \text{Ch a}) - (104,96 \times \text{Ch b})}{221} \right) \times \frac{V_{\text{solvente}}}{V_{\text{campione}}} \quad \text{Eq 8}$$

4. Risultati e discussione

I due sistemi di coltura sono stati utilizzati con due diversi fotoperiodi e tipo di illuminazione. Uno degli obiettivi è quello di studiare la crescita delle colture algali e di confrontare le diverse condizioni di luce, al fine di determinare l'effetto della luce stessa sulla cinetica di crescita microalgale.

4.1 pH

Il pH, uno dei parametri importanti da controllare per la crescita delle microalghe, influisce sul metabolismo.

Nella sperimentazione con luce pulsata, il pH ha avuto un andamento decrescente sin da subito fino ad un valore inferiore a 8,50.

A differenza della sperimentazione con luce pulsata, nella sperimentazione con fotoperiodo 12:12 si è avuto un aumento del pH a valori superiori di 10, per tutta la durata della sperimentazione, con oscillazioni fino a valori di 11,50 (Figura 13).

Un aumento del pH è dovuto, durante l'assimilazione fotosintetica della CO_2 , all'accumulo dello ione idrossido (OH^-) nel mezzo di coltura (Richmond, 2004).

Al contrario, una diminuzione del pH della soluzione altera l'equilibrio chimico, accelerando così la formazione di CO_2 , che è la fonte di carbonio preferibile per le microalghe (Larsdotter, 2006).

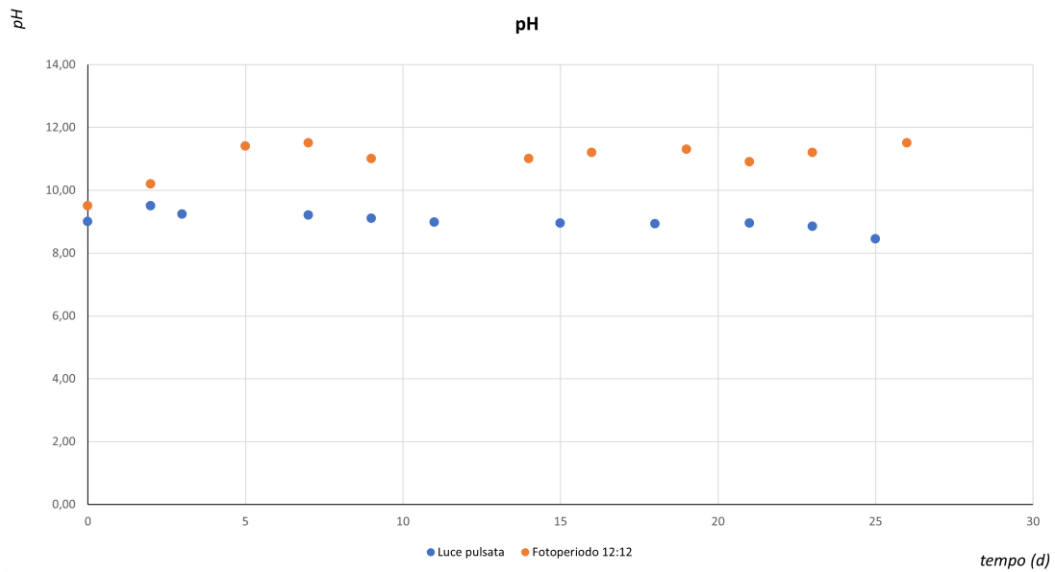


Figura 13 - Grafico andamento pH

4.2 Conta cellulare e peso secco

Nelle due sperimentazioni, l'analisi del peso secco ha riportato una crescita della biomassa fino ad un valore di $0,77 \pm 0,02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,46 \pm 0,01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ con luce pulsata e fotoperiodo 12:12 rispettivamente (Figura 14) (Tabella 7). Si direbbe che la luce pulsata sia vantaggiosa ma il risultato è comunque minore da quanto ottenuto da Keramati et al. (2021) che ha ottenuto $1,37 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, utilizzando una frequenza di impulso pari 1 Hz, a differenza della sperimentazione condotta per questa tesi che ha utilizzato una frequenza di impulso di 0,5 Hz.

Il tasso di crescita massimo nella coltura con luce pulsata risulta pari a $0,09 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$, valore superiore a quanto ottenuto con fotoperiodo 12:12 ($0,06 \pm 0,01 \text{ d}^{-1}$).

La produttività massima invece è risultata $0,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ sotto luce pulsata mentre per il fotoperiodo 12:12 $0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$.

Valore poco inferiore per la luce pulsata registrato rispetto a Keramati et al. (2021), il quale nel suo studio ha ottenuto un tasso di crescita massimo di $0,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{d}^{-1}$ utilizzando un reattore a membrane per trattenere la biomassa.

Il confronto dell'andamento del peso secco tra le due sperimentazioni dimostra come la luce pulsata non influenzi subito la produttività ma bensì la crescita cellulare, dove ha evidenziato una fase esponenziale di crescita cellulare nei primi due giorni registrando al secondo giorno $15,67 \pm 9,89$ milioni di cellule mL^{-1} , valore maggiore a quello registrato per il fotoperiodo 12:12

con $5,07 \pm 2,83$ milioni di cellule mL^{-1} . Si nota come la fase esponenziale nel fotoperiodo 12:12 sia stato preceduto da una fase latente (Figura 15).

Nella sperimentazione con fotoperiodo 12:12, inoltre, ha evidenziato una fase decrescente successivamente a quella esponenziale, riportando una diminuzione della biomassa.

Un'osservazione riguarda l'ultima parte della curva che mostra un andamento decrescente. Questa fase di morte può verificarsi quando i nutrienti stanno limitando la capacità di duplicazione delle cellule.

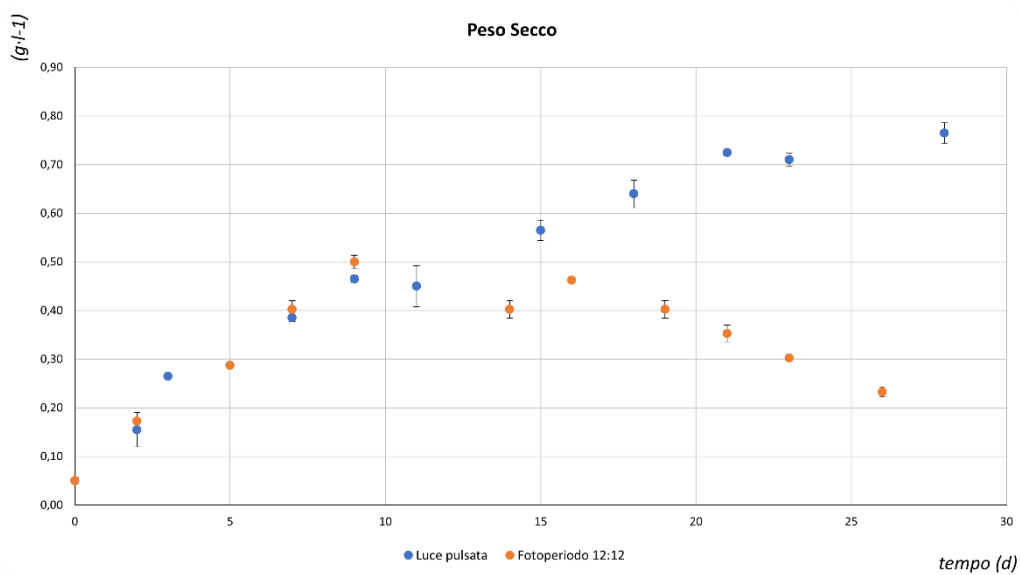


Figura 14 - Grafico peso secco

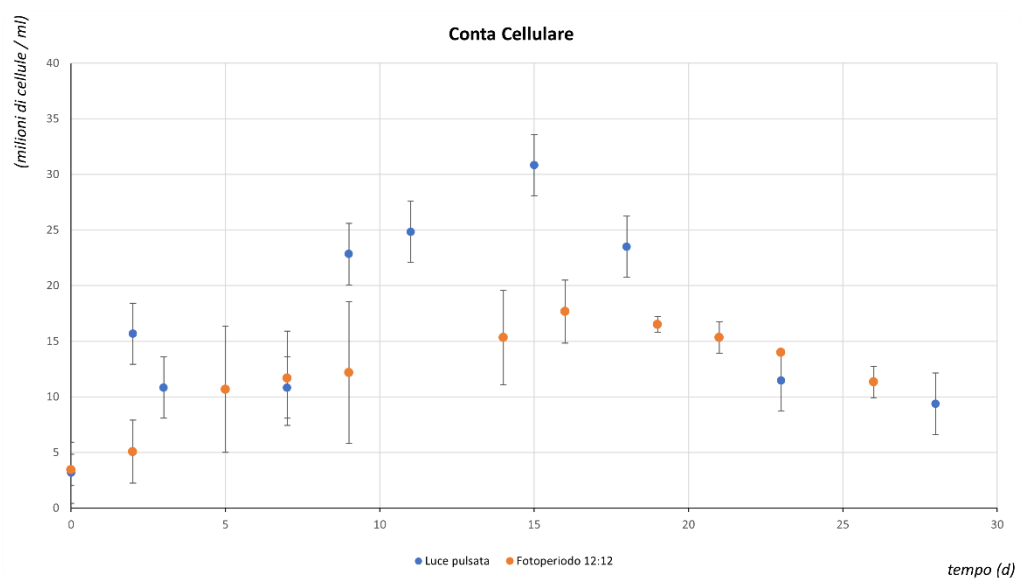


Figura 15 - Grafico conta cellulare

In Tabella 7 vengono riportati i dati ottenuti per quanto riguarda la concentrazione della biomassa delle due sperimentazioni, espressa come peso secco e come conta cellulare.

Tabella 7 - Risultati peso secco e conta cellulare.

	Luce pulsata	Fotoperiodo 12:12
Peso secco (g·L ⁻¹)	0,77 ± 0,02	0,23 ± 0,01
Conta cellulare (milioni di cellule·ml ⁻¹)	9,38 ± 31,82	11,33 ± 1,41

4.3 Clorofilla a, b e Carotenoidi

Le analisi nella sperimentazione con luce pulsata hanno evidenziato un accumulo di clorofilla a, b sin da subito registrando un successivo calo diminuendo progressivamente, ottenendo concentrazioni di $6,41 \pm 0,16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1,51 \pm 0,04 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ rispettivamente.

I valori dei carotenoidi totali hanno registrato un calo di concentrazione all'inizio della sperimentazione, generando un successivo accumulo, raggiungendo una concentrazione finale di $0,73 \pm 0,03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Nella condizione sperimentale di crescita con fotoperiodo 12:12, invece, le analisi dei pigmenti hanno registrato valori di concentrazione diversi che durante la sperimentazione con luce pulsata, specialmente per la clorofilla a dove ha subito un drastico calo di concentrazione raggiungendo un valore di $1,31 \pm 0,43 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Per quanto riguarda i valori di clorofilla b e carotenoidi totali risultano costanti nel tempo, raggiungendo una concentrazione di $0,30 \pm 0,09 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $0,16 \pm 0,03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ rispettivamente. Analizzando gli andamenti delle due sperimentazioni si nota come le concentrazioni dei pigmenti risultino tutti maggiori nelle condizioni con luce pulsata (Figure 16, 17, 18).

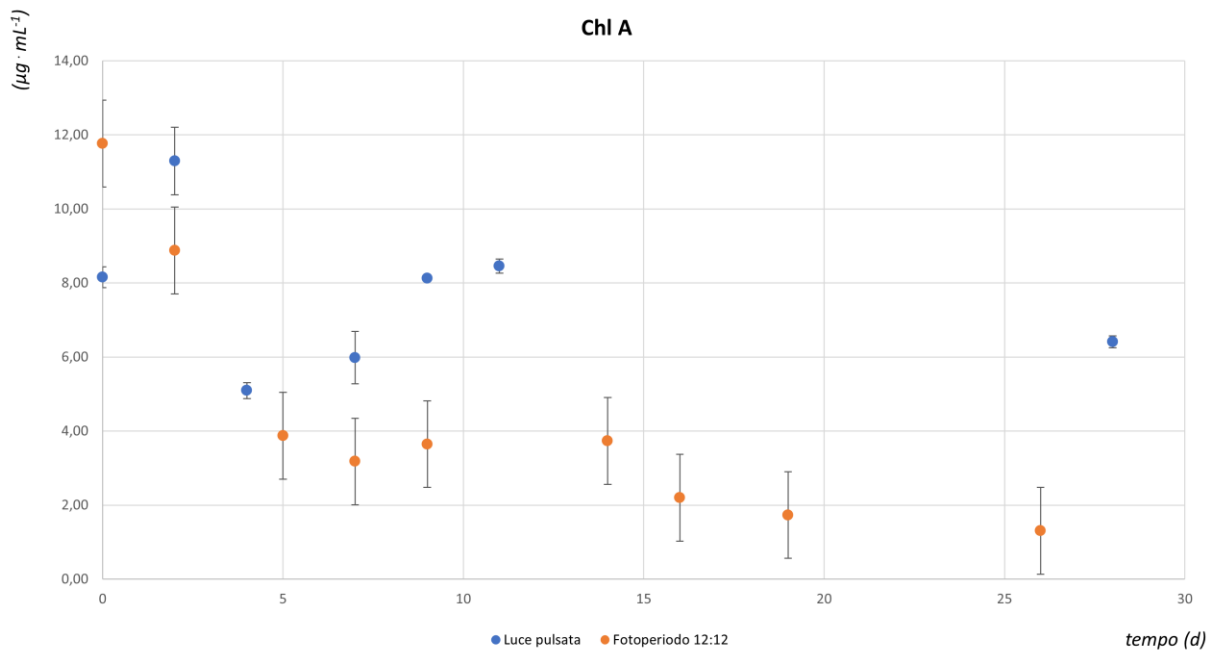


Figura 16 - Grafico andamento clorofilla A

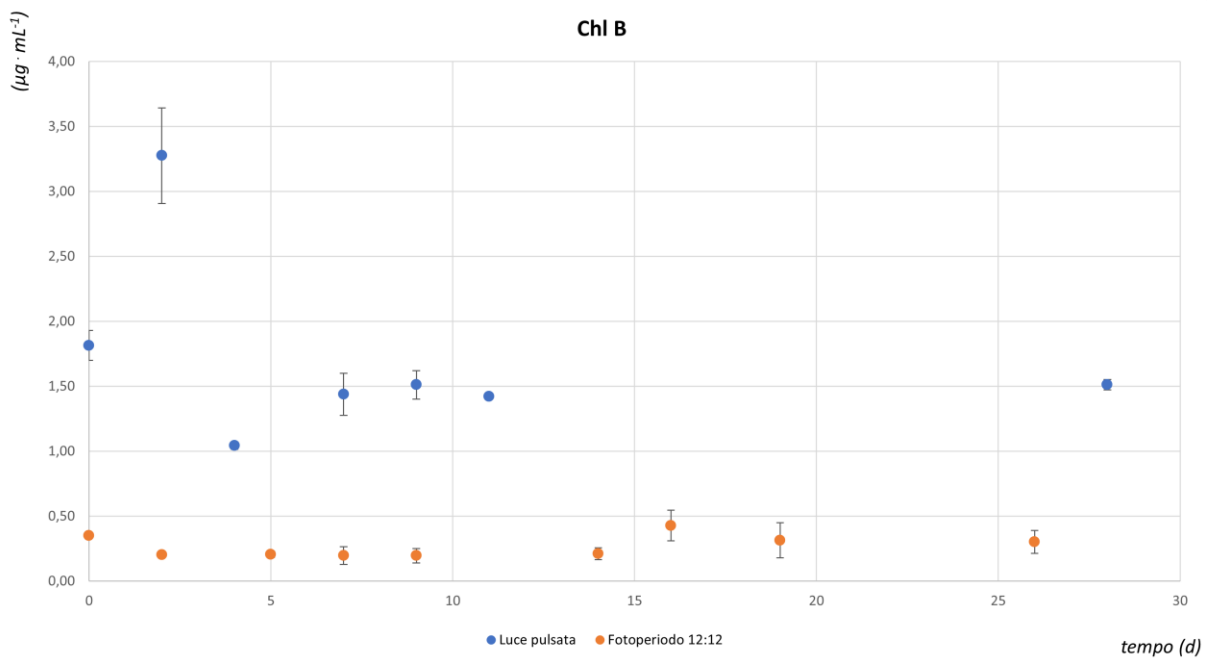


Figura 17 - Grafico andamento clorofilla B

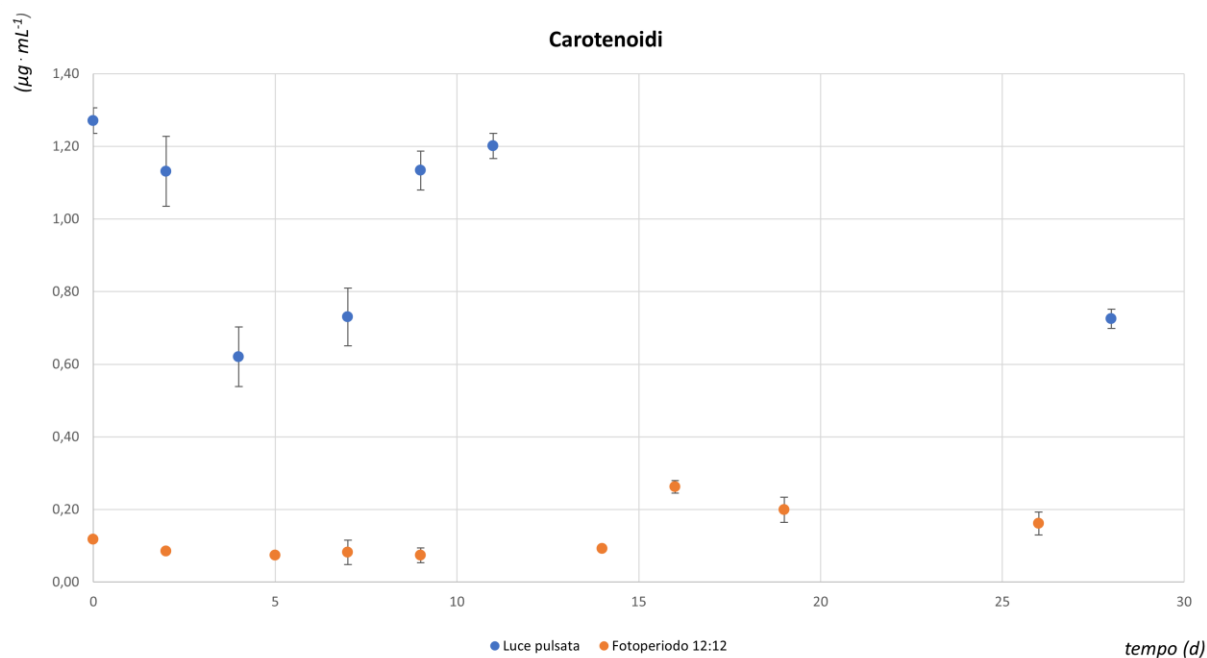


Figura 18 - Grafico andamento carotenoidi

Di seguito sono riportate le concentrazioni finali dei pigmenti (Tabella 8):

Tabella 8 - Concentrazioni pigmenti

	Luce pulsata	Fotoperiodo 12:12
Clorofilla a (µg·mL ⁻¹)	6,41 ± 0,16	1,31 ± 0,43
Clorofilla b (µg·mL ⁻¹)	1,51 ± 0,04	0,30 ± 0,09
Carotenoidi (µg·mL ⁻¹)	0,73 ± 0,03	0,16 ± 0,03

In Tabella 9 viene riportato un confronto tra le due condizioni con i risultati principali ottenuti:

Tabella 9 - Confronto delle due condizioni

	Luce pulsata	Fotoperiodo 12:12
Tipo di illuminazione	Pulsazioni	Luce fissa
Durata sperimentazione (d)	28	26
Biomassa massima raggiunta (g·L ⁻¹)	0,77 ± 0,02	0,46 ± 0,01
Tasso di crescita massimo μ_{\max} (d ⁻¹)	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Conta cellulare massima raggiunta (milioni di cellule·mL ⁻¹)	30,83 ± 3,54	17,67 ± 2,83

5. Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi è stata studiata la cinetica di crescita di *C. vulgaris* in fotobioreattore da 200L con luce pulsata e con fotoperiodo 12:12.

Le sperimentazioni effettuate hanno portato a conclusione, visto l'esito delle analisi, che per produrre più biomassa l'utilizzo della luce pulsata è consigliata.

Sono state eseguite due tipologie di prove sperimentali: una a luce pulsata e una a luce continua con fotoperiodo 12:12.

Riportando i dati, l'utilizzo di luce pulsata ha riportato una concentrazione massima di $0,766 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \pm 0,02$ mentre nel fotoperiodo 12:12 $0,46 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \pm 0,01$.

Per ogni prova sperimentale sono state effettuate analisi del peso secco, conta cellulare, misura del pH e misura della concentrazione di pigmenti (clorofilla a, b e carotenoidi).

Nella prova sperimentale a luce pulsata, si ottiene che, la velocità di crescita e la concentrazione in fase stazionaria aumentano fino alla fine dei giorni prefissati per la sperimentazione.

Invece, per la sperimentazione con fotoperiodo 12:12, le analisi evidenziano come questo tipo di illuminazione influisca sulla cinetica di crescita, raggiungendo valori minori della luce pulsata. Questo risultato può essere rilevante dal punto di vista industriale in quanto può essere sfruttato nella progettazione di fotobioreattori in grado di ottimizzare le pulsazioni in grado di raggiungere la miglior cinetica di crescita per *C. vulgaris*.

6. Bibliografia

Abu-gosh S., Fixler D., Dubinsky Z., Iluz D. Flashing light in microalgae biotechnology. *Bioresource Technology*. 203: 357-363. 2016.

Ahmad A. L., Yasin N. H.M., Derek C. J. C., Lim J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*; 15:584-93. 2011.

Al-Qasmi M., Raut N., Talebi S., Al-Rajhi S-. Al-Barwani T. A review of effect of light on Microalgae Growth. *Proceedings of the World Congress on Engineerin*. Vol !. 2012

Aslan S. & Kapdan I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecol Eng*. 28:64–70. 2006.

Atta M., Idris A., Bukhari A., Wahidin S. Intensity of blue LED light: A potential stimulus for biomass and lipid content in fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.162>. *Bioresource Technology* 148: 373–378. 2013.

Bajguz A. Effect of brassinosteroids on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol Biochem*. 38:209–15. 2000.

Bayless D. J. & Lunka A. A. Effects of flashing light-emitting diodes on algal biomass productivity. *J. Appl. Phycol*. 25, 1679-1685. 2013.

Bellucci M., Marazzi F., Naddeo L. S., Piergiacomo F., Beneduce L., Ficara E., Mezzanotte V. Disinfection and nutrient removal in laboratory-scale photobioreactors for wastewater tertiary treatment', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. John Wiley and Sons Ltd, 95(4), pp. 959–966. doi: 10.1002/jctb.6010. 2020.

Blanken W., Cuaresma M., Wijffels R. H., Janssen M. *Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. Algal Research*, 2(4), 333 340. 2013.

Brennan L. & Owend, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing and extractios of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 557-577. 2010.

Carl Safi. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. 2014

Carvalho, A.P., Silva, S.O., Baptista, J.M., Malcata, F.X. Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1275–1288. 2011.

Cha K. H., Koo S. Y., Lee D. U. Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. *J Agric Food Chem.* 56:10521–6. 2008.

Chen Y. & Vaidyanathan S. Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae. *Analytica Chimica Acta* 776, 31-40. 2013.

Chinnasamy S., Ramakrishnan B., Bhatnagar A., Das K. C. Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature. *Int. J. Mol. Sci.*, 10(2): 518.532. 2009.

Clement-Larosière B. Etude de la croissance de *Chlorella vulgaris* en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO₂. Tesi di dottorato, NNT: 2012ECAP0005 tel-00697006. 2012.

Converti A., Casazza A., Ortiz E. Y., Perego P., Del Borghi M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing* 48, 1146-1151. 2009.

Coronad-Reyes J. A., Salazar-Torres J. A., Juárez-Campos B., González-Hernández J. C. *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Food Science and Technology.* 2020.

Dismukes, G. C., Bennette, N., Ananyev, G. M., & Posewitz, M. C. Aquatic phototrophs: Efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 235-240. 2008.

Faramarzi M.A., Forootanfar H.; Shakibaie M.; *Microlalgal Biotechnology.* Tehran University of Medical Sciences Publication. 23-42. 2010.

Faried M., Samer M., Abdelsalam E., Yousef R.S., Attia Y.A., Ali A.S. Biodiesel production from microalgae: processes, technologies and recent advancements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 79, 893- 913. 2017.

Fu W., Gudmundsson O., Feist A. M., Herjolfsson G., Brynjolfsson S., Palsson B. Maximizing biomass productivity and cell density of *Chlorella vulgaris* by using light-emitting diode-based photobioreactor. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.004>. *Journal of Biotechnology* 161: 242–249. 2012.

Gong O., Feng Y., Kang L., Luo M., Yang J. Effect of light DND pH on cell density of *Chlorella vulgaris*. The 6th International Conference of Applied Energy ICAE2014. 2014.

González L. E., Canizares R. O., Baena S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*. Vol 60. 259-262. 1997.

González-Camejo J., Viruela A., Ruano M. V., Barat R., Seco A., Ferrer, J. *Dataset to assess the shadow effect of an outdoor microalgae culture. Data in Brief, 25, 104143.* 2019.

Gouveia L., Veloso V., Reis A., Fernandes H., Novais J., & Empis J. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 57, 157- 163. 1996.

Gouveia L., Raymundo A., Batista A. P., Sousa I., Empis J. *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. *Eur Food Res Technol.* 222: 362-367. 2005

Hongli Z., Jilong Y., Zhen G., He H., Xiaojun J., Chang D. Disruption of *Chlorella vulgaris* Cells for the Release of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, and Microwaves. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 164: 1215-24. 2011.

Hultberg, M., Jönsson H. L., Bergstrand K. J., Carlsson A. S. Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Tech.*, 159: 465-467. 2014.

Katsuda T., Lababpour A., Shimahara K., Katoh, S. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme Microb. Technol.* 35, 81–86. 2004.

Katsuda T., Shimahara K., Shiraishi H., Yamagami K., Ranjbar R., Katoh S. Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *J. Biosci. Bioeng.* 102, 442–446. 2006.

Keffer J. E. & Kleinheinz G. T. Use of *Chlorella vulgaris* for CO₂ mitigation in a photobioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 29:275–80. 2002.

Keramati A., Azizi S., Hashemi A., Shariati F. P. Effects of flashing light-emitting diodes (LEDs) on membrane fouling in a reciprocal membrane photobioreactor (RMPBR) to assess nitrate and phosphate removal from whey wastewater. *Journal of Applied Phycology.* 33:1513–1524. 2021.

Kim D.G., Lee C., Park S., Choi Y.E. Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*. *Bioresource technology.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.078>. 159: 240-248. 2014.

Kommareddy A. & Anderson G. Study of light as a parameter in the growth of algae in a Photo-Bio-Reactor (PBR). ASAE Annual International Meeting Presentation 034057, Las Vegas, USA. 2003.

Larsdotter, K. Wastewater Treatment with Microalgae – a literature review. *Solar Energy,* 62(1), 31–38. 2006.

Lichtenthaler, H.K. & Wellburn A.R. Determination of total carotenoids and chlorophylls A and B or leaf in dissolved solvents. *Biol. Soc. Trans.* 11:591-592. 1985.

Lichtenthaler H.K. & Buschmann C. Extraction of Photosynthetic Tissues: Chlorophylls and Carotenoids. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry,* 2001.

Lima S., Schulze P. S. C, Schuler L. M., Rautenberg R., Mòrales-Sanchez D., Santos T. F., Pereira H., Varela J. C. S., Scargiali F., Wijffels R. H., Kiron V. Flashing light emitting diodes (LEDs) induce proteins, polyunsaturated fatty acids and pigments in three microalgae. *Journal of Biotechnology.* 325: 15-24. 2021.

Lordan S, Ross RP, Stanton C. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar Drugs.* 9:1056–100. 2011.

Luan G., Zhang S., Lu X. Engineering cyanobacteria chassis cells toward more efficient photosynthesis', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 62, pp. 1–6. doi: 10.1016/j.copbio.2019.07.004. 2020.

Maki Y., Kurihara I., Kawano Y. Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) *Planta.*, 221(6): 766-775. 2005

Maki Y., Fujishita M., Hirata A., Kawano S. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *J. Plant Res.*, 117(4): 257-264. 2004.

Maruyama I., Nakao T., Shigeno I., Ando Y., Hirayama K. Application of unicellular algae *Chlorella vulgaris* for the mass-culture of marine rotifer *Brachionus*. *Live Food in Aquaculture*. 133-138. 1997.

Masojidek J, Koblizek M., Torzillo G. Photosynthesis in microalgae. In: Richmond A (ed) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science, Oxford, pp 20–39. 2004.

Masojidek J. & Torzillo G. Mass cultivation of freshwater microalgae. – In: Jorgensen S.E., Fath B. (ed.): *Encyclopaedia of Ecology*. Pp. 2226-2235. Elsevier, Oxford 2008.

Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Volume 14, pp. 217-232. 2010.

Matthijs H. C. P., Balke H., Van Hes U. M., Kroon B. M. A., Mur L. R., Binot R. A. Application of light-emitting diodes in bioreactors: Flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). *Biotechnology and Bioengineering*. 1996.

Matsumoto M, Yokouchi H, Suzuki N, Ohata H, Matsunaga T. Saccharification of marine microalgae using marine bacteria for ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol*. 105:247-254. 2003.

Mauseth J. D. Plant physiology and development. In: Mauseth JD (ed) *Botany*. Saunders College Publishing, USA, pp 239– 271. 1991.

McClure D. D., Nightingale J. K., Luiz A., Black S., Zh J., Kavanagh J. M. Pilot-scale production of lutein using *Chorella vulgaris*. Algal research. 2019.

Mitchell C., Both A. J., Bourget M., Burr J., Kubota C., Lopez R., Morrow R., Runkle, E. LEDs: The future of greenhouse lighting! Hortic. Sci. Focus 52, 1–9. 2012.

Montoya E. Y. O, Casazza A. A, Aliakbarian B., Perego P., Converti A., Monteiro de Carvalho J. C. Production of *Chlorella vulgaris* as a source of essential fatty acids in a tubular photobioreactor continuously fed with air enriched with CO₂ at different concentrations. American Institute of Chemical Engineers *Biotechnol. Prog.*, 30:916–922. 2014.

Moon M., Kim C., Park W., Yoo G., Choi Y., Yang J. Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. Algal Research, 2(4), 352-357.. 2013.

Morrow C. LED Lighting in Horticulture. Hortscie. Vol. 43-7. 2008.

Mudde R. F. & Saito T. Hydrodynamical similarities between bubble column and bubbly pipe flow. doi:10.1017/s0022112001004335. *Journal of Fluid Mechanics*, 437. 2001.

Nadezhda I., Chernova, Sofya V., Kiseleva, Mikhail S., Vlaskin, Yulia Y., Rafikova. Renewable energy technologies: enlargement of biofuels list and co-products from microalgae. MATEC Web conf. Volume 112. Article 10010. 2017.

Nishida I. & Murata N. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: The Crucial Contribution of Membrane Lipids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 47(1): 541-568. 1996.

Perez–Garcia O., Esclante F. M. E., De-Bashan L. E., Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Res.* 45, 11-36. 2011.

Ren, N., Li, N., Li, C., Lee, H., Liu, J., Feng, Y., & Wand, X. Sequestration of CO₂ discharged from anode by algal cathode in microbial carbon capture cells (MCCs). *Biosensors and Bioelectronics*, pp. 2639-2643. (2010, August 15).

Rendón S. M., Roldan G. J. C., Paul Voroney R. Effect of Carbon Dioxide Concentration on the Growth Response of *Chlorella vulgaris* Under Four Different Led Illumination. 2013.

Richmond A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd; 2004.

Rippka, E., Deruelles, J., Waterbury, N.B. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria, *Journal of General Microbiology*. 1979.

Ru I. T. K., Sung Y. Y., Jusoh M., Wahid M. E. A., Nagappan T. *Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts: review. *Applied Phycology*. 1:1, 2-11. 2020.

Salman, J.M. & Ali, M.A.M. Bioethanol Production from Green Alga *Chlorella Vulgaris* Under Different Concentrations of Nitrogen. *Asian Journal of Natural & Applied Sciences* Vol, 3. 2014.

Schulze P. S. C., Guerra R., Pereira H., Schuler L. M., Varela J. C. S. Flashing LEDs for Microalgal Production. *Trends in Biotechnology*. Vol 35. 2017.

Schulze P. S. C., Brindley C., Fernández J. M., Rautenberg R., Pereira H., Wijffels R. H., Kiron V. Flashin light does not improve photosynthetic performance and growth of green microalgae. *Bioresource Technology Reports*. Vol 9. 2020.

Sforza E., Simionato D., Giacometti G.M., Bertucco A., Morosinotto T. Adjusted Light and Dark Cycles Can Optimize Photosynthetic Efficiency in Algae Growing in Photobioreactors. *PLoS ONE* 7(6): e38975. doi:10.1371/journal.pone.0038975. 2012.

Tanaka K, Konishi F, Himeno K, Taniguchi K, Nomoto K. Augmentation of antitumor resistance by a strain of unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*. *Cancer Immunol Immunother*. 17:90–4. 1984.

Tennessen D., Bula R. J, Sharkey T. D. Efficiency of photosynthesis in continuous and pulsed light emitting diode irradiation. *Photosynth Res* 44:261–269. 1995.

Ursu A-V, Marcati A, Sayd T, Sante-Lhoutellier V, Djelveh G, Michaud P. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol*. 157:134–9. 2014.

Van Den Hoek. *Algae. An introduction to Phycology* - Cambridge University Press. 1995.

Xu, H., Miao X., Wu Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotech.*, 126: 449-507. 2006.

Yam F.K., Hassan Z. Innovative advances in LED technology. – *Microelectron J*. 36: 129-137, 2005.

Yang Z., Zhaoan C., Hongbin L., Wei Z. Optimization of carbon dioxide fixation and starch accumulation by *Tetraselmis subcordiformis* in a rectangular airlift photobioreactor. *African Journal of Biotechnology* 10, 1888-1901. 2011.

Yeh N. C. & Chung J. P. High-brightness LEDs-energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 13, 2175–2180. 2009.

Yusof Y. A. M., Basari J. M. H., Nukti N. A., Sabuddin R., Muda A. R., Sulaiman S., Wan Ngah W. Z. Fatty acids composition of microalgae *Chlorella vulgaris* can be modulated by varying carbon dioxide concentration in outdoor culture. *African Journal of Biotechnology*, 10, 13536–13542. 2011

Yin Z., Zhu L., Li S., Hu T., ChuR., Mo F., Hu D., Liu C., Li B. A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. *Bioresource Technology* 301, art 122804. 2020.

Zeng Y., Ji X. Lian M., Ren L., Ouyang P., Huang H. Development of a Temperature Shift Strategy for Efficient Docosahexaenoic Acid Production by a Marine Fungoid Protist, *Schizochytrium* sp. HX-308. *Appl Biochem Biotechnol.* 164: 249-255. 2011.

Zuliani L., Frison N., Jelic A., Fatone F., Bolzanella D., Ballottari M. Microalgae Cultivation on Anaerobic Digestate of Municipal Wastewater, Sewage Sludge and Agro-Waste. *International Journal of Molecular Science* 17, art 1692. 2016.