

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali



**EFFETTO DEL RAPPORTO DI RICICLO IN
FOTOBIOREATTORI IN CONTINUO PER LA
COLTIVAZIONE DI *ARTHROSPIRA MAXIMA*:
COMPOSIZIONE DELLA BIOMASSA E OTTIMIZZAZIONE
DEL CONSUMO DI ACQUA E NUTRIENTI**

Relatore: Prof.ssa Eleonora Sforza
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Correlatore: Dr.ssa Lisa Borella
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Controrelatore: Prof.ssa Zottini Michela
Dipartimento di Biologia

Laureando: ANDREEA ROXANA COLTA
Anno Accademico 2022/2023

ABSTRACT

Secondo l'International Energy Agency, la produzione industriale annua mondiale di Spirulina è approssimativamente di 10.000 tonnellate di biomassa secca, con un consumo di circa 2000 litri d'acqua per kg di biomassa. La tradizionale coltivazione in sistemi batch e fed-batch non garantisce una produzione di biomassa costante e comporta l'accumulo di metaboliti secondari nella coltura, limitando la possibilità di riutilizzo del mezzo. A causa degli elevati costi di produzione, quindi, il riciclo di acqua e nutrienti risulta fondamentale per la sostenibilità del processo, anche da un punto di vista ambientale ed economico. Tuttavia, un rapporto di ricircolo troppo elevato potrebbe causare l'accumulo di metaboliti secondari, causando una diminuzione della produttività. Allo stato dell'arte, non è ancora presente un approccio quantitativo in grado di quantificare questi fenomeni. In questa tesi, quindi, lo scopo è quello di verificare l'effetto del rapporto di ricircolo sulla produzione e composizione della biomassa algale e del terreno di coltura in continuo. A questo scopo, sono stati misurate le produzioni di composti rilasciati nel mezzo da parte della specie *Arthrospira maxima*, con una particolare attenzione all'accumulo di esopolisaccaridi, e il loro effetto sulla coltivazione quando è presente un riciclo. Sono stati effettuati test in reattori in continuo, e sono stati analizzati diversi rapporti di riciclo, in un range compreso tra $R=3$ e $R=19.5$ ed il caso limite con reintegro quasi nullo. Mantenendo costante il tempo di permanenza del solido, si sono ottenuti valori di concentrazione di biomassa a stazionario costanti fino ad un rapporto $R=9$ con una concentrazione di biomassa a stazionario pari a $0,43 \pm 0,3 \text{ g L}^{-1}$. La secrezione di materiale organico disciolto nel mezzo è stata analizzata trovando accumuli di esopolisaccaridi (EPS) sopra i $300 \mu\text{g g}^{-1}$ per le condizioni con un rapporto di riciclo superiore. Questo accumulo di EPS ha comportato sul lungo termine l'occorrenza del *wash-out*. Per l'ottimizzazione del processo, è stato anche valutato l'effetto della concentrazione di NaHCO_3 nel terreno di coltura, per una migliore comprensione dell'equilibrio carbonatico sulla crescita del cianobatterio.

INDICE

Capitolo 1 -Introduzione

1.1 Microalghe e bioeconomia	1
1.2 Cianobatteri e Spirulina	2
1.2.1 Problemi di classificazione e loro implicazioni per l'industria	4
1.2.2 Caratteristiche e rilevanza commerciale di <i>Arthrospira</i> sp.	5
1.2.3 Importanza del carbonio nella coltivazione di <i>Arthrospira</i> sp.	8
1.2.3.1 Salinità del medium	8
1.2.3.2 Carbonio inorganico	9
1.2.3.3 Strategie di carbon capture.....	11
1.3 Sistemi di produzione industriali.....	11
1.3.1 Sistemi aperti	13
1.3.1.1 Raceway ponds.....	14
1.3.1.2 Circular ponds	14
1.3.1.3 Thin layer systems	15
1.3.2 Sistemi chiusi - Fotobioreattori.....	15
1.3.2.1 Flat panel	17
1.3.2.2 Vertical columns	18
1.3.2.3 Fotobioreattori a membrana (MPBR)	18
1.3.2.4 Polybags	19
1.3.2.5 Fotobioreattori tubulari	19
1.3.2.6 Sistemi ibridi	21
1.4 Modalità di produzione	21
1.4.1 Batch e fed-batch.....	21
1.4.2 Processi in continuo	23
1.4.3 Processi in continuo con riciclo.....	26
1.4.3.1 Strategie per la riduzione dei costi del medium	26
1.4.3.2 Riciclo del mezzo di coltura: Stato dell'arte.....	28

SCOPO DELLA TESI	34
-------------------------------	-----------

CAPITOLO 2 – MATERIALI E METODI.....	35
---	-----------

2.1 Organismo e condizioni di coltura.....	35
---	-----------

2.2 Sistemi di coltivazione.....	36
---	-----------

2.2.1 Esperimenti in Batch	36
2.2.1.1 Monitoraggio della composizione della biomassa e dell'accumulo di composti tossici.....	36
2.2.1.2 Valutazione della crescita a diverse concentrazioni di bicarbonato	37
2.2.2 Esperimenti in Continuo	38
2.2.3 Continuo con riciclo del mezzo (HRT > SRT).....	42

2.3 Monitoraggio della concentrazione cellulare	44
--	-----------

2.3.1	Peso secco	44
2.4	Misure analitiche	45
2.4.1	Nitrati	45
2.4.2	Ortofosfati	46
2.4.3	Carboidrati	47
2.4.4	Esopolisaccaridi.....	48
2.4.5	Proteine esterne	49
2.4.6	Titolazioni	50
2.5	Estrazione e quantificazione del contenuto di pigmenti.....	51
2.5.1	Clorofilla <i>a</i> e Carotenoidi	51
2.5.2	Ficobiline.....	52
2.6	Analisi statistica.....	53

CAPITOLO 3 – Effetto della concentrazione di bicarbonato sulla crescita di *A. maxima*

3.1	Esperimenti in batch per la determinazione dei parametri cinetici del bicarbonato.....	54
3.2	Esperimenti in continuo.....	59
3.2.1	Effetto della concentrazione di bicarbonato per la coltivazione di <i>A. maxima</i> in continuo	59
3.2.1.1	Produzione di biomassa e consumo di nutrienti	59
3.2.1.2	Contenuto di pigmenti.....	60
3.2.1.3	Produzione di carboidrati	61
3.2.1.4	Rilascio di composti nel medium – EPS.....	63
3.2.2	Effetto della concentrazione di bicarbonato sugli equilibri delle forme carboniche nella coltivazione di <i>A. maxima</i>	64
3.3	Considerazioni finali	68

CAPITOLO 4 – Accumulo di esopolisaccaridi nel mezzo di coltura ed effetto del rapporto di riciclo

4.1	Batch di controllo	69
4.2	Controllo in continuo - Studio del tempo di permanenza (τ) .	72
4.2.1	Produttività e consumo dei nutrienti.....	72
4.2.2	Composizione interna della biomassa	74
4.2.2.1	Produzione di pigmenti e ficobiline.....	74
4.2.2.2	Produzione di carboidrati	75
4.2.3	Secrezione di composti nel medium.....	76
4.3	Effetto del rapporto di riciclo su colture in continuo di <i>A. maxima</i>	77

4.3.1 Concentrazione di <i>A. maxima</i> a diversi rapporti di riciclo	78
4.3.1.1 Caso limite: riciclo con reintegro minimo di nutrienti.....	78
4.3.1.2 Rapporto di riciclo R=19.5.....	79
4.3.1.3 Riciclo R=3; R=5,6 e R=9	80
4.3.2 Inibizione della crescita: possibile ruolo degli EPS.....	81
4.3.3 Composizione della biomassa.....	85
Conclusioni	87
Bibliografia	89

CAPITOLO 1 – Introduzione

1.1 Microalghe e bioeconomia

Il settore delle microalghe sta attualmente emergendo e rappresenta un importante contributo alla bioeconomia globale, producendo biomassa utile per applicazioni legate al consumo umano, come prodotti farmaceutici cosmetici, alimenti e mangimi (Figura 1.1, (Malchira et al., 2019)). Attualmente, infatti, le microalghe sono state incorporate in molte formulazioni alimentari, il che ha portato ad un aumento significativo del numero di prodotti alimentari contenenti microalghe che sono stati lanciati sul mercato (Lafarga et al., 2020).

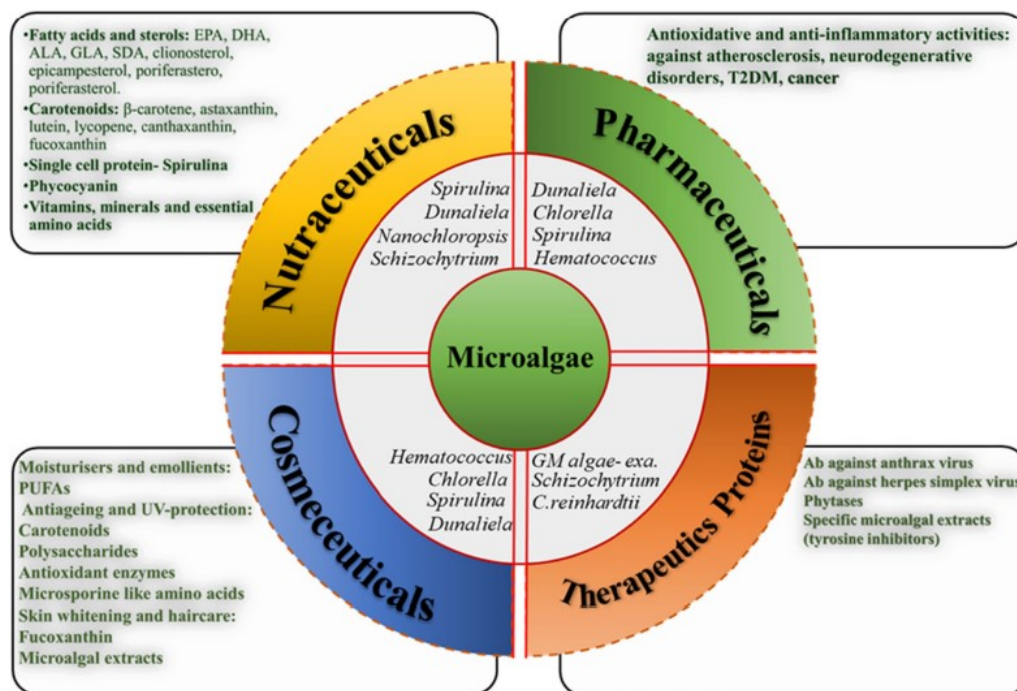


Figure 1.1 Applicazioni industriali delle microalghe (Malchira et al., 2019)

Tuttavia, le microalghe potrebbero potenzialmente contribuire molto di più alla bioeconomia, se aumentasse l'attuale capacità di produzione e venissero sviluppate nuove applicazioni di interesse commerciale. Ad oggi, le microalghe sono state proposte infatti come fonte per la produzione di biocarburanti, prodotti chimici e biofertilizzanti, ma possono anche fornire servizi come il trattamento delle acque reflue e la depurazione dei gas di scarico (Fernández et al., 2021).

Attualmente il settore gode dell'attenzione governativa a livello internazionale, almeno per quanto riguarda il contesto europeo. Infatti, le microalghe hanno il potenziale per contribuire alla transizione verso un'economia verde, circolare e neutrale dal punto di vista delle emissioni di carbonio nell'UE, e ciò è riconosciuto nel *Green Deal* europeo e in altre iniziative politiche dell'UE correlate, tra cui la *Farm to Fork*, la comunicazione sull'economia blu sostenibile, gli orientamenti strategici per un'acquacoltura dell'UE più sostenibile e competitiva e le strategie di bioeconomia. In effetti, le alghe, insieme alle energie rinnovabili oceaniche e alle biotecnologie blu, sono considerate settori innovativi emergenti dell'economia blu. Nonostante il potenziale contributo di questa risorsa e le politiche europee citate, attualmente manca una base di conoscenze completa e solida sulle alghe che possa sostenere queste politiche (Vazquez & Sanchez, 2022).

1.2 Cianobatteri e Spirulina

I cianobatteri, noti anche come alghe blu-verdi, costituiscono un *phylum* di microrganismi batterici autotrofi o eterotrofi, che si distinguono per la loro capacità di effettuare la fotosintesi. Per questo motivo, i cianobatteri sono generalmente inclusi nel gruppo delle microalghe (Spolaore et al., 2006). Come le microalghe, i cianobatteri sono in grado di fare la fotosintesi ossigenica. Essi svolgono un ruolo importante in natura come produttori primari di materiale organico, utilizzando la luce come fonte di energia, l'acqua come donatore di elettroni e la CO₂ come fonte di carbonio. Le reazioni della fotosintesi ossigenica sono usate per guidare la biosintesi a spese dei nutrienti inorganici. Alcune specie, come *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis* e *Scenedesmus obliquus*, sono capaci di crescere anche in assenza di luce, in modo, cioè, eterotrofico usando le riserve intracellulari di carbonio, soprattutto glicogeno, per il mantenimento della cellula. (Zuccaro et al., 2019). Oltre a essere autotrofi fotosintetici, i cianobatteri possiedono una serie di caratteristiche microbiche, tra cui un tasso di crescita piuttosto rapido, un elevato contenuto di proteine con un buon valore nutrizionale e un metabolismo variabile che risponde rapidamente ai cambiamenti ambientali (Cogne et al., 2003).

1.2.1 *Arthrospira maxima*

Arthrospira maxima è un cianobatterio filamentoso non eterocistico, riconoscibile per la principale caratteristica morfologica del genere: la disposizione dei tricomi cilindrici multicellulari in un'elica aperta a sinistra per tutta la sua lunghezza. I tricomi presentano costrizioni più o meno pronunciate in corrispondenza delle pareti trasversali e sono composti da cellule cilindriche corte, da circa 6 µm a 16 µm, con forme diverse in ceppi diversi (Ali & Saleh, 2012). Essi sono avvolti da una sottile guaina costituita principalmente da zuccheri. La frazione di esopolisaccaridi di *Arthrospira sp.* è una combinazione di polisaccaridi e proteine che aumentano con il passare del tempo durante il periodo di coltivazione in cui la frazione proteica ha un ruolo difensivo proteggendo i cianobatteri dalle condizioni ambientali difficili (Hamouda et al., 2020). Sebbene *Arthrospira platensis* sia maggiormente impiegata a livello industriale, alcuni studi (Oliveira et al., 1999) mostrano che *A. maxima* ha una crescita migliore a temperature comprese tra 20 e 40 °C. *A. maxima* e *A. platensis* sono simili nella loro composizione chimica e nelle proprietà nutrizionali (Tabella 1.1, Deasy Liestianty et al, 2019), la principale differenza tra le due specie è la loro morfologia (Papini et al., 2021).

Tabella 1.1: Composizione di vitamine, minerali e pigmenti di *Arthrospira sp.* per 1 g di campionamento (Deasy Liestianty et al 2019)

Vitamins composition		Minerals composition	
Biotin	0.55 µg	Potassium (K)	16 mg
Folic Acid	0.71 µg	Calcium (Ca)	15 mg
Pantothenic Acid	2 µg	Phosphorus (P)	10 mg
Cyanocobalamin (Vitamin B12)	3.6 µg	Manganese (Mn)	3 mg
Pyridoxine (Vitamin B6)	8 µg	Zinc (Zn)	70 µg
Thiamine (Vitamin B1)	48 µg	Magnesium (Mg)	3.7 mg
riboflavin (Vitamin B2)	55 µg	Sodium (Na)	2.5 mg
Niacin (Vitamin B3)	0.15 mg	Iron (Fe)	1.7 mg
Tocopherol (Vitamin E)	0.41 mg	Pigments	
Inositol Acid	0.7 mg	Phycocyanin	180 mg
Beta-carotene (pro-vitamin A)	5.8 mg	Chlorophyll	11 mg
Bioflavonoids	10 mg	Total Carotenoids	6 mg

Spirulina è infatti il nome commerciale dato a queste due specie di cianobatteri filamentosi. Ci sono ceppi che sono stati certificati *Generally Recognized as Safe* (GRAS) dall'Agenzia per la Sicurezza Alimentare (FDA) perché i metaboliti che producono non sono dannosi per l'uomo (Costa et al., 2019) ed il genere è considerato “superfood” dalla Commissione Europea, Regolazioni (EU) 2015/2283, grazie all' elevato contenuto di proteine, aminoacidi essenziali, vitamine e minerali (Li et al., 2022) (Araujo & Peteiro, 2021). Il genere comprende circa 51 ceppi all'interno di delle due specie comuni, *A. platensis* e *A. maxima*, che svolgono un ruolo importante per le applicazioni industriali (Klanchui et al., 2012). Poiché i diversi ceppi di spirulina possono adattarsi ad ambienti estremi, la loro coltivazione e il loro consumo si sono storicamente diffusi in quasi tutte le aree del mondo (Vonsak, 1997).

1.2.1 Problemi di classificazione e loro implicazioni per l'industria

Recentemente, *A. maxima* è stata oggetto di una ridefinizione tassonomica e rinominata *Limnospira maxima*, sulla base di analisi genomiche (Nowicka-Krawczyk et al., 2019). Rispetto alla tassonomia tradizionale basata su caratteristiche morfologiche, l'utilizzo di criteri genomici ha comportato una revisione della classificazione dei cianobatteri. L'individuazione di gruppi tassonomici complessi, come quelli costituiti da specie morfologicamente simili, può risultare problematica per l'industria della produzione di biomassa algale, poiché molte specie sono difficili da identificare esclusivamente attraverso l'osservazione morfologica (Araujo & Peteiro, 2021). In particolare, molti generi di cianobatteri sono costituiti da singoli filamenti, e quattro di essi sono caratterizzati dalla formazione di filamenti elicoidali simili: *Spirulina*, *Halospirulina*, *Arthrospira* e *Limnospira*. Tra questi generi, alcune specie di *Arthrospira* con morfologia diversa, come *A. maxima* e *A. fusiformis* sono coltivate in modo simile, e l'analisi filogenetica con il 16S non è in grado di discriminare queste specie l'una dall'altra. *A. platensis*, d'altra parte, può essere facilmente distinguibile al microscopio ottico rispetto ad *A. fusiformis*, mentre *A. maxima* è descritta con una larghezza circa doppia rispetto ad *A. platensis*. C'è un'evidente sovrapposizione tra il nome commerciale e il nome scientifico del genere Spirulina, che non viene utilizzato per la coltivazione (Papini et al., 2021). Questa pratica comune è un

problema serio nella scienza moderna, e purtroppo tale nomenclatura è spesso utilizzata in modo errato anche per i prodotti commerciali. I produttori di biomassa, così come i produttori di prodotti al dettaglio, non possono adottare cambiamenti di nomenclatura con la stessa facilità della comunità scientifica per diverse ragioni, come la legislazione e la necessità di evitare confusione da parte del consumatore (Araujo & Peteiro, 2021).

Negli ultimi anni, sulla base dei dati molecolari, morfologici e genetici, il genere *Arthrospira* è stato riclassificato, arrivando alla conclusione che *A. indica*, *A. fusiformis* e *A. maxima* mostrano una sufficiente distanza genetica rispetto al genere *Arthrospira* da meritare l'inclusione in un genere di nuova descrizione, *Limnospira*, contenente le specie *L. fusiformis*, *L. maxima* e *L. Indica* (Nowicka-Krawczyk et al., 2019). I termini *A. maxima* e *L. maxima* sono accettati come sinonimi dalla Commissione Europea (Araujo & Peteiro, 2021).

1.2.2 Caratteristiche e rilevanza commerciale di *Arthrospira* sp.

Oggi, *Arthrospira* costituisce il più importante genere di microalghe coltivato a livello industriale, grazie all'elevato valore nutrizionale, alla composizione chimica e alla sicurezza del prodotto (Sili et al., 2012). Essa è conosciuta soprattutto per il suo elevato contenuto proteico, che si aggira intorno al 60% di peso secco, e può raggiungere il 70% quando viene coltivata in condizioni non limitanti di azoto. Spirulina è anche una ricca fonte di altri composti ad alto valore aggiunto come le clorofille, carotenoidi e ficobiliproteine (Figura 1.2, (Pandey et al., 2021)).

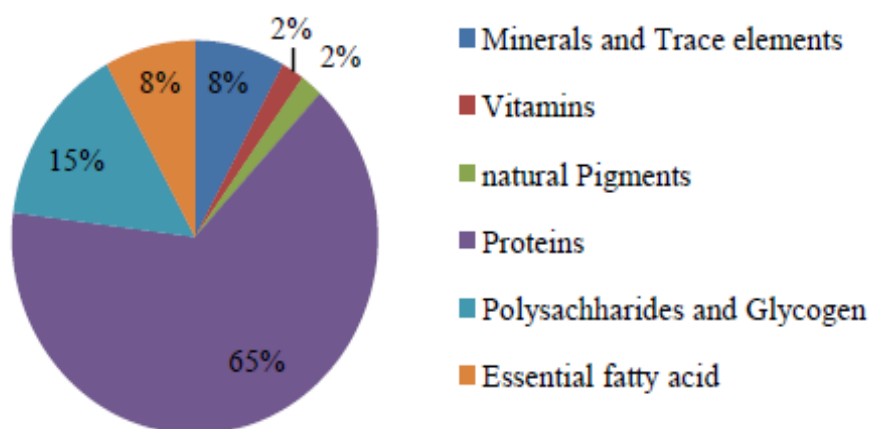


Figura 1.2: Composizione biomassa *Arthrospira* sp. (Pandey et al., 2021)

Clorofille, carotenoidi e ficobiliproteine hanno potenziali applicazioni nell'industria alimentare come pigmenti. Nonostante non siano stabili come le loro controparti sintetiche, i pigmenti derivati dalla Spirulina hanno il vantaggio di esercitare potenziali benefici per la salute al momento dell'ingestione. Ad esempio, il consumo di carotenoidi, che possiedono la provitamina A, il cui consumo è stato associato a un rafforzamento del sistema immunitario e a una riduzione del rischio di sviluppare malattie croniche degenerative, malattie cardiovascolari e alcuni tipi di tumore. *Arthrospira* sp. accumula inoltre il glicogeno all'interno della sua cellula come riserva di energia, interessante per la produzione di biocarburanti, come il bioetanolo, o di elementi costitutivi per l'industria chimica, ad esempio, produzione di acido lattico mediante fermentazione del glucosio. Spirulina accumula anche polisaccaridi più complessi all'interno delle sue cellule come il polisaccaride spirulano, composto da ramnosio, 3-O-metil-ramnosio (acofriosio), 2,3-di-O-metil-ramnosio, 3-O-metil-xilosio, acidi uronici e gruppi solfato. Questo polisaccaride è stato studiato soprattutto per la sua bioattività e ha dimostrato di possedere proprietà antivirali (Cuellar-Bermudez et al., 2023). Secondo il report di Vantage Market Reserach (<https://www.vantagemarketresearch.com/industry-report/spirulina-market-2001>), il mercato globale della Spirulina è stato valutato a 495,8 milioni di dollari nel 2021 e, in termini di fatturato, si prevede che raggiungerà un valore di 868,8 milioni di dollari entro il 2028 con un tasso di crescita annuale composto (CAGR) del 9,8% nel periodo di previsione. Sempre secondo il report, l'espansione del mercato è dovuta principalmente alla crescente conoscenza da parte dei consumatori dei molteplici benefici della Spirulina per la salute, in grado di ridurre il rischio di diverse malattie croniche, la rinite allergica, il cancro, i disturbi renali e altri (Tabella 1.2, Pandey et al., 2021).

Tabella 1.2: Effetti biologici dei componenti bio-attivi di Spirulina (Pandey et al., 2021)

Proprietà biologiche	Effetti specifici	Componenti bioattive
Anticancro	-Riparazione del DNA -Inibizione selettiva della Ciclooossigenasi -2	Polisaccaridi Ficocianina-C
Antivirali	-Contribuisce all'induzione dell'arresto della fase cellulare G1, all'apoptosi del carcinoma mammario MCF-7 mediata dalle cellule mitocondriali nell'uomo - Blocco dell'adsorbimento e della penetrazione del virus nelle cellule Vero - I Inibizione dell'attività della DNA polimerasi -Inibizione dell'effetto citofonico indotto da enterovirus 71, della formazione di placche virali e dell'apoptosi indotta da virus	-Spirulina arricchita al Selenio -Polisaccaride solfato di calcio spirulan -Sulfolipidi -Alloficocianina
Antibatteriche		-Acidi grassi, e.g. GLA
Metallo-protettive	Inibizione della perossidazione lipidica, rimozione dei radicali liberi, potenziamento dell'attività della GSH perossidasi e della superossido dismutasi.	Componenti antiossidanti
Antiossidanti	Attività chelante dei metalli, attività di <i>scavenging</i> dei radicali liberi	Carotenoidi, vitamina E, ficocianina e clorofilla
Immunostimolanti		

Spirulina, infatti, è utilizzata nell'industria farmaceutica per produrre una serie di farmaci che bloccano la replicazione dei virus. È utilizzata anche per aiutare coloro che soffrono la fame estrema durante l'assistenza umanitaria e gli scenari di conflitto militare, favorendo l'espansione del mercato. Inoltre, la crescente industria nutraceutica ha aumentato l'ampia disponibilità di Spirulina in polvere, pillole, capsule, gel e liquidi. Bisogna menzionare anche la maggior consapevolezza del consumatore verso tematiche green, dove le proteine di origine animale sono state ridotte a favore di sostituti come la Spirulina. Infine, anche il crescente utilizzo della Spirulina come biofertilizzante e mangime, per promuovere la crescita e la produttività dell'allevamento animale, è da tenere in considerazione. Negli ultimi decenni, dunque, lo sviluppo di nuove applicazioni basate sulla biomassa algale, soprattutto di Spirulina (integratori alimentari e mangimi, nutraceutici, prodotti farmaceutici, biocarburanti di terza generazione, biomateriali e servizi di biorisanamento), ha portato ad un aumento e ad una diversificazione del mercato, con un incremento del 150% del numero di nuove imprese produttrici di alghe. Attualmente in Europa sono conosciute 213 imprese produttrici di Spirulina. La maggior parte di queste imprese ha sede in Francia, con Italia e Spagna al secondo e terzo posto ma vi sono siti produttivi in 15 Paesi europei. La produzione e la lavorazione delle microalghe, però, è un processo altamente specializzato e ancora

di nicchia, per cui la sua integrazione con altre attività economiche non è attualmente una pratica comune (Vazquez & Sanchez, 2022) e sono necessarie attività di ricerca e sviluppo tecnologico.

1.2.3 Importanza del carbonio nella coltivazione di

***Arthrospira* sp.**

La coltivazione di *A. maxima* richiede specifiche condizioni, tra cui intervalli di temperatura fra 25 e 35 °C, intensità della luce non eccessivamente elevate, pH fra 9 e 11. È una specie alcalofila, ovvero necessita di elevate concentrazioni di bicarbonato nel mezzo (10-15 g L⁻¹) e cresce in un mezzo con concentrazioni di sale, somministrato come NaCl, intorno ai 10 g L⁻¹. Tipicamente, nelle colture di *Spirulina* viene anche insufflata CO₂ per favorire il processo fotosintetico e quindi raggiungere produttività più elevate. Attualmente, questi tre fattori, ovvero la concentrazione di bicarbonato, la salinità del medium e l'aggiunta della CO₂, richiedono ancora un'ottimizzazione per consentire produzioni più elevate di biomassa riducendo i costi operativi (Ravelonandro et al., 2011).

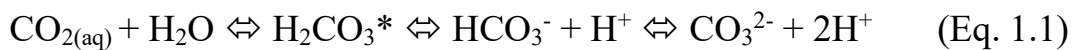
1.2.3.1 Salinità del medium

La maggior parte degli ambienti acquatici in cui *Arthrospira* sp. prospera sono costituiti da laghi salini alcalini. La salinità di tali laghi è altamente variabile e si caratterizza per la prevalenza di ioni monovalenti, con il sodio (Na⁺) significativamente più elevato del potassio (K⁺), e per concentrazioni elevate di carbonato e bicarbonato, che determinano valori di pH compresi tra 9 e 11. Si trovano concentrazioni basse di calcio (Ca²⁺) e magnesio (Mg²⁺) mentre il cloruro (Cl⁻) di solito non è presente come ione, o si trova in concentrazioni bassissime (Sili et al., 2012). *Arthrospira* sp., infatti, a differenza degli organismi marini, non richiede una concentrazione elevata di NaCl per la crescita, ma è in grado di tollerare il sale. L'esposizione del cianobatterio a concentrazioni elevate di NaCl inizialmente comporta una cessazione immediata della crescita, ma dopo un periodo di lag si può raggiungere uno stadio stazionario nuovo grazie all'adattamento dell'organismo. Il tempo di latenza è correlato al grado di stress salino imposto. In molti casi, l'adattamento è associato a una diminuzione della concentrazione di clorofilla *a* e biomassa nella coltura ed è variabile a seconda del ceppo e dello

studio. In particolare, ceppi in grado di accumulare carboidrati a discapito delle proteine riescono a tollerare concentrazioni più elevate di NaCl (Vonshak & Tomaselli, 2002).

1.2.3.2 Carbonio inorganico

Il carbonio è l'elemento principale della biomassa microalgale, pari al 50% del peso secco per *A. maxima*. Viene principalmente assorbito nella sua forma inorganica attraverso il ciclo di Calvin-Benson, catalizzato dall'ossigenasi della ribuloso-1,5-bisfosfato carbossilasi (Rubisco). Nei meccanismi di concentrazione di CO₂, la concentrazione intracellulare di CO₂ intorno alla Rubisco è elevata rispetto alla sua concentrazione extracellulare e viene utilizzata come substrato per la sua fissazione secondo l'equazione (Zuccaro et al., 2019):



La produzione di biomassa su larga scala avviene principalmente in bioreattori aperti in cui il tempo di permanenza della CO₂ in fase gassosa è insufficiente perché possa essere trattenuto in un ambiente liquido e partecipare all'equilibrio che consente alle microalghe di convertire l'anidride carbonica in biomassa (eq. 1.1). Per la coltivazione di *Arthrospira* sp., quindi, lo *sparging* di CO₂ viene maggiormente impiegato per un mantenimento del pH, essendo il mezzo già ricco di carbonio inorganico proveniente dal bicarbonato del mezzo. Infatti, quando la CO₂ viene fornita come gas, la solubilità e il *mass transfer* rappresentano un parametro critico. La solubilità della CO₂ in acqua a 25°C e 1 atm è di 1,5 g/L, ma è strettamente correlata a diversi parametri come temperatura e pressione. L'area di contatto specifica e il gradiente di concentrazione tra le due fasi (gas-liquido) influiscono sull'assorbimento del diossido di carbonio da parte del cianobatterio. Il *mass transfer* della CO₂ in soluzione è solitamente troppo basso per compensare l'assorbimento da parte delle microalghe. Per questo motivo, di solito alle colture va fornito un gas ricco di CO₂, che ha diverse dissoluzioni correlate a diversi pH (Figura 1.3, Pedersen et al., 2013). Infatti, a pH elevati, il *mass transfer* della CO₂ è più veloce rispetto a valori di pH bassi, a causa della reazione chimica di CO₂ e OH⁻, che è più rapida rispetto all'idratazione della CO₂ a H₂CO₃ (Zuccaro et al.,

2019). In particolare, la CO₂ in soluzione sarà presente in due forme diverse: HCO₃⁻ (7 < pH < 10) e CO₃²⁻ (pH > 10) (Vasumathi et al., 2012; H. Lu et al., 2019).

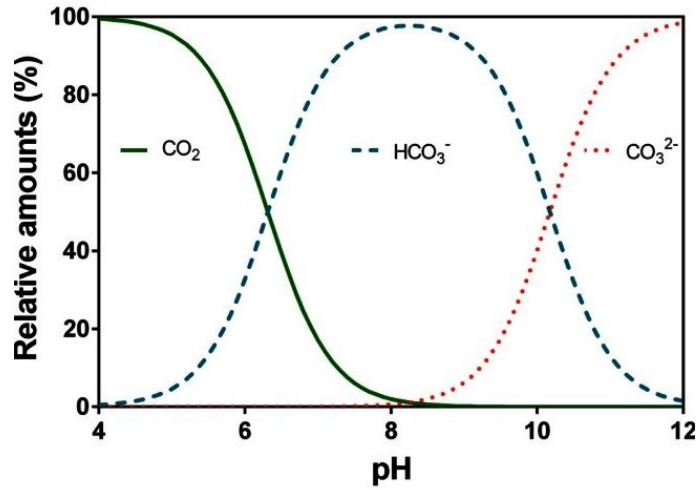


Figura 1.3: Speciazione relativa (%) di anidride carbonica (CO₂), bicarbonato e carbonato in acqua in funzione del pH. L'esempio riportato è a 20°C e conducibilità elettrica di 250 μS cm⁻¹ (Pedersen et al., 2013)



Il mass transfer della CO₂ (M_{CO2}) viene valutato come:

$$M_{\text{CO}_2} = K_L \alpha (C^*_{\text{CO}_2} - C_{\text{CO}_2}) \quad (\text{Eq. 1.4})$$

Dove K_L è il coefficiente di trasferimento di massa nella fase liquida, α è l'area di contatto, $C^*_{\text{CO}_2}$ è la concentrazione di CO₂ nella fase liquida e C_{CO_2} è la concentrazione di CO₂ nell'equilibrio di superficie, ovvero uguale alla pressione parziale nella fase gassosa (Zuccaro et al., 2019).

La scelta del sistema di distribuzione o fornitura di CO₂ dipende da un compromesso tra l'efficienza di trasferimento del gas, il costo di capitale e quello operativo. Esistono diverse tipologie di sistemi di distribuzione di CO₂, come gli scambiatori di calore a cupola in plastica, *air stones* e tubi in PVC perforati. Bisogna inoltre considerare le principali fonti di perdita della CO₂ fornita, che includono lo scambio con l'atmosfera e la precipitazione come CaCO₃, soprattutto a pH superiori

a 10.5. Un pH superiore a 10.5 non solo può limitare l'assorbimento del CO₂, ma anche provocare la precipitazione di CaCO₃ e la co-flocculazione e sedimentazione delle alghe. Inoltre, una eccessiva deposizione di detriti può contribuire all'attenuazione della luce, con un impatto sulla produttività che deve essere attentamente valutato (Belay, 2013).

1.2.3.3 Strategie di carbon capture

La fornitura di CO₂ rappresenta fino al 50% dei costi di produzione, e per risolvere questo problema la ricerca si sta attualmente spostando verso metodologie CCUS: *carbon capture utilization and storage*. Limitare l'aumento delle emissioni di anidride carbonica antropogeniche nell'ambiente è una sfida importante che il mondo affronta oggi. La CO₂ generalmente ha origine dai gas di scarico della combustione di combustibili fossili, dal biogas della digestione anaerobica, dal prodotto della gasificazione del carbone e dai flussi di gas naturale (Norhasyima & Mahlia, 2018). Un rapporto del 2019 pubblicato dal National Energy Technology Laboratory (NETL, USA) ha raccomandato un costo massimo di cattura della CO₂ di \$40/tonnellata di CO₂; tuttavia, anche i metodi di cattura della CO₂ più consolidati superano di gran lunga questa soglia di costo (Daneshvar et al., 2022). Wei et al. (2021) hanno proposto un layout globale per il CCUS a basso costo, considerando un prezzo globale medio del CO₂ di circa \$ 62,65/tonnellata di CO₂. La strategia da loro definita richiede un investimento finanziario di quasi \$ 8,20 trilioni, che, anche quando compensato dai vantaggi tradizionali del *carbon capture* (miglioramento del recupero del petrolio, EOR), comporta un costo totale di \$ 5,76 trilioni entro il 2050 (Wei et al., 2021). Tra le metodologie di *carbon capture*, la bio-CCUS mediante l'utilizzo di organismi fotosintetici è una biotecnologia promettente per ridurre drasticamente le emissioni di anidride carbonica. La novità dell'approccio risiede nella sua semplicità e nel suo potenziale di costo-efficacia; può essere adottato in una vasta gamma di zone climatiche, categorie economiche e capacità tecnologiche (Daneshvar et al., 2022).

1.3 Sistemi di produzione industriali

I principali fattori che regolano la crescita e la coltivazione delle microalghe sono luce, disponibilità di CO₂, nutrienti, parametri di processo (pH, temperatura, terreno

di coltura) e soprattutto il tipo di sistema utilizzato per la coltivazione (Ahmad et al., 2021). Le microalghe vengono coltivate principalmente in fotobioreattori (PBR) e in sistemi open pond per la produzione industriale, oppure in sistemi ibridi (Tabella 1.3), (Soni et al., 2017).

Tabella 1.3: Differenze nella produzione di Spirulina in sistemi chiusi, aperti o ibridi (Soni et al., 2017)

Fattori	Sistemi aperti (raceway o ponds)	Sistemi chiusi (fotobioreattori PBR)	Hybrid system (Open Pond + PBR)
Spazio richiesto	Alto	basso	alto
Area/volume ratio	basso (5–10 m ⁻¹)	alto (20–200 m ⁻¹)	variabile
Evaporazione	alto	Nessuna	Minima
Perdita acqua	molto alto	basso	meno
Perdita CO ₂	alto	basso	minimizzata
Temperatura	variabile	richiesto raffreddamento	controllato
Dipendenza dalle condizioni climatiche	alto	basso	basso
Controllo del processo	difficile	facile	difficile
Pulizie	facile	richiesto	difficile
Qualità della biomassa	variabile	riproducibile	migliore
Densità cellulare	medio	alto	medio
Efficienza del Harvesting	medio	alto	alto
Costo Harvesting	alto	basso	alto
Efficienza nell'utilizzo della luce	basso	buona	migliore
Parametri più costosi	Mixing	Controllo del ossigeno e della temperatura	Controllo temperatura
Controllo della contaminazione	difficile	facile	facile
Investimenti di capitale	basso	alto	basso
Produttività	basso	3–5 volte più produttivo	5–7 volte più produttivo
Stress idrodinamico su Spirulina	molto basso	basso–alto	basso

I vantaggi dei PBR includono l'applicabilità di vari design nella produzione, il facile controllo delle condizioni di crescita, la prevenzione della contaminazione biologica e l'elevata produttività. Tuttavia, essi richiedono spese elevate per gli investimenti iniziali, manutenzione ed espansione dell'impianto di produzione. I sistemi aperti possono utilizzare direttamente l'energia solare e la CO₂ presente nell'aria, sebbene abbiano una bassa produttività areale rispetto ai PBR. Altri vantaggi degli *open ponds* comprendono i materiali poco costosi per l'impianto (polivinilcloruro, materiali compositi e fibrerforzati, cemento, plastica e terreno)

e la facilità di scalabilità. Per quanto riguarda la commercializzazione, un open pond richiede un basso investimento iniziale. Ci sono ancora dei passi da fare per l'ottimizzazione dei sistemi aperti, tra cui il controllo della temperatura e dell'intensità della luce, determinata dal sito produttivo e dalla stagionalità, l'aumento della produttività areale, lo sviluppo di un terreno di coltura a basso costo e altamente efficiente e la definizione di un protocollo per la coltura e la raccolta durante tutto l'anno (Kim et al., 2018).

1.3.1 Sistemi aperti

La coltivazione di microalghe in open ponds, utilizzando l'energia ottenuta dalla luce solare, è stata considerata la strategia più utilizzata negli ultimi sessant'anni. Può essere effettuata in luoghi coperti o aperti, bacini artificiali e corpi idrici naturali come laghi e lagune (Ahmad et al., 2021). I principali vantaggi dei sistemi di coltivazione aperti sono i bassi costi e la facilità di manutenzione. I costi di gestione possono essere mantenuti bassi grazie all'utilizzo della sola luce solare come input energetico primario e l'energia necessaria per mescolare la coltura è relativamente bassa. I sistemi “*open ponds*” maggiormente impiegati nella produzione su larga scala di Spirulina sono i pond a corsie, chiamati *raceways ponds*, i corpi idrici naturali come laghi e lagune, sistemi inclinati a strato sottile *thin-layer inclined systems* e i pond circolari. Le ruote a pale vengono utilizzate in modo specifico negli stagni di grandi dimensioni per ridurre al minimo la turbolenza e per evitare un rimescolamento vigoroso che può portare a cambiamenti nella forma dei tricomi della Spirulina e alla rottura dei filamenti. Inoltre, le ruote a pale facilitano la creazione di vortici che inducono il movimento delle cellule microalgali dallo strato inferiore a quello superiore del fluido (*Figura 1.4*; Ahmad et al., 2021) (Thevarajah et al., 2022).

Sebbene i sistemi di stagni aperti siano più comunemente utilizzati per le applicazioni commerciali, ci sono diversi svantaggi da considerare: molti parametri rilevanti per la crescita, come il pH, la temperatura, il mescolamento e la disponibilità di luce, non possono essere regolati facilmente; un altro svantaggio è che la CO₂ insufflata ha un tempo di permanenza molto breve nel liquido, con conseguenti perdite elevate e scarsa solubilità; le variazioni stagionali contribuiscono ad un'elevata variazione nella produzione di biomassa; durante i

periodi caldi le perdite di acqua sono elevate a causa dell'evaporazione; esiste un rischio elevato di contaminazione, che può portare a una scarsa produttività o addirittura alla perdita totale della biomassa (Jerney & Spilling, 2020). Tuttavia, il problema delle contaminazioni è ridotto nel caso di *Arthrospira*, a causa dell'elevata alcalinità del mezzo di crescita.

1.3.1.1 Raceway ponds

In questo tipo di sistemi aperti la coltura di microalghe viene fatta ricircolare lungo il circuito. Gli open pond di tipo raceway sono realizzati con basse profondità, 15-50 cm, per migliorare l'esposizione alla luce solare e, di conseguenza, il tasso di crescita delle cellule microalgali. Inoltre, sono costruiti con due o quattro canali paralleli delle stesse dimensioni collegati da curve di 180°. La configurazione è dotata di ruote a pale per garantire il ricircolo e la miscelazione, nonché di deflettori per dirigere il flusso nelle curve. In questo modo si evita la sedimentazione delle cellule di *Spirulina* permettendo una crescita in sospensione con densità uniforme. Per ridurre le perdite di calore nei canali, i bacini di tipo *raceway* sono costruiti con un rapporto lunghezza/larghezza dell'ordine di 10-20 (Ahmad et al., 2021; Thevarajah et al., 2022).

1.3.1.2 Circular ponds

I *pond* circolari solitamente hanno una profondità di 20-30 cm e un diametro di 40-50 cm. Il movimento e la miscelazione della coltura sono assistiti da un agitatore rotante a perno centrale, ma può essere utilizzato solo fino a 10.000 m². In questo tipo di produzione spesso il CAPEX (spesa di capitale) e l'OPEX (spesa operativa) risultano troppo alti, non permettendo un'implementazione degli stagni circolari su scala commerciale (Ahmad et al., 2021).

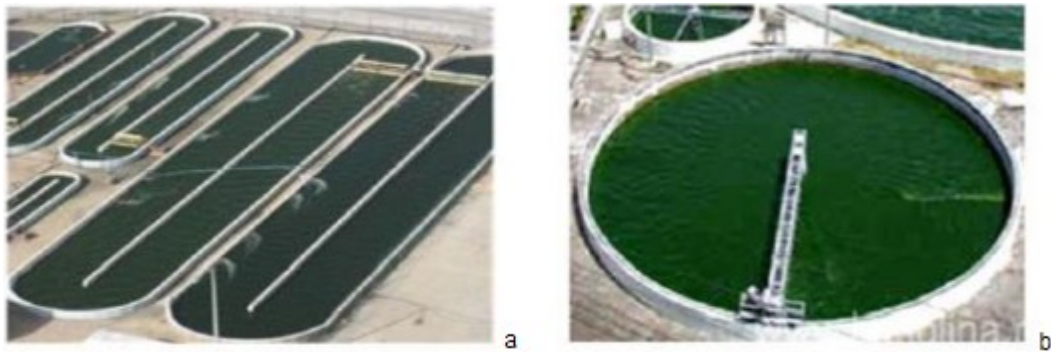


Figura 1.4: Raceway (a) e pond circolari (b) (Ahmad et al., 2021)

1.3.1.3 Thin layer systems

Si tratta di sistemi aperti con due caratteristiche uniche: la bassa profondità di coltura e il ricircolo della coltura, garantito da una pendenza dello 0,1-2,0% (Figura 1.5; Masojídek et al., 2015). Infatti, in questo tipo di sistema, la sospensione di microalghe scorre su piani con una disposizione a cascata.

Le profondità di coltura variano da 0,5 a 5,0 cm, il che consente di massimizzare l'utilizzo della luce, e il rapporto superficie/volume è compreso nell'intervallo 25-50 m⁻¹, consentendo elevate produttività areali, che possono essere superiori a 40 g m⁻² giorno⁻¹ nelle zone temperate (Ahmad et al., 2021; Lafarga et al., 2021). Attualmente, la disponibilità di questi impianti si limita esclusivamente alle dimensioni pilota (Lafarga et al., 2021).

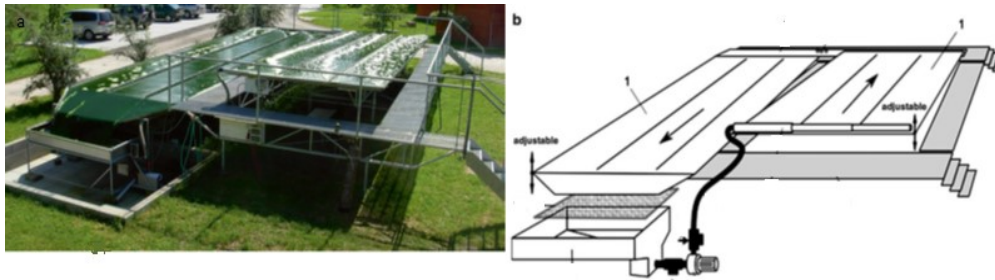


Figura 1.5: Sistema a strati sottili con rappresentazione schematica (Masojídek et al., 2015)

1.3.2 Sistemi chiusi - Fotobioreattori

Con il termine fotobioreattore si indicano sistemi chiusi, senza scambio diretto di gas e contaminanti con l'ambiente. Essi facilitano un migliore controllo degli ambienti di coltura e offrono un migliore controllo delle condizioni, quali: pH, temperatura e intensità luminosa. Riducono la perdita di anidride carbonica, evitano l'evaporazione dell'acqua e consentono di raggiungere concentrazioni cellulari più elevate, inoltre migliorano la produzione di biofarmaci complessi, per i quali sono l'unico sistema di coltura utilizzabile. Il design del PBR dovrebbe garantire una illuminazione uniforme della superficie di coltura e un rapido trasferimento di massa dell'anidride carbonica e ossigeno. Sono stati compiuti sforzi per progettare fotobioreattori a temperatura controllata, come i fotobioreattori a doppia parete illuminati internamente, con circuito di riscaldamento e raffreddamento dell'acqua

(Soni et al., 2017). Nonostante il loro elevato costo, negli ultimi trent'anni si è sviluppata una grande varietà di PBR, anche grazie ai numerosi vantaggi rispetto ai sistemi *open ponds*. Tuttavia, i PBR su larga scala attualmente in funzione producono biomassa algale per prodotti ad alto valore aggiunto, come cosmetici e nutraceutici (Jerney & Spilling, 2020). Rispetto agli open ponds, i fotobioreattori (PBR) possono raggiungere efficienza fotosintetica, produttività e concentrazione di biomassa molto più elevate. Bisogna quindi cercare di ridurre al minimo i costi capitali e i costi operativi dei fotobioreattori, così come i costi dell'energia durante l'utilizzo, puntando ad un'ottimizzazione dei processi di coltivazione industriale. L'efficienza dei PBR è determinata dall'efficienza di cattura e trasporto della luce, la sua distribuzione e l'utilizzo della luce da parte delle microalghe attraverso la fotosintesi (Zijffers et al., 2008). Le considerazioni più importanti per la progettazione che riguardano la cattura della luce sono la trasparenza dei materiali e il rapporto superficie/volume. Attualmente, i materiali comunemente utilizzati per i PBR includono vetro, plexiglass, poli-cloruro di vinile (PVC), acrilico-PVC e il più comune, il polietilene. Tutti questi materiali soddisfano i requisiti di trasparenza e sono meccanicamente adatti per la costruzione di PBR. Tuttavia, tutti hanno pro e contro che devono essere valutati caso per caso, tenendo conto anche di caratteristiche specifiche dell'alga da coltivare. La CO₂ è la fonte di carbonio per le microalghe in coltura autofototrofica e potrebbe essere un fattore limitante nel PBR se la concentrazione di CO₂ è bassa nel gas di alimentazione, o quando la miscelazione non è sufficiente. D'altra parte, un'alta concentrazione di CO₂ provocherebbe un basso pH della coltura, che potrebbe essere inibitorio, soprattutto per la coltivazione di cianobatteri come la Spirulina. Pertanto, è importante mantenere la concentrazione di CO₂ disciolto nell'intervallo ottimale (Wang et al., 2012). La capacità della superficie del materiale di prevenire la formazione di biofilm è un'altra caratteristica importante da considerare. I biofilm non solo sono difficili da pulire, ma possono anche ridurre drasticamente la trasmissione della luce attraverso il PBR (Wang et al., 2012). L'illuminazione potrebbe non essere naturale, e in generale i fotobioreattori su scala di laboratorio sono illuminati artificialmente internamente o esternamente, utilizzando lampade fluorescenti, LED o altri sistemi di illuminazione (Soni et al., 2017). I sistemi chiusi utilizzati per la coltivazione di Spirulina su larga scala comprendono fotobioreattori tubolari, fotobioreattori a

colonna e fotobioreattori flat-panel, insieme a colonne verticali (*airlift* e *bubble columns*) (Thevarajah et al., 2022). Altri tipi di fotobioreattori sono i fotobioreattori a membrana e le Poly Bags (*Figura 1.6*; Soni et al., 2017). Tra essi, i PBR a pannello piatto (FP-PBR) e i PBR tubolari (TPBR) si sono affermati come due dei tipi più promettenti di PBR per la produzione industriale di biomassa di microalga, soprattutto perché offrono ampi rapporti superficie/volume.

Culture systems		Culture systems	
Dimensions		Dimensions	
Specific growth rate		Specific growth rate	
Open systems		Tubular PBR	
Variable		D = 3–10 cm	
0.30day ⁻¹		0.055 h ⁻¹	
Vertical Column PBR		Hybrid System	
0.2 m diameter and 4 m column height		Not Specified	
0.015 ± 0.002 h ⁻¹		Poly Bags	
Flat plate PBR		D < 30 cm	
0.07 m wide, 1.5 m height, 2.5 m length		0.20day ⁻¹	
Volume 250lts			
Productivity - 1.0 g/L day			

Figura 1.6: Metodi di coltivazione chiusi (Riadattato da Soni et al., 2017)

1.3.2.1 Flat panel

I fotobioreattori *flat panel* sono generalmente più efficienti nell'utilizzo della luce solare rispetto ai fotobioreattori tubolari perché hanno una superficie più ampia, vengono quindi preferiti per la coltivazione di organismi fotosintetici, come *A. maxima* (Soni et al., 2017). La superficie totale occupata da un impianto di produzione industriale può arrivare ad essere 10 volte inferiore a quella degli altri fotobioreattori. A differenza degli altri sistemi, la coltura non è stata mescolata sull'intero reattore, ma essi sono *plug flow reactors* dove il mescolamento è a livello di singolo pannello. Questi tipi di reattore permettono un monitoraggio costante della concentrazione di anidride carbonica e ossigeno, così come il controllo del pH (Gorgich et al., 2020). Infatti, tra i vantaggi di questi reattori si trovano un'ampia superficie di illuminazione, l'essere adatti per colture all'aperto, un buon grado di mescolamento delle alghe, buona produttività di biomassa, l'essere relativamente

economici e facili da pulire. Tuttavia lo scale-up richiede molti materiali di supporto essendo effettuato aumentando il numero di pannelli, e soprattutto si ha difficoltà nel controllare la temperatura di coltura (Soni et al., 2017). Inoltre, il *self-shading* delle cellule di microalghe tra le piastre piatte può interferire con l'efficienza fotosintetica. Per ovviare a questo problema si possono utilizzare luci LED per un'illuminazione supplementare. Attualmente sono in corso continue ricerche per valutare la scalabilità della biomassa microalgale e la produttività di lipidi nei PBR a pannello piatto (Ahmad et al., 2021).

1.3.2.2 Vertical columns

Questi PBR sono economici, hanno un funzionamento semplice e un migliore controllo delle condizioni. I fotobioreattori a colonna verticale possono essere distinti in *bubble column* o *airlift reactors* in base al flusso di aereazione del reattore. I *bubble columns* sono progettati con un'altezza superiore al doppio del loro diametro, hanno caratteristiche come basso CAPEX, elevato rapporto superficie/volume, soddisfacente trasferimento di calore e massa, densità di coltura relativamente omogenea e assenza di parti mobili. Gli *airlift* invece sono progettati come un recipiente cilindrico diviso in zone interconnesse. Solitamente un tubo, chiamato *gas riser* o *up comer* viene inserito al centro del serbatoio cilindrico principale. Il *riser* permette la formazione di un flusso al interno del fotobioreattore creando una regione di risalita e una regione di reflusso. In questi PBR la miscelazione, il trasferimento di gas e l'alimentazione d'aria avvengono simultaneamente (Ahmad et al., 2021). I fotobioreattori verticali risultano molto efficienti, ed è stato riportato che possono raggiungere una concentrazione finale di biomassa e un tasso di crescita specifico comparagonabile a quello dei fotobioreattori tubolari (Soni et al., 2017).

1.3.2.3 Fotobioreattori a membrana (MPBR)

I PBR a membrana sfruttano le ampie superfici fornite dalle membrane per facilitare il trasferimento di massa gas/liquido evitando un'eccessiva turbolenza, o per separare in modo continuo i metaboliti extracellulari e consentire lunghi periodi di produzione stabile (Wang et al., 2012). Questi tipi di reattori permettono inoltre di disaccoppiare il tempo di ritenzione delle microalghe dal tasso di diluizione (D). In questi casi l'uso di MPBR serve a due scopi, cioè ad aiutare a trattenere la biomassa

all'interno del reattore (evitando il *wash-out*) e favorire il trasferimento di CO₂. I MPBR sono spesso impiegati nel trattamento delle acque reflue, infatti la membrana agisce come separatore del solido dal liquido, aiutando così a isolare le cellule microalgali dall'effluente. Inoltre, il tempo di ritenzione idraulica (HRT) e il tempo di ritenzione dei solidi (SRT) del bioreattore possono essere controllati in maniera indipendente durante la coltura e la concentrazione di biomassa microalgale non è influenzata dal carico idraulico e dalla crescita cellulare. Di conseguenza, in MPBR è possibile ottenere prestazioni migliori in termini di rimozione di nutrienti/inquinanti e di produttività della biomassa algale (Ahmad et al., 2021).

1.3.2.4 Polybags

Questo tipo di fotobioreattori sono particolarmente interessanti per la produzione su scala commerciale grazie al loro basso costo e alla buona sterilità all'avvio. È stato proposto un nuovo design di FP-PBR verticale che consiste in un sacco di plastica monouso situato tra due telai di ferro (Sierra et al., 2008), con una sostanziale riduzione dei costi di costruzione (Wang et al., 2012). Rispetto ad altri sistemi chiusi, questa tecnologia PBR presenta molti vantaggi, tra cui l'implementazione in sistemi di coltivazione differenti, la selezione del sito, il mantenimento di temperatura ottimale, materiali a basso costo, scalabilità, intensità luminosa ottimale, alta concentrazione di biomassa e basso consumo energetico. Il diametro del recipiente di coltura è inversamente correlato alla densità cellulare con un livello fisso di penetrazione della luce. Questi PBR risultano superiori in termini di produttività rispetto ai reattori in vetroresina di volume rettangolare o a vasche di plastica. Tuttavia, sono poco efficienti se confrontati con colture illuminate internamente. Inoltre, le colture in sacchi di polietilene hanno una vita relativamente breve perché la superficie interna attira rifiuti della coltura e batteri, riducendo la penetrazione della luce e aumentando la contaminazione. Un ulteriore problema della scalabilità dei processi con polybags è lo smaltimento dei rifiuti su larga scala (Soni et al., 2017).

1.3.2.5 Fotobioreattori tubulari

Il PBR tubolare è una delle configurazioni più utilizzate di fotobioreattori. In genere comprende una serie di tubi di plastica o vetro con pattern differenti (ad esempio,

dritti, piegati o a spirale). Ci sono stati numerosi studi riguardanti la configurazione PBR ottimale per la coltivazione delle microalghe (Sathinathan et al., 2023). Un esempio semplice è quello di avvolgere un singolo tubo lungo intorno a una sorgente luminosa, in modo che lo stesso punto negli strati adiacenti sia equidistante dalla sorgente luminosa (Sathinathan et al., 2023).

Il rapporto superficie/volume diminuisce con l'aumento del diametro dei tubi, quindi esso è mantenuto relativamente piccolo, generalmente 0,1 m o meno, ed è necessario per garantire un'elevata produttività della biomassa. Infatti la possibilità di aumentare il rapporto superficie/volume è il grande vantaggio dei fotobioreattori tubulari. Scegliere un diametro grande dei tubi porta il rischio di *self-shading*, con relativa diminuzione della produttività, lo scale-up infatti si ottiene solo con un numero multiplo di tubi (Wang et al., 2012). Finora sono stati riportati progetti di fotobioreattori orizzontali/serpentine, verticali, quasi orizzontali, conici e inclinati. I bioreattori orizzontali hanno un angolo migliore per la luce incidente rispetto ai reattori tubolari verticali, consentendo una raccolta della luce più efficiente. Tuttavia, ciò comporta anche la generazione di grandi quantità di calore, che richiedono sistemi di controllo della temperatura talvolta costosi (Anto et al., 2020). Ciò è particolarmente difficile in termini di scale-up, dove le grandi superfici rendono difficile il controllo della temperatura. Spesso, per mantenere una temperatura di crescita ottimale, viene incorporato nel progetto uno scambiatore di calore. Un modo per ottimizzare il PBR tubolare orizzontale è il bioreattore tubolare quasi orizzontale. Questo tipo di reattore consiste in una serie di tubi sottili collegati in basso da un collettore che fornisce gas compresso e in alto da un degasatore. I tubi sono collocati su una struttura che mantiene una certa angolazione del 6-12% (in genere 10%). In linea di principio, l'inclinazione dei tubi dovrebbe aumentare la velocità di risalita delle bolle, la ritenzione del gas e i coefficienti di trasferimento del gas. Ugwu et al., 2002, (Ugwu et al., 2002) hanno studiato l'effetto dell'inclinazione della colonna sulle caratteristiche di trasferimento del gas di un fotobioreattore tubolare quasi orizzontale, notando un aumento del coefficiente di trasferimento del gas e del tempo di *holdup* e una diminuzione del tempo di miscelazione con l'aumento dell'angolo. All'estremo, ciò porterebbe a una colonna verticale. Tuttavia, è stato suggerito che 45° sia la soluzione migliore, perché mantenere la colonna ad angoli superiori a questo comporterebbe un aumento dei

costi per i supporti strutturali. Tra gli svantaggi dei fotobioreattori tubolari sono da citare quindi l'alta temperatura, l'accumulo di O₂, la fotoinibizione, lo sparging di CO₂, il maggior consumo di energia, i costi operativi e i sistemi di controllo complessi (Vasumathi et al., 2012).

1.3.2.6 Sistemi ibridi

Alcuni sistemi con un fotobioreattore ibrido ad un sistema open pond sono utilizzati per sfruttare i vantaggi dei due diversi tipi di reattore e superare gli svantaggi dell'altro. Hanno il vantaggio di controllare meglio le variabili della coltura, di consentire una maggiore produttività riducendo il consumo energetico. Questi sistemi presentano le caratteristiche degli stagni aperti e dei PBR. Il primo può essere uno stagno all'aperto coperto da un telo per ridurre la possibilità di contaminazione, le perdite per evaporazione e il desorbimento di CO₂, mentre il PBR è pensato in modo specifico per l'applicazione desiderata. Il design è principalmente volto a ridurre i costi (Soni et al., 2017).

1.4 Modalità di produzione

I sistemi di coltivazione delle microalghe sono costituiti da reattori operanti in modalità batch, fed-batch, continua o semicontinua. Questi sistemi di coltivazione sono impiegati per fornire le condizioni fisicochimiche desiderate (nutrienti, salinità, intensità luminosa, temperatura, pH, ecc.) per la produzione di biomassa e la sintesi dei metaboliti target e può essere su scala di laboratorio, pilota o commerciale (Perez-Garcia & Bashan, 2015). La scelta di un sistema di coltivazione e di condizioni fisicochimiche adeguate per la produzione di microalghe è influenzata principalmente dal ceppo microalgale, dalla fonte di nutrienti, dal prodotto desiderato e dai costi di investimento (Liyanaarachchi et al., 2021).

1.4.1 Batch e fed-batch

Sono stati sviluppati diversi tipi di processi per ottenere un compromesso ottimale tra alta produttività e bassi costi di produzione nella coltivazione di microalghe. Tra questi vi sono sistemi di coltura batch, che sono i più applicati per la loro semplicità e flessibilità, anche se non necessariamente i più efficienti, la modalità "fed-batch", in cui il volume iniziale di coltura è inferiore rispetto alla modalità "batch". Nel processo di "fed-batch", il bioreattore viene gradualmente portato alla sua capacità

massima mediante l'aggiunta costante di terreno fresco, ampliando il tempo di coltura e ottenendo rese maggiori (M. Figueroa-Torres et al., 2022). I processi batch e fed-batch, sebbene utilizzati da diversi decenni, sono tutt'ora ostacolati da diversi fattori: le colture in batch sono affette dalla variabilità nella composizione cellulare nel tempo, poiché le cellule invecchiano e l'ambiente circostante cambia. La modalità batch è la modalità di funzionamento più semplice, economica e diffusa, ma la sua produttività è inversamente proporzionale alla lunghezza della curva di crescita, per cui il valore medio dipende dal giorno di raccolta durante la fase esponenziale o stazionaria. Pertanto, la coltivazione in batch potrebbe non essere la scelta migliore per la produzione di massa di biomassa di microalghe e cianobatteri di alta qualità. In più, nonostante la coltivazione in batch presenti un rischio di contaminazione inferiore rispetto alla coltivazione in continuo ed sia efficace nella produzione di metaboliti secondari, le operazioni di pulizia e di riempimento tra un batch e l'altro richiedono molto tempo, con ovvie conseguenze sulla produttività (Pastore et al., 2022). Inoltre, la preferenza per la coltivazione in batch è legata sia a ragioni storiche, sia al fatto che il personale richiesto per lavorare in continuo deve essere più qualificato e che le apparecchiature sono più complesse (Fernandes et al., 2015). D'altra parte, in un processo di coltivazione fed-batch, le microalghe vengono coltivate in un volume di soluzione di coltura limitato, dove il nutriente viene aggiunto periodicamente durante la fase di crescita. In questo processo, la soluzione di coltura viene mantenuta in una fase stazionaria per un certo periodo di tempo, e poi viene alimentata con una quantità limitata di nutrienti per continuare la crescita delle microalghe. Questo ciclo viene ripetuto durante l'intero processo di coltivazione, fino a quando il volume della soluzione di coltura non raggiunge un punto di saturazione. Tra i vantaggi del processo fed-batch si ha un controllo più preciso sulla crescita delle microalghe, poiché i nutrienti possono essere aggiunti in modo controllato durante la fase di crescita. Inoltre, questo processo può aumentare la densità cellulare e la produzione di biomassa rispetto al processo batch. Tuttavia, il processo fed-batch richiede attenzione nella somministrazione dei nutrienti e nel controllo delle concentrazioni di nutrienti per garantire che le microalghe crescano correttamente. In aggiunta, la produzione di biomassa potrebbe ancora essere limitata poiché il processo richiede il raggiungimento del massimo della crescita cellulare (M. Figueroa-Torres et al., 2022). Un compromesso è rappresentato da un

sistema semicontinuo, in cui una certa quantità di volume del reattore viene prelevata periodicamente per recuperare la biomassa e sostituita con un mezzo fresco. Questo riduce al minimo i tempi di riempimento e pulizia, e inoltre, una volta che la coltura si è adattata alle condizioni esterne, le prestazioni, come la qualità e la concentrazione della biomassa, sono più stabili. Tuttavia, la produttività dipende dalla frequenza della raccolta, che, in media, può essere mediamente approssimabile a un tempo di permanenza. Pertanto, applicando le conoscenze sul funzionamento dei sistemi continui, è possibile ottimizzare anche i reattori semicontinui (Pastore et al., 2022).

1.4.2 Processi in continuo

È stato riportato che la sfida principale affrontata nella coltivazione con processo batch è il tempo di attesa lungo per la raccolta e la separazione delle microalghe e cianobatteri, e anche l'alto costo operativo ogni volta che il processo viene avviato. Inoltre, a causa di fenomeni di acclimatazione, si possono avere prodotti differenti per batch differenti, con produttività relativamente bassa. Per questo motivo, una possibile alternativa al funzionamento in batch è un processo di coltivazione alimentato in modo continuo, che riduce i tempi di inattività per la coltivazione delle microalghe e porta a una produzione di qualità stabile della biomassa microalgale. Ad esempio, per produrre bioenergia (biocombustibili), la produttività della biomassa deve essere mantenuta in condizioni ottimali, con un'intensità luminosa specie dipendente e un controllo preciso della temperatura tra i 20°C e i 30°C (Peter et al., 2022). In un processo di coltivazione in continuo, invece, le microalghe vengono coltivate in un volume di soluzione di coltura più grande, dove il terreno di coltura viene continuamente alimentato in modo da mantenere una concentrazione costante di nutrienti durante la fase di crescita. In questo processo, un'aliquota di coltura microalgale viene continuamente rimossa e sostituita con nuovo terreno di coltura contenente nutrienti freschi. In questo modo, le microalghe possono continuare a crescere senza raggiungere la densità massima cellulare, con una produttività nettamente maggiore ai processi batch e fed-batch (Reichert et al., 2006). Nella prospettiva di una coltivazione su larga scala, un processo continuo sembra più adatto perché migliora notevolmente il tasso di crescita, è generalmente più efficiente, ha costi inferiori ed è più facile da gestire. Lavorare in sistemi

continui ha anche interessanti implicazioni fisiologiche, poiché le colture allo stato stazionario sono ideali per comprendere e misurare meglio i parametri di crescita specifici e analizzare l'acclimatazione delle cellule alle diverse condizioni (Barbera et al., 2019). Inoltre, da una prospettiva su larga scala, la coltivazione continua è spesso considerata più adatta per la produzione industriale di biomassa, raggiungendo una produttività da 2,5 a 5 volte superiore rispetto alla modalità batch. In questa condizione, quando si raggiunge lo stato stazionario, i valori di tutte le variabili di processo rimangono costanti, compresa la concentrazione di biomassa e substrato, rendendo possibile l'ottimizzazione delle condizioni operative. In particolare, il tasso di crescita della biomassa è controllato dal tasso di diluizione (Borella et al., 2021). Infatti, allo stato stazionario la densità e la distribuzione dimensionale delle cellule sono costanti, così come i livelli di irraggiamento, e viene prodotta una biomassa di composizione biochimica costante (Sforza et al., 2015).

Un sistema in continuo sarà quindi composto da una corrente di alimentazione, dal reattore, e da una corrente di uscita della biomassa prodotta (Figura 1.7) (Barbera et al., 2020). L'alimentazione, contenente il terreno di coltura, fornisce la portata adeguata di nutrienti in ingresso al bioreattore, mentre tramite l'uscita vengono rimossi medium e biomassa esausti, alla medesima portata dell'alimentazione in ingresso (Peter et al., 2022). Il valore della portata di terreno in ingresso determina, per un dato volume di coltura, il tempo di residenza delle cellule all'interno del bioreattore (Barbera et al., 2019):

$$\tau = V_R / Q_{in} \quad (\text{Eq. 1.5})$$

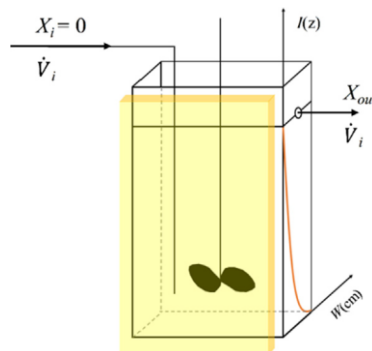


Figura 1.7: Schema semplificato di fotobioreattore flat-plate CSTR con un profilo di estinzione della luce monodimensionale (Barbera et al., 2020).

Variare il tempo di permanenza all'interno del fotobioreattore significa variare la velocità di crescita del cianobatterio, a cui l'organismo si adatta, raggiungendo diverse concentrazioni di biomassa a stato stazionario (Sforza et al., 2015). In genere è possibile individuare, a parità di altre condizioni, un tempo di permanenza al quale la produttività di biomassa è massima. L'imposizione di tempi di permanenza eccessivamente bassi provoca il *wash-out* della coltura, ovvero il suo dilavamento, in quanto la velocità di crescita dell'organismo risulta insufficiente a sopperire alla portata con cui viene estratto dal reattore.

Barbera et al. (2020) hanno dimostrato che è possibile ottimizzare la produzione di biomassa applicando un approccio modellistico finalizzato a trovare le migliori condizioni operative del PBR. In particolare, disaccoppiando il tempo di ritenzione solida (SRT) e il tempo di ritenzione idraulica (HRT) in un sistema continuo sembra essere la strategia migliore. La produttività della biomassa dipende solo dal SRT, con un massimo che dipende dalla luce incidente e dalla specie; l'impostazione dell'HRT, invece, permette di ridurre le perdite di nutrienti (Pastore et al., 2022). Nonostante il fatto che i sistemi continui producano un prodotto omogeneo, spesso non sono economicamente o tecnicamente sostenibili (Reichert et al., 2006). Infatti, essi necessitano di controlli delle variabili molto accurate per mantenere le condizioni invariate nel tempo, così come attrezzature più complesse. Inoltre, anche se le microalghe possono essere coltivate in acque non pure, come acque di scarto industriale, la coltivazione su larga scala richiede grandi volumi non sostenibili da un punto di vista ambientale (Z. Lu et al., 2020). Anche il costo dei nutrienti non è da sottovalutare, soprattutto per la coltivazione di *Arthrospira* sp. il cui terreno di crescita standard è lo Zarrouk. Sebbene questo terreno offra una produzione ottimale di biomassa, comporta costi più elevati a causa dei costosi componenti necessari per la preparazione del terreno di coltura, tra cui l'alta percentuale di bicarbonato di sodio (Ragaza et al., 2020). In uno studio condotto da Yu et al., (2019) *A. platensis* è stata coltivata in continuo in raceways all'aperto con e senza microfiltrazione del terreno utilizzato per la coltivazione. Lo studio ha dimostrato una migliore performance di produzione trattando il terreno grazie ad una diminuzione delle contaminazioni ed a un accumulo minore di esopolisaccaridi durante il periodo di coltivazione. Inoltre, la biomassa ottenuta con il medium

trattato aveva percentuali più alte di ficocianine rispetto alla biomassa non trattata (Yu et al., 2019).

1.4.3 Processi in continuo con riciclo

Secondo il life-cycle assessment della coltivazione delle microalghe riportate da Clarens et al., 2010 e Flesch et al., 2013 e Yang et al. (2011), il rapporto costo-efficacia della produzione di microalghe potrebbe essere sostanzialmente migliorato riducendo al minimo l'impronta idrica e dei nutrienti attraverso il riciclo continuo del terreno di coltura e l'utilizzo di fonti di acqua non potabile (Fon Sing et al., 2014). Infatti, secondo l'International Energy Agency, la produzione industriale annua di Spirulina è approssimativamente di 10.000 tonnellate di biomassa secca, con circa 2000 litri d'acqua necessari per chilo di biomassa. Il riciclo del terreno può ridurre il fabbisogno idrico dell'84%. Questo si traduce in una richiesta di acqua per la coltivazione di soli 320 L kg⁻¹ di biomassa secca, un valore basso rispetto alla maggior parte delle colture terrestri (Depraetere et al., 2015).

1.4.3.1 Strategie per la riduzione dei costi del medium

Gran parte della ricerca su Spirulina è incentrata sull'ottimizzazione di un terreno di coltura meno costoso. Il terreno di crescita standard utilizzato, lo Zarrouk, contiene elevate concentrazioni di carbonato/bicarbonato (>8 g L⁻¹), la maggior parte del quale non viene consumato ma serve solo a mantenere un'elevata alcalinità e per evitare contaminazioni. Il riciclo del terreno di coltura in *Arthrospira* è importante non solo per ridurre il consumo di acqua ma anche per ridurre la necessità di prodotti chimici contenuti nel terreno (Depraetere et al., 2015). Diversi studi hanno affrontato il tema della riduzione dei costi del terreno di coltura utilizzando nutrienti residui, sali provenienti da fertilizzanti commerciali e fonti di azoto a basso costo, come i sali di ammonio e l'urea (Matsudo et al., 2012). Il terreno di coltura deve essere economico, ma il tasso di crescita e la qualità della biomassa devono essere mantenuti elevati. Una delle modifiche che possono essere apportate consiste nel ridurre la concentrazione dei sali presenti nel terreno Zarrouk. Ad esempio, invece di utilizzare i sali commerciali ad alta purezza, è possibile utilizzare sali meno puri e di conseguenza meno costosi. Inoltre, possono essere utilizzati i

sali disponibili localmente, invece di quelli importati (Stunda-Zujeva, 2020). Tra le strategie principali si ha l'utilizzo di fonti di azoto più economiche, come l'urea in mixotrofia, o il nitrato di ammonio, invece del nitrato di sodio. L'urea è una fonte di azoto molto economica, ma il suo utilizzo è ostacolato nei processi batch a causa dell'idrolisi in ammoniaca in condizioni alcaline o per il rilascio di ureasi da parte delle cellule. (Matsudo et al., 2012). Nello studio di Madkour et al. Del 2012, i nutrienti del terreno di coltura di Zarrouk sono stati sostituiti con quantità uguali di fertilizzanti e prodotti chimici commerciali più economici. Il terreno a costo ridotto ha prodotto prestazioni simili in termini di biomassa secca di *Arthrospira* sp., clorofilla e composizione chimica (Madkour et al., 2012). Non esiste un'unica formula migliore per il terreno di coltura che sia adatta a tutte le specie e i ceppi di *Arthrospira* sp.. La composizione dei terreni di coltura influisce significativamente sulla crescita e sulla composizione delle microalghe, tuttavia, le varie specie e ceppi di *Spirulina* sono influenzati in modo diverso.

L'utilizzo di acque reflue o di terreni di coltura riciclati per la coltivazione può essere un modo di produzione sostenibile dal punto di vista finanziario e ambientale, soprattutto per prodotti a basso valore aggiunto come i biocarburanti. L'utilizzo di diverse fonti di acque reflue per la coltivazione è stato ampiamente studiato in modo da ridurre la richiesta di acqua dolce e di nutrienti. Alcuni studi dimostrano la fattibilità energetica di questi sistemi, anche gli ostacoli, come i contaminanti biologici nelle acque reflue e la co-localizzazione degli impianti di coltivazione con le fonti di acque reflue. Per questi motivi questo approccio non è fattibile per l'utilizzo di *A. maxima* come *food* o *feed*. Un approccio alternativo consiste nel riutilizzare l'acqua di coltivazione per ridurre i costi e l'energia associati al pompaggio dell'acqua in ingresso, all'aggiunta di nutrienti e al trattamento dell'acqua di coltivazione scaricata (Loftus & Johnson, 2017).

1.4.3.2 Riciclo del mezzo di coltura: Stato dell'arte

Riciclare il terreno, da un punto di vista di modalità operative, significa permettere la dissociazione del tempo di ritenzione solido (SRT) dal tempo di ritenzione idrico (HRT) (Barbera et al., 2020). Lo schema di un processo in continuo con riciclo si può osservare in *Figura 1.8*.

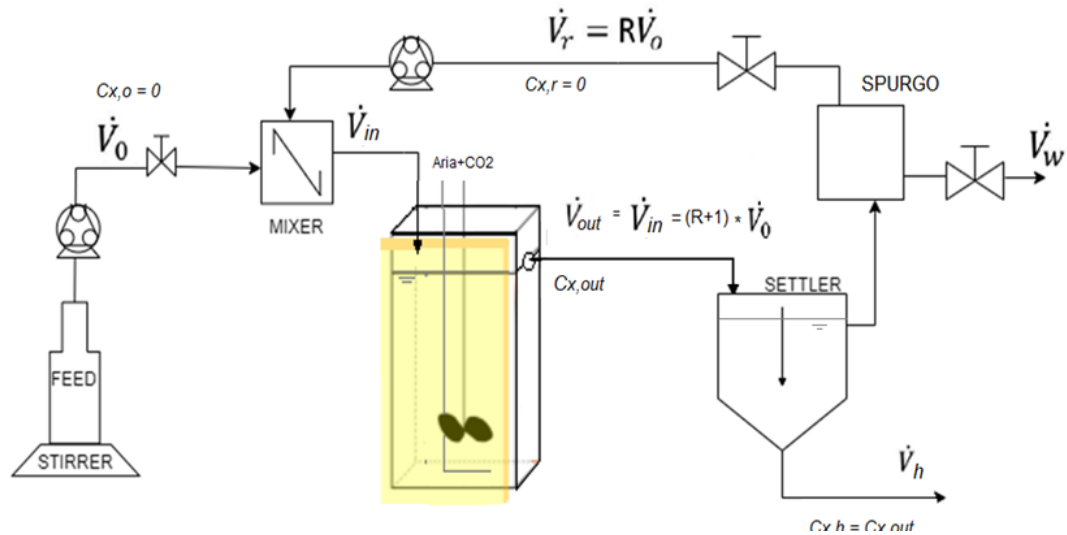


Figura 1.8: Schema processo in continuo con riciclo del medium, riadattato da Barbera et al., 2020.

Rispetto ad un sistema senza riciclo, si può notare la presenza della stream per il riciclo del mezzo, miscelato al mixer con medium fresco ad una certa portata, per permettere di impostare diversi rapporti di riciclo R . È presente un separatore, che nel caso di Spirulina può essere un sedimentatore che permette la separazione della biomassa esausta dal terreno riciclato ed uno spurgo che permette di evitare l'accumulo di sostanze dannose all'interno del fotobioreattore. Le portate in ingresso, di spurgo e di riciclo devono essere accuratamente studiate per fare in modo di minimizzare gli sprechi di acqua e nutrienti, evitando allo stesso tempo la presenza di composti tossici per la coltura d'interesse.

Gli esperimenti di crescita delle alghe in terreno esausto, o condizionato, risalgono agli anni '40, mentre esperimenti simili per applicazioni biotecnologiche sono stati riportati soprattutto negli ultimi cinque anni. Nel complesso, questi studi forniscono un'ampia gamma di osservazioni sugli effetti del terreno riciclato e dei composti extracellulari sulla crescita delle alghe. Farooq et al., (Farooq et al., 2015) hanno esaminato il tema dell'uso dell'acqua nella coltivazione delle alghe e hanno

revisionato una dozzina di studi che hanno testato la crescita delle alghe in un terreno riciclato. La revisione ha identificato i metodi di raccolta e la materia organica come fattori influenti sulla crescita in acqua riciclata, ma tutt'ora manca un'analisi quantitativa completa di molti altri studi e fattori (Loftus & Johnson, 2017). Nonostante il fatto che il riciclo del terreno di coltura possa portare ad un enorme risparmio di acqua e di sostanze chimiche, sono stati relativamente pochi gli studi che hanno analizzato la fattibilità del riciclo del terreno di coltura per *Spirulina*, spesso limitandosi a studi in batch o fed-batch. In altre specie di microalghe, alcuni studi hanno trovato che il riciclo del terreno di coltura ha avuto un effetto minimo sul rendimento delle colture di microalghe, ad esempio, *Chlorella vulgaris*, (Hadj-Romdhane et al., 2012).; *Scenedesmus sp.*, (Kim et al., 2018); *Chlorella zofingiensis*, (Zhu et al., 2013); mentre altri hanno osservato una significativa inibizione della crescita dopo ripetuti ricicli del terreno come *Nannochloropsis sp.*, (Rodolfi et al., 2003) (Depraetere et al., 2015).

In uno dei studi più recenti, condotto da Gabriel Crivellaro Gonçalves (Gonçalves et al., 2022), è stato studiato il riciclo del terreno di *A. platensis* coltivata in modalità semi-continua in mini raceway da 10 L di volume. Nello studio è stato dimostrato che è possibile mantenere colture vitali per un massimo di 3 cicli, ottenendo valori medi di carboidrati del 41,65% e una di produttività $69,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ giorno}^{-1}$, con una concentrazione di terreno Zarrouk fresco del 30% (Gonçalves et al., 2022). Sebbene il riciclo del terreno di coltura sembri conferire alcuni vantaggi, il riciclo dipende in larga misura dall'idoneità dell'acqua raccolta.

Infatti, a differenza del terreno fresco, il terreno riciclato, se non trattato, può potenzialmente trasportare e accumulare composti chimici disciolti e particelle in sospensione rimaste dopo il processo di raccolta. Ad esempio, i detriti della parete cellulare, organismi contaminanti, metaboliti secondari, esopolisaccaridi e altre sostanze chimiche potenzialmente inibitorie della crescita rilasciate dalle cellule, sono soliti contaminare l'acqua di ritorno. Se l'acqua non viene trattata prima di essere reimpressa negli stagni, questi composti chimici e queste particelle possono portare rapidamente a un aumento dell'attività batterica e al deterioramento della coltura (Fon Sing et al., 2014).

1.4.3.2.1 Materia organica disciolta nel mezzo

Il riciclo del mezzo può influenzare le prestazioni della coltura in due modi essenzialmente diversi. In primo luogo, le sostanze disciolte che vengono escrete dalle microalghe si accumulano nel terreno di coltura. Le microalghe possono espellere grandi quantità di materia organica disciolta nel mezzo. Questa materia organica può includere sostanze che inibiscono la crescita, come acidi grassi liberi specifici. Gran parte di questa materia organica è costituita da polisaccaridi, che possono influenzare le proprietà reologiche del terreno di coltura. Non solo le sostanze disciolte, ma anche i detriti cellulari particolati possono accumularsi e anche questo può influenzare le prestazioni della coltura, come è stato dimostrato per *Nannochloropsis* (Rodolfi et al., 2003). In secondo luogo, poiché la separazione della biomassa non è mai efficiente al 100%, una parte della popolazione microalgale inevitabilmente sfuggirà al filtraggio e verrà reintrodotta nella coltura quando il mezzo di coltura viene riciclato. Questa forza selettiva può portare a un'evoluzione della popolazione e ciò può influenzare le prestazioni della coltura. Uno di questi cambiamenti sarà probabilmente una diminuzione dell'efficienza di raccolta della biomassa, ma possono cambiare anche altre proprietà, tra cui la riduzione del tasso di crescita (Depraetere et al., 2015).

Nello studio di Depraetere et al. (2015), *A. platensis* è stata coltivata in *repeated-batch* con riciclo del terreno. Il riciclo del terreno di coltura ha provocato un calo del tasso di crescita e del rendimento quantico massimo della fotosintesi (F_v/F_m) rispetto alla coltura di controllo di *A. platensis* in terreno fresco. Questa diminuzione è stata accompagnata dall'accumulo di materia organica nel terreno di coltura (fino a 104 mg C L^{-1}). Questa materia organica è costituita per il 70% da zuccheri, soprattutto esopolisaccaridi ricchi di ramnosio e acidi uronici. L'accumulo di esopolisaccaridi ha comportato una diminuzione della velocità di filtrazione attraverso il microfiltro utilizzato per la separazione della biomassa. Il tasso di crescita di *Arthrospira* sp. nel terreno di coltura riciclato è stato influenzato principalmente dalla materia organica accumulata nel terreno. Inoltre anche la

composizione della biomassa di *A. platensis* è cambiata utilizzando il riciclo (Tabella 1.4) (Depraetere et al., 2015).

Tabella 1.4: (Depraetere et al., 2015) Composizione della biomassa di *Arthrospira platensis* coltivata con terreno fresco (FM) o riciclato (RM)

	RM	FM	p-value
Ash (%)	6.2 ± 2.6	4.0 ± 0.3	>0.05
Total sugars (%)	24.8 ± 3.6	7.7 ± 1.2	<0.001
Protein (%)	26.7 ± 2.6	35.8 ± 1.6	<0.05
Phycocyanin (%)	6.8 ± 2.3	15.4 ± 0.8	<0.05
Total chlorophyll (%)	0.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	<0.05
Carotenoids (%)	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	>0.05

L'uso di terreni riciclati comporta quindi spesso una perdita di produttività. Un ulteriore problema da considerare, soprattutto nel caso di riciclo nella produzione di *Arthrospira* sp., è che si deve considerare il graduale aumento dei sali inorganici (salinità) dovuto all'evaporazione, soprattutto nei sistemi di coltivazione aperti in cui si utilizza acqua salmastra o salina. Questa variazione di salinità può potenzialmente avere un impatto sulla coltura in due modi, ovvero: con una graduale dominanza di specie di microalghe più alotolleranti, e/o con una costante diminuzione della densità della microalga desiderata a causa della sua incapacità di far fronte ai cambiamenti osmotici e ai rapporti salini variabili. Un'altra sfida potenziale del riciclo del terreno con l'aumento della salinità è la precipitazione di sali di calcio, soprattutto nelle acque cariche di calcio, causando così la perdita di alcalinità e di altri minerali come ferro e fosforo (Fon Sing et al., 2014).

1.4.3.2.2 Problema della contaminazione

L'uso del terreno di coltura riciclato introduce il rischio di contaminazione biologica. Ad esempio, la coltivazione semi-continua rende le colture microalgali più suscettibili alla contaminazione con microzooplancton, che è considerato uno dei problemi critici nella produzione commerciale di microalghe su larga scala.

In uno studio di Yuan et al. (Yuan et al., 2019) è stata studiata la correlazione tra riciclo del terreno e contaminazione in una coltivazione di *A. platensis* in semi-continuo in raceways all'aperto. Sono stati condotti tre esperimenti, A. controllo, B. riciclo del terreno per un mese e C. coltivazione con terreno riciclato per 6 mesi. *A. platensis* alla fine dei tre esperimenti differiva tra i gruppi sperimentali. In

termini di morfologia, le alghe del gruppo A erano più grandi, più robuste e più elastiche, mentre le alghe dei gruppi B e C erano più piccole e meno elastiche. Inoltre, è emerso che anche se le colture di tutti i gruppi avevano una concentrazione iniziale simile (inferiore a $0,40 \text{ g L}^{-1}$), la velocità di crescita algale erano diverse tra i gruppi (Figura 1.9).

Le colture del gruppo A hanno continuato a crescere e hanno ottenuto la concentrazione più alta all'ultimo giorno dell'esperimento, mentre le colture dei gruppi B e C hanno raggiunto la DW massima (circa $0,50 \text{ g L}^{-1}$) e poi sono diminuite a $0,30 \text{ g L}^{-1}$ l'ultimo giorno. La biomassa massima del gruppo A era quasi 5 volte superiore a quella degli altri due gruppi.

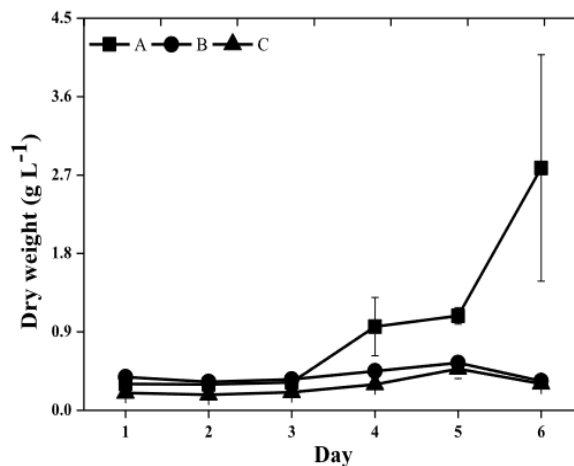


Figura 1.9: Concentrazione (DW) *A. platensis* nei gruppi A (controllo) B (riciclo per un mese) e C (riciclo per 6 mesi) (Yuan et al., 2019)

Nello studio, i fattori ambientali che hanno determinato la maggior parte delle variazioni tra le diverse condizioni di coltura sono stati il carbonio organico disciolto (DOC), l'ossigeno disciolto (DO) e il PO_4^{3-} . La composizione dei nutrienti del terreno di coltura influisce su importanti processi fisiologici e biochimici che a loro volta influenzano la produttività e la qualità del prodotto finale. Il fatto che un'elevata biomassa di *Spirulina* sia correlata a un elevato contenuto di fosforo nel gruppo A (controllo con terreno fresco) è coerente con quanto riportato da Markou e Georgakakis (Markou & Georgakakis, 2011), secondo cui il fosforo è uno dei nutrienti fondamentali richiesti dalle microalghe ed è importante per la loro crescita. L'elevata biomassa di *Spirulina* è stata associata anche a un'alta concentrazione di ossigeno disciolto (DO). Al contrario, l'elevato contenuto di DOC rilevato nei

gruppi B e C, con una minore biomassa di Spirulina, riflette una maggiore abbondanza di batteri in queste colture che utilizzano un terreno riciclato, poiché il DOC rappresenta la produzione dei batteri eterotrofi planctonici. In questo studio sono state identificate infatti tredici specie di microzooplancton attraverso l'osservazione morfologica maggiormente rappresentate nei gruppi B e C. Shimamatsu, (Shimamatsu, 2004) ha rilevato che la contaminazione è un problema comune nella produzione di massa di Spirulina in condizioni di riciclo del terreno di coltura. Tuttavia la maggior parte degli studi sulle contaminazioni si riferisce a coltivazione in *open ponds*, sistema che già di per sé presenta maggiormente questo rischio. In futuro, dovranno essere condotte ulteriori ricerche per identificare i fattori critici biologici e non biologici che influenzano la crescita della Spirulina durante la coltivazione in terreno riciclato, in modo da poter trovare una soluzione per ridurre gli effetti negativi del terreno riciclato (Yuan et al., 2019).

SCOPO DELLA TESI

Nel presente elaborato di tesi, il cianobatterio *Arthrospira maxima* viene coltivato in fotobioreattori in continuo, al fine di ottimizzare il consumo di acqua e nutrienti attraverso il riciclo del medium di crescita. L'obiettivo principale è quello di identificare il rapporto di riciclo più opportuno, andando a quantificare la produzione di composti rilasciati dalla biomassa, che potrebbero essere inibenti per la crescita, come esopolisaccaridi e proteine secrete. Si vuole quindi valutarne la concentrazione in medium riciclato e di valutare come diversi rapporti di riciclo influenzino la composizione e la produttività di biomassa di *A. maxima*. Un altro tema centrale è legato alla problematica dell'elevata concentrazione di NaHCO_3 nel mezzo di coltura: per questo motivo verranno effettuati esperimenti specifici volti alla valutazione dell'effetto del bicarbonato nel mezzo di crescita. Lo scopo finale della tesi è proporre un processo di riciclo del mezzo di coltura mirato alla riduzione del consumo di acqua e al riciclo efficiente dei nutrienti, che potrebbero portare ad una produzione economicamente più sostenibile e su larga scala di *A. maxima*.

CAPITOLO 2 – MATERIALI E METODI

In questo capitolo vengono descritte le condizioni sperimentali e le tecniche analitiche utilizzate per questo lavoro di tesi. Sono stati condotti esperimenti batch ed in continuo, a diversi tempi di permanenza e variando la concentrazione di bicarbonato, per valutare la condizione operativa migliore. Quindi, è stato messo a punto un protocollo di riciclo del terreno in modo da studiare l'effetto di diversi rapporti di riciclo sulla composizione della biomassa e sulla secrezione di composti potenzialmente inibitori della crescita.

2.1 Organismo e condizioni di coltura

Il cianobatterio filamentoso *Arthrospira maxima* SAG 49.88 (Figura 2.1) è stato coltivato in un incubatore termostato, a 30°C, utilizzando come mezzo di crescita lo Zarrouk (Raouf et al., 2006), la cui composizione di base viene mostrata in Tabella 2.1.



Figura 2.1: *A. maxima* al microscopio ottico

Tabella 2.1 Composizione base terreno Zarrouk

Component	Concentration (1x) [mg L ⁻¹]
<i>Na₂Mg EDTA</i>	1
<i>Ferric Ammonium Citrate</i>	6
<i>Citric Acid · 1H₂O</i>	6
<i>CaCl₂ · 2H₂O</i>	36
<i>MgSO₄ · 7H₂O</i>	75
K₂HPO₄	30.5
H₃BO₄	2.86
<i>MnCl₂ · 4H₂O</i>	1.8
<i>ZnSO₄ · 7H₂O</i>	0.222
<i>CuSO₄ · 5H₂O</i>	0.079
<i>CoCl₂ · 6H₂O</i>	0.05
<i>Na₂MoO₄ · 2H₂O</i>	0.391
<i>FeSO₄ · 7H₂O</i>	10
NaNO₃	1500
NaCl	5000
NaHCO₃	15000

Per gli esperimenti in batch ed in continuo (senza riciclo) il terreno è stato sterilizzato in autoclave con un ciclo di 20 minuti a 121°C. Per evitare l'aggregazione e la sedimentazione della coltura e garantire una distribuzione uniforme di luce e nutrienti, i PBR sono stati mescolati dal basso mediante agitatori magnetici.

L'intensità luminosa incidente è stata mantenuta costante durante tutti gli esperimenti, a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ed i reattori sono stati illuminati con luce LED bianca. L'intensità luminosa è stata misurata usando il fotoradiometro Delta OHM (HD 2102.1).

2.2 Sistemi di coltivazione

2.2.1 Esperimenti in Batch

2.2.1.1 Monitoraggio della composizione della biomassa e dell'accumulo di composti tossici

In una fase preliminare, *A. maxima* è stata coltivata in batch per seguire la curva di crescita del cianobatterio e la secrezione di proteine ed esopolisaccaridi nel medium in fotobioreattori simil *flat panel*, mostrati in *Figura 2.2*.

I reattori impiegati sono in policarbonato, lunghi 7 cm, alti 12 cm e spessi 4 cm per evitare l'adesione di cianobatteri alle pareti e favorire un completo mescolamento. Per garantire tale mescolamento, si è utilizza un agitatore magnetico nella parte

inferiore del reattore, oltre ad una miscela di aria e CO₂ al 5% (v/v) che gorgogliava all'interno.

La coltivazione ha avuto una durata di 12 giorni, partendo da una concentrazione iniziale di 0.1 g/L (C₀) ed un volume di 300 mL.

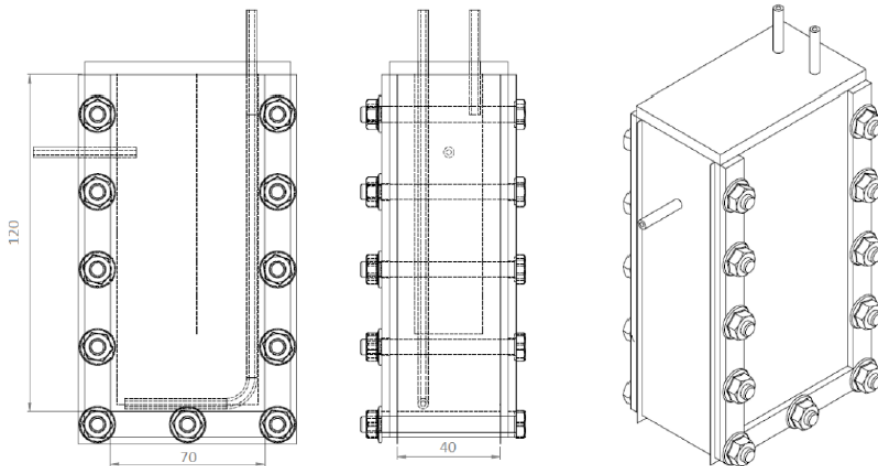


Figura 2.2: Schema di fotobioreattore utilizzato per la coltivazione batch e in continuo di *A. maxima*

2.2.1.2 Valutazione della crescita a diverse concentrazioni di bicarbonato

Al fine di valutare la possibilità di ridurre la concentrazione di bicarbonato nel mezzo, sono stati condotti esperimenti batch a diverse concentrazioni di bicarbonato. Gli esperimenti sono stati condotti all'interno di bottiglie Quickfit® Drechsel di volume pari a 250 mL e diametro di 5 cm (Figura 2.3), su un volume di 200 mL per 3 giorni, ovvero le colture sono state monitorate fino al termine della fase esponenziale di crescita.

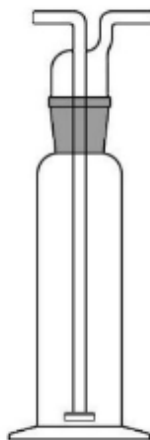


Figura 2.3: Rappresentazione di una bottiglia Quickfit®Drechsel con beccuccio per l'insufflazione di aria

La composizione del terreno mostrata in *Tabella 2.1* è stata modificata per quanto riguarda la concentrazione di bicarbonato, come riportato in *Tabella 2.2*. Inoltre, gli esperimenti sono stati svolti sia in presenza di gorgogliamento di aria con il 5% v/v di CO_2 , sia in assenza di bubbling.

I diversi esperimenti sono evidenziati in *Tabella 2.2*: In ciascuna condizione è stata calcolata la velocità di crescita μ_{max} nella fase esponenziale della curva, secondo l'equazione:

$$\ln \frac{C_{x,t}}{C_{x0}} = \mu_{max} (t - t_0) \quad (\text{Eq. 2.1})$$

Tabella 2.2: Diverse concentrazioni di bicarbonato analizzate in batch, con e senza aria

Concentrazione bicarbonato
0 g L ⁻¹ NaHCO ₃
100 mg L ⁻¹ NaHCO ₃
0,5 g L ⁻¹ NaHCO ₃
1 g L ⁻¹ NaHCO ₃
2 g L ⁻¹ NaHCO ₃
3,75 g L ⁻¹ NaHCO ₃
11 g L ⁻¹ NaHCO ₃
30 g L ⁻¹ NaHCO ₃

Il parametro cinetico μ_{max} viene calcolato durante la fase esponenziale, interpolando il logaritmo del peso secco. I valori di velocità di crescita così ottenuti sperimentalmente, sono stati rielaborati al fine di individuare una *half saturation constant* (K_m) del bicarbonato per *A. maxima*. In particolare, il profilo di μ_{max} ottenuto in funzione della concentrazione di bicarbonato nel mezzo, è stato fittato con una cinetica di Michaelis-Menten tramite il solver di Excel.

2.2.2 Esperimenti in Continuo

Il fotobioreattore descritto al paragrafo 2.2.2.1 (*Figura 2.2*) è stato utilizzato per gli esperimenti in continuo. Il sistema può essere approssimato ad uno CSTR (*Continuous-flow Stirred-Tank Reactor*) dove il tempo di permanenza del solido

eguaglia il tempo di permanenza del liquido ($HRT=SRT$). Per garantire un ambiente non limitante di crescita e mostrare solo cambiamenti dovuti alle diverse impostazioni operative, gli esperimenti sono stati condotti utilizzando una concentrazione di nutrienti in eccesso. In particolare, il terreno Zarrouk 2x (che presenta una concentrazione doppia rispetto allo Zarrouk base mostrato in *Tabella 2.1*).

Lo schema del funzionamento in continuo viene proposto in *Figura 2.4*. Il terreno in ingresso viene introdotto mediante una pompa peristaltica e tubi dal diametro noto. L'entrata dei nutrienti è stata posta al di sopra del livello della coltura, per evitare che venisse bloccata dal cianobatterio in crescita, ed è situato sul lato opposto rispetto al tubo d'uscita.

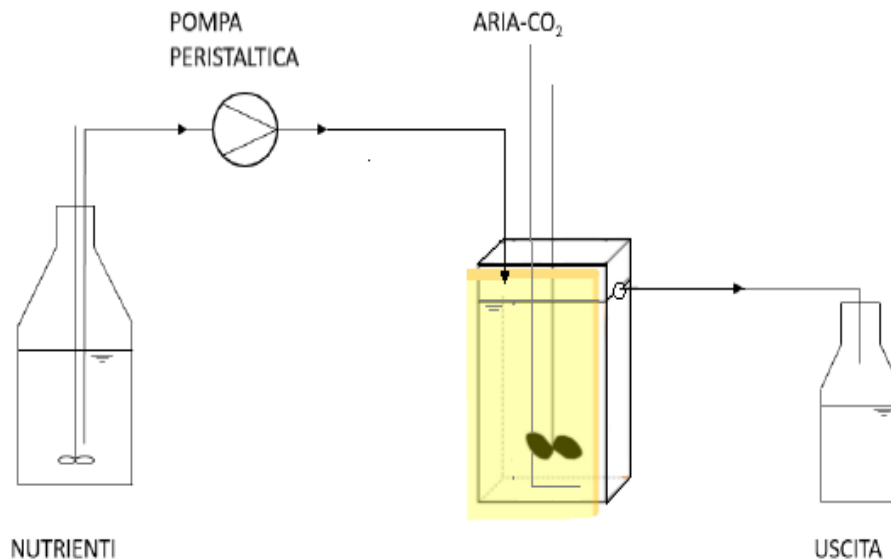


Figura 2.4: Schema funzionamento fotobioreattore in continuo, riadattato da Borella,2017

È presente un setto per impedire che i nutrienti vengano cortocircuitati rapidamente all'uscita a seguito di moti traslazionali dovuti al mescolamento. L'uscita rappresenta un "troppo pieno", e serve a mantenere costante il volume del fotobioreattore (V_r), fissato a 350 mL, prelevando al contempo la biomassa prodotta e il medium esausto. L'aria, invece, viene iniettata vicino all'agitatore magnetico. Lavorando in continuo la coltura viene continuamente diluita con nuovo terreno, mantenendo la concentrazione cellulare costante nel PBR una volta raggiunto lo stato stazionario. Il sistema è costruito in modo che terreno fresco, sterile, venga immesso nel reattore alla stessa velocità con cui viene rimosso ($\dot{V} in = \dot{V} out = \dot{V}$),

semplicemente regolando la portata ($L h^{-1}$) della pompa peristaltica (Watson-Marlow 205s).

In questo sistema, allo stato stazionario e con concentrazione di biomassa in ingresso nulla il bilancio di materia riferito alla biomassa ($g L^{-1}$) viene espressa nell'equazione 2.2:

$$0 = - C_{X,out} + r_x \cdot \tau \quad (\text{Eq. 2.2})$$

$C_{X,out}$ è la concentrazione di biomassa in uscita dal reattore, ed è uguale alla concentrazione di biomassa nel CSTR, mentre r_x è il tasso di crescita netto della biomassa ($g L^{-1} d^{-1}$) e può essere descritto come una funzione dell'intensità luminosa e della temperatura, secondo un modello cinetico simile a quello di Monod, in assenza di limitazione dei nutrienti (Borella et al., 2021):

$$r_x = \mu_{max} \cdot f(I) \cdot f(C_C) \cdot f(T) \cdot f(C_N) \cdot C_x = \mu C_x \quad (\text{Eq. 2.3})$$

dove si tiene conto della dipendenza da carbonio (C_C), luce (I), azoto (C_N) e temperatura (T). Tuttavia, allo stato stazionario, senza limitazione dei nutrienti e a luce e temperatura fisse, il bilancio di materia può essere riscritto come funzione del tasso di crescita medio della biomassa ($\tau = 1/\mu$, d^{-1}), che tiene conto dei processi di crescita e del fabbisogno di mantenimento (Borella et al., 2021).

Dunque, la produttività volumetrica ($g L^{-1} d^{-1}$) del PBR è espressa come nell'equazione 2.4:

$$P_{x,v} = C_{x,out} / \tau \quad (\text{Eq. 2.4})$$

Questo sistema è stato utilizzato per studiare l'effetto delle seguenti variabili operative sulla crescita di *A. maxima*:

- il tempo di permanenza del fotobioreattore, variato come mostrato in *Tabella 2.3*. Il fine è quello di valutare composizione e produttività di biomassa, consumo di nutrienti e rilascio di eventuali composti

potenzialmente tossici nel medium in uscita. Questi esperimenti sono stati considerati come riferimento per il sistema con riciclo.

Tabella 2.3: Portate in ingresso e tempi di permanenza utilizzati nei reattori in continuo.

τ (d)	Q (ml d ⁻¹)
1.2	0.292
2	0.175
3	0.116

- l'effetto di diverse concentrazioni di NaHCO₃ sulla coltura di *A. maxima* mantenendo tutte le altre variabili operative costanti (τ (d) 1.2; T 30°C; I luminosa 100 μ mol m⁻² s⁻¹). Le diverse concentrazioni di bicarbonato analizzate vengono riassunte in *Tabella 2.4*. Il pH è stato mantenuto in un range dal 8-11 grazie all'insufflazione nella coltura di aria con il 5% v/v di CO₂, ed è stato misurato utilizzando il pHmetro Hanna (codice HI 9124).

Tabella 2.4: Concentrazione di bicarbonato in ingresso

I 100 μ mol m ⁻² s ⁻¹ τ 1,2 gg T 30°C	NaHCO ₃ g L ⁻¹
	6
	15
	30
	45
	60

- Gorgogliamento di aria. *Arthrospira* è un organismo alcalofitico e una elevata concentrazione di bicarbonato è necessaria per il mantenimento di un pH ottimale per la sua crescita (Ismail et al., 2016), ma una minimizzazione del suo apporto è auspicabile per ridurre i costi del mezzo. Mantenendo costante la concentrazione di bicarbonato a 6 gL⁻¹ sono stati condotti esperimenti in continuo con la miscela aria e CO₂ (5% v/v), con aria compressa e senza aria. Gli stessi esperimenti sono stati condotti a 30 gL⁻¹. Sono state mantenute costanti le altre variabili operative (τ (d) 1.2; T 30°C; I luminosa 100 μ mol m⁻² s⁻¹), monitorando il pH, la concentrazione di biomassa e la concentrazione di carbonato/bicarbonato in soluzione tramite

titolazione (paragrafo 2.3.6). È stato anche valutato il mass transfer nei reattori utilizzati per valutare l'accumulo di ossigeno secondo l'equazione:

$$C_{O_2,t} = C_{O_2,in} * e^{-kla \Delta t} \quad (\text{Eq. 2.5})$$

2.2.3 Continuo con riciclo del mezzo (HRT > SRT)

Il continuo con riciclo del mezzo in uscita è stato effettuato dopo la separazione della biomassa dall'acqua e nutrienti residui. La separazione è stata effettuata tramite filtrazione sottovuoto utilizzando una *spinner flask* modificata.

Lo schema del riciclo viene riproposto in *Figura 2.5*.

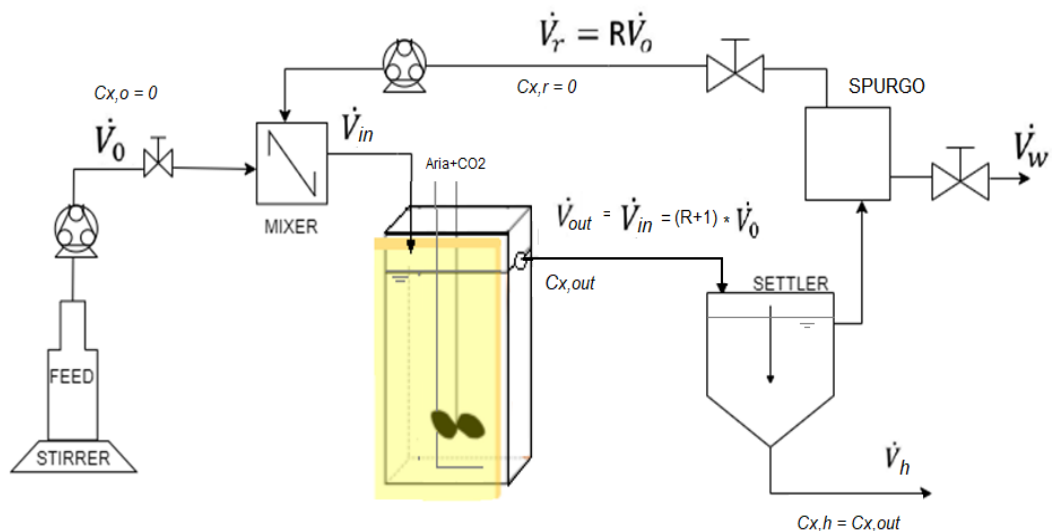


Figura 2.5: Schema processo in continuo con riciclo del medium, riadattato da Barbera et al., 2020.

A differenza del continuo senza riciclo, dove tempo di ritenzione solido è uguale al tempo di ritenzione idrico, nel caso del riciclo le due variabili operative sono modulabili separatamente, come si può vedere dall'equazione 2.6 (Barbera et al., 2020):

$$\text{HRT} = \text{SRT} (1 + R) \quad (\text{Eq. 2.6})$$

R è il rapporto di riciclo, calcolato come rapporto tra la portata volumetrica del riciclo (\dot{V}_r) e la portata volumetrica del terreno fresco (\dot{V}_0):

$$R = \frac{\dot{V}_0}{\dot{V}_r} \quad (\text{Eq. 2.7})$$

La portata di spurgo (\dot{V}_w) sarà uguale alla portata volumetrica del terreno fresco in ingresso anche se bisognerebbe tenere conto anche dell'umidità che si perde con la biomassa in uscita \dot{V}_h . La perdita legata all'umidità (\dot{V}_h), trascurabile in un sistema di laboratorio, diventa rilevante quando si opera con grandi volumi. Essendo legata alla biomassa in uscita da reattore, l'umidità persa con la biomassa in uscita può essere ricavata a partire dalla portata di biomassa in uscita:

$$P_{x,v} (\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}) / V_R (\text{L}) = \text{g d}^{-1}. \quad (\text{Eq. 2.8})$$

Stimando successivamente un 90% di umidità nella biomassa.

La portata in ingresso al PBR dipende quindi dalla possibile l'impostazione di diversi rapporti di riciclo, dalla perdita per umidità (tralasciata nel sistema da laboratorio utilizzato) e dalla portata di spurgo:

$$\dot{V}_{in} = \dot{V}_w + \dot{V}_h + \dot{V}_r \quad (\text{Eq. 2.9})$$

I diversi rapporti di riciclo utilizzati sono riassunti in *Tabella 2.5*:

Tabella 2.5: Diverse percentuali di riciclo analizzate

I 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ \dot{V}_{in} = 1,2 giorni T 30°C	Riciclo del 75%
	Riciclo del 85%
	Riciclo del 90%
	Riciclo del 95%

Nel sistema utilizzato nel presente lavoro di tesi la biomassa non viene riciclata, quindi $C_{x,r}=0$. Tuttavia eventuali composti rilasciati nel mezzo ($C_{x,i}$), come esopolisaccaridi o proteine secrete non vengono completamente trattenuti sul filtro di separazione passando nel mezzo di riciclo e il loro accumulo sarà dipendente dal rapporto di riciclo. I bilanci verranno quindi impostati sia per la biomassa sia per l'accumulo di esopolisaccaridi.

I bilanci per la biomassa (C_x) vanno così distinti nei diversi blocchi di processo:

$$- \text{ Al mixer: } \frac{dC_x}{dt} = R \dot{V}_0 C_{xr} + \dot{V}_0 C_{x0} - \dot{V}_{in} C_{xin} \quad (\text{Eq. 2.10})$$

$$- \text{ Al reattore: } \frac{dC_x}{dt} = C_{x,in} \dot{V}_{in} - C_{x,out} \dot{V}_{out} + r_x V R \quad (\text{Eq. 2.11})$$

$$- \text{ Al sedimentatore: } \frac{dC_x}{dt} = C_{x,out} \dot{V}_{out} - C_{x,h} \dot{V}_h - C_{x,r} R \dot{V}_0 \quad (\text{Eq. 2.12})$$

$$- \text{ Allo spurgo: } \frac{dC_x}{dt} = C_{x,r} R \dot{V}_0 - C_{x,w} \dot{V}_w \quad (\text{Eq. 2.13})$$

I bilanci per gli EPS seguono lo stesso principio,

$$- \text{ Al mixer: } \frac{dC_{eps}}{dt} = C_{x,in} \dot{V}_{in} - C_{x,out} \dot{V}_{out} + C_{eps,r} R \dot{V}_0 \quad (\text{Eq. 2.14})$$

$$- \text{ Al reattore: } \frac{dC_{eps}}{dt} = C_{eps,in} \dot{V}_{in} - C_{eps,out} \dot{V}_{out} + Y_{EPS/X} * r_x V R \quad (\text{Eq. 2.15})$$

$$- \text{ Al sedimentatore: } \frac{dC_{eps}}{dt} = C_{eps,out} \dot{V}_{out} - C_{eps,h} \dot{V}_h - C_{eps,r} R \dot{V}_0 \quad (\text{Eq. 2.16})$$

$$\text{Allo spurgo: } \frac{dC_{eps}}{dt} = C_{eps,r} R \dot{V}_0 - C_{x,w} \dot{V}_w \quad (\text{Eq. 2.17})$$

2.3 Monitoraggio della concentrazione cellulare

2.3.1 Peso secco

Il peso secco (DW) della coltura di *A. maxima* viene utilizzato per conoscere la concentrazione cellulare in termini di grammi per litro e rappresenta il peso della biomassa in relazione a un volume noto. Per calcolare il peso secco, innanzitutto bisogna preparare un filtro di nitrocellulosa Whatman® con pori di 0,45 μm e porlo in forno a 105°C per 10 minuti per eliminare l'umidità presente. Il filtro si pesa su una bilancia di precisione per determinare la tara. Esso viene utilizzato per la filtrazione sottovuoto usando un imbuto Buchner in acciaio connesso ad una beuta a vuoto. Per la filtrazione si usa un volume noto di campione separando la biomassa, che rimarrà sul filtro, dal surnatante. Si secca il filtro con la biomassa raccolta a 105°C per almeno 2 ore. Infine, si pesa nuovamente il filtro con la biomassa secca per determinare il peso lordo. La concentrazione cellulare in peso secco del campione filtrato può essere calcolata utilizzando l'equazione 2.18:

$$DW \text{ (g/L)} = (\text{peso lordo (g)} - \text{tara (g)}) / \text{volume del filtrato (L)} \text{ (Eq. 2.18)}$$

dove il peso lordo è il peso del filtro con la biomassa secca, la tara è il peso del filtro vuoto e il volume del filtrato è il volume noto di campione filtrato.

2.4 Misure analitiche

Le misure analitiche sono state utilizzate al fine di monitorare la composizione della biomassa, il consumo dei nutrienti e il rilascio di composti inibitori nel mezzo di coltura. Durante il test in batch i diversi parametri sono stati misurati giornalmente, mentre per gli esperimenti in continuo le stesse analisi sono state eseguite in almeno 4 punti sperimentali per ogni stato stazionario e durante il corso dell'esperimento per i continui con riciclo.

2.4.1 Nitrati

Per quantificare i nitrati in soluzione si utilizza un saggio colorimetrico con il kit commerciale Hydrocheck Spectratest (codice 6223) che ha una sensibilità di 5-100 ppm di NO_3^- . Il procedimento è il seguente: si aggiunge un cucchiaino di reagente in polvere a 1.5 mL di campione. I nitrati presenti nel campione vengono ridotti a nitriti e questi reagiscono con l'acido sulfanilico per formare un sale diazonio. Il sale diazonio reagisce con l'acido 5-idrossisalicilico, conferendo alla soluzione un colore giallo-bruno. La reazione richiede 10 minuti di incubazione, dopodiché l'assorbanza del campione viene letta allo spettrofotometro a λ 445 nm.

La concentrazione di nitrati viene ricavata dall'interpolazione dell'assorbanza nella retta di taratura (*Figura 2.6*) che è stata costruita con soluzioni a concentrazione nota di NO_3^- . L'equazione per calcolare la concentrazione di nitrati è la seguente:

$$\text{NO}_3^- \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 89.474 \times \text{abs} - 0.0793 \quad \text{(Eq. 2.19)}$$

dove abs è l'assorbanza del campione misurata allo spettrofotometro e 89.474 e 0.0793 sono costanti della retta di taratura. Il coefficiente di determinazione (R^2) della retta di taratura è 0.9975. Il campione da analizzare può essere opportunamente diluito, affinché rientri nel range della retta di taratura.

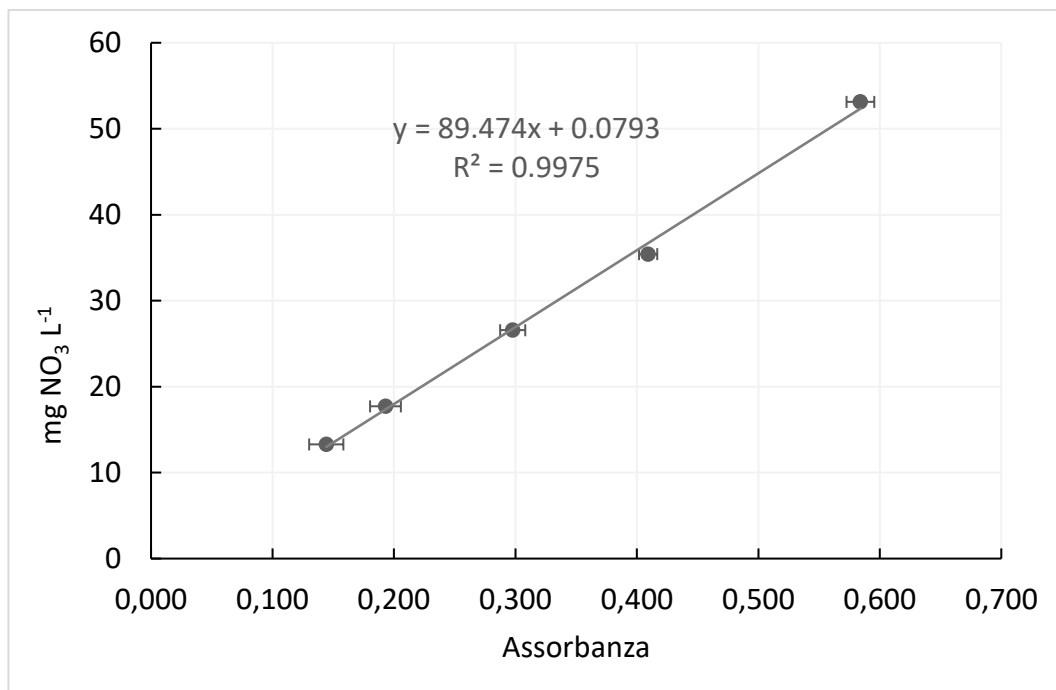


Figura 2.6: Retta di taratura per l'analisi dei nitrati

2.4.2 Ortofosfati

L'analisi del contenuto di ortofosfati (PO_4^{3-}) è un saggio colorimetrico descritto da Innamorati et al., in Nova Thalassia vol.11 (1990). La reazione si basa sull'utilizzo di un reagente composto da acido solforico 5N (H_2SO_4 , 2.5 M), antimonio potassio tartrato (1.36 g L^{-1}), ammonio molibdato tetraidrato (30 g L^{-1}) e acido ascorbico (54 g L^{-1}), che viene preparato poco prima dell'utilizzo. La reazione richiede $400 \mu\text{L}$ di reagente e 2 mL di campione, e comporta la formazione di un complesso blu di molibdato che rivela la presenza di ioni fosfato nel campione. La concentrazione del campione viene poi misurata tramite lettura allo spettrofotometro a una lunghezza d'onda di 705 nm, alla quale il complesso fosfomolibdico assorbe. La concentrazione del campione viene ottenuta per interpolazione, sfruttando la retta di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazione nota di fosfati (Figura 2.7):

$$PO_4^{3-} (\text{mg L}^{-1}) = 7.5905 \cdot \text{abs} - 0.012 \quad R^2 = 0.997 \quad (\text{Eq. 2.20})$$

Se la concentrazione del campione è troppo alta per essere letta dalla retta di taratura, può essere opportunamente diluita.

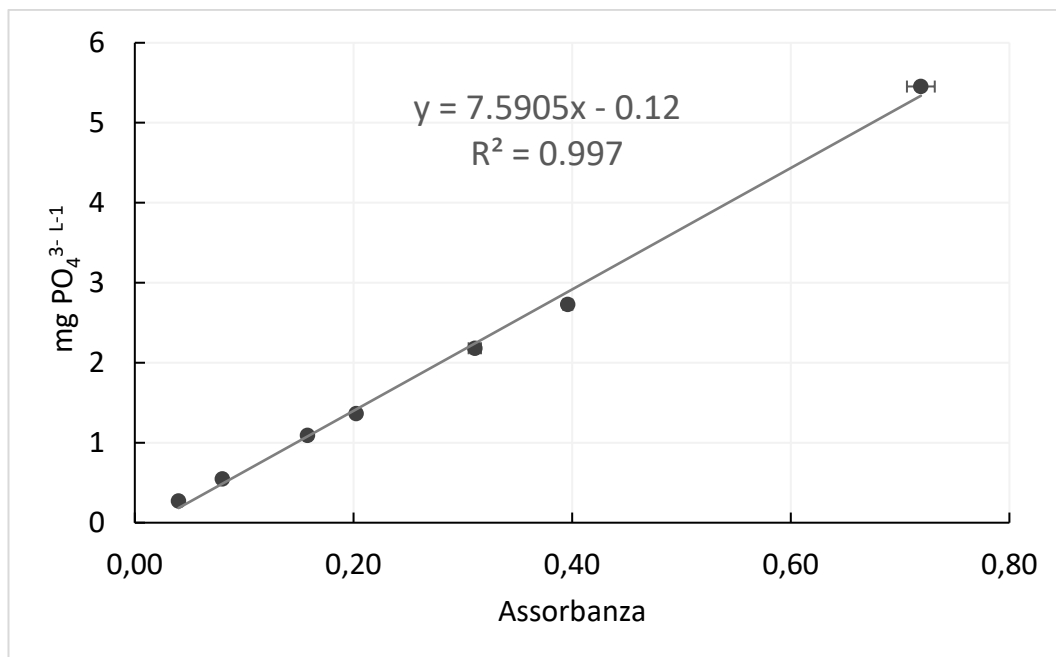


Figura 2.7: Retta di taratura utilizzata per l'analisi degli ortofosfati

2.4.3 Carboidrati

L'analisi del contenuto di carboidrati si basa sul metodo dell'anthrone, che utilizza un reagente composto da 2 g L⁻¹ di anthrone in polvere disciolto in una soluzione di acido solforico H₂SO₄ (71% v/v) e acqua deionizzata (29% v/v). Quando i carboidrati sono idrolizzati a monosaccaridi dalla presenza di acido ad alte temperature, questi subiscono una deidratazione che produce 5-idrossimetil furfurale. Questo composto reagisce con l'anthranolo, tautomero attivo dell'anthrone, formando un complesso che dà alla soluzione una colorazione blu-verde. Per eseguire l'analisi, si aggiungono 900 μL di reagente a 100 μL di campione e la soluzione risultante viene mantenuta a 100°C per 10 minuti. Dopo il raffreddamento del campione, si misura l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 625 nm. La concentrazione di carboidrati viene calcolata utilizzando una retta di taratura ottenuta da soluzioni di glucosio a concentrazioni note (Figura 2.8):

$$C_6H_{12}O_6 (g L^{-1}) = 0.204 \cdot abs + 0.0132 \quad R^2 = 0.9967 \quad (\text{Eq. 2.21})$$

Prima dell'analisi, i campioni vengono diluiti in modo appropriato per rientrare nel range della retta di calibrazione, la cui equazione è nota.

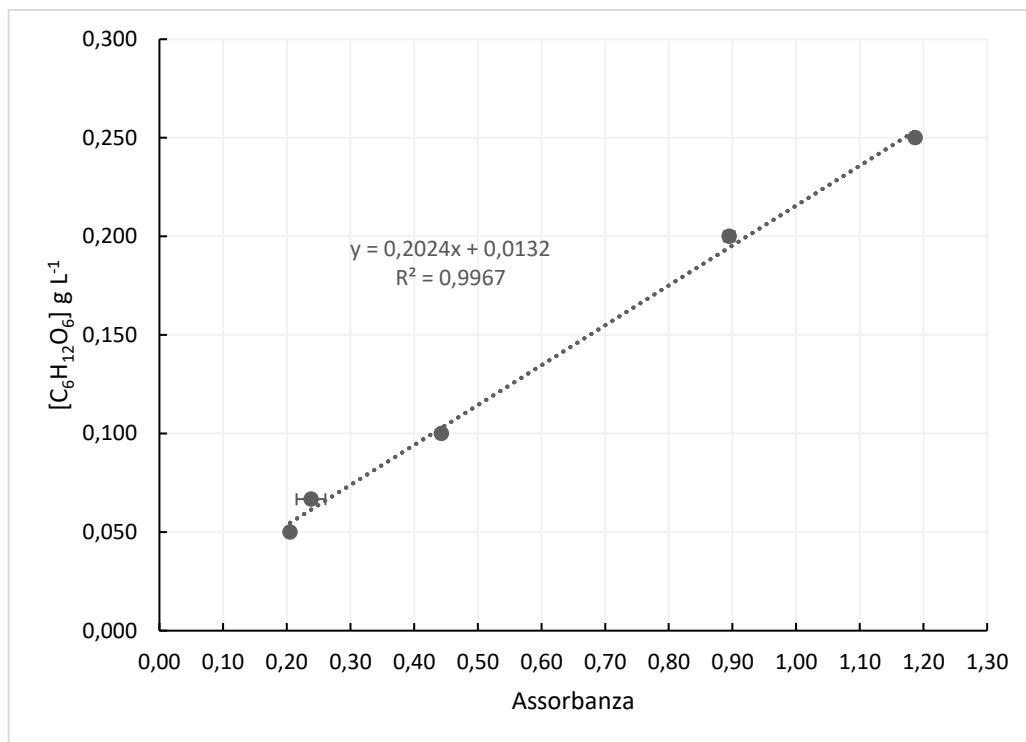


Figura 2.8: Retta di taratura utilizzata per l'analisi di carboidrati

2.4.4 Esopolisaccaridi

Per quantificare gli esopolisaccaridi (EPS), si segue il protocollo di Dubois et al. (1951), che utilizza un reagente composto da fenolo (5% v/v) e acido solforico (95-98%). L'acido solforico, ad alte temperature, idrolizza i polisaccaridi formando monosaccaridi che, a seguito di deidratazione, generano 5-idrossimetil furfurale. Questo composto intermedio reagisce con il fenolo producendo un composto che assorbe alla lunghezza d'onda di 488 nm. Per l'analisi, si prelevano 2 mL di campione, che vengono centrifugati a 1.800 rpm per 25 minuti. Si prendono 200 μ L del surnatante e si aggiunge il reagente (200 μ L di fenolo e 1 mL di acido solforico). Dopo una reazione di 10 minuti a temperatura ambiente e un' ulteriore incubazione a 30°C per 15 minuti, si ottiene una soluzione giallo-verde che viene letta allo spettrofotometro a 488 nm. La concentrazione di EPS viene calcolata utilizzando una retta di taratura ottenuta con concentrazioni note di glucosio (*Figura 2.9*):

$$C_6H_{12}O_6 (\mu g mL^{-1}) = 125,87 \cdot abs + 9,9662 \quad R^2=0,9886 \quad (\text{Eq. 2.22})$$

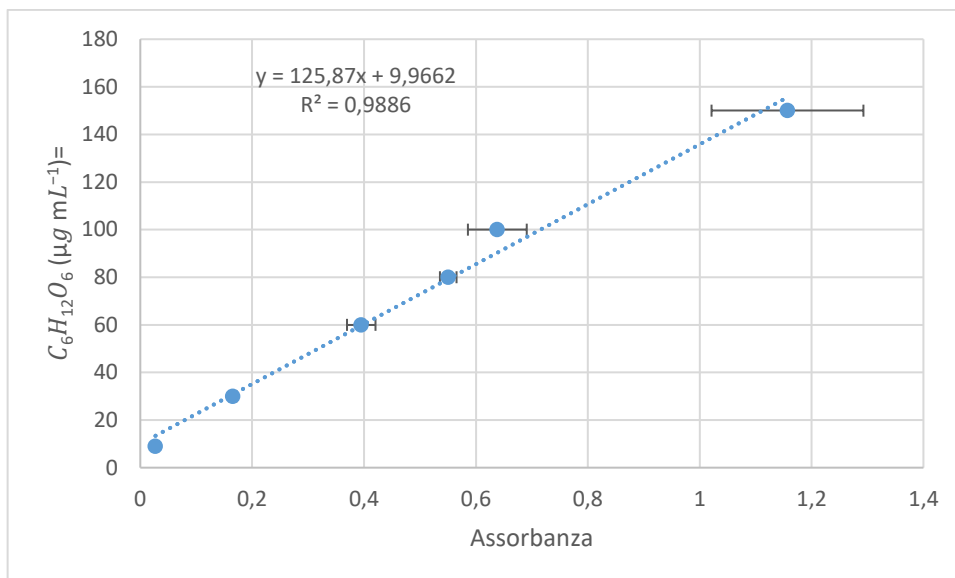


Figura 2.9: Retta di taratura utilizzata per l'analisi degli Esopolisaccaridi

2.4.5 Proteine esterne

Un volume di 2 mL di biomassa viene sottoposto a centrifugazione a 13.500 rpm per 10 minuti al fine di ottenere il surnatante contenente le proteine esterne, con la rimozione del pellet. La quantificazione delle suddette proteine viene eseguita utilizzando il saggio BCA descritto da Smith et al. (1985). In particolare, 50 μL di surnatante vengono mescolati con 1 mL di reagente BCA e la reazione avviene attraverso la riduzione degli ioni rameici (Cu^{2+}) a rameosi (Cu^{+}) da parte di proteine e peptidi, in ambiente basico. I rameosi così formati reagiscono con l'acido bicinconinico, producendo un composto porpora. Dopo 30 minuti a 37 °C, l'assorbanza della soluzione viene misurata alla lunghezza d'onda di 562 nm, la quale presenta il massimo di assorbimento dell'addotto tra BCA e rameosi. La concentrazione di proteine viene ottenuta tramite l'utilizzo di una retta di taratura ottenuta mediante soluzioni a concentrazione nota di albumina di siero bovina (BSA), mostrata in *Figura 2.10*:

$$BSA (\mu g mL^{-1}) = 1144,2 \cdot abs - 85,12 \quad R^2=0,998 \quad (\text{Eq. 2.23})$$

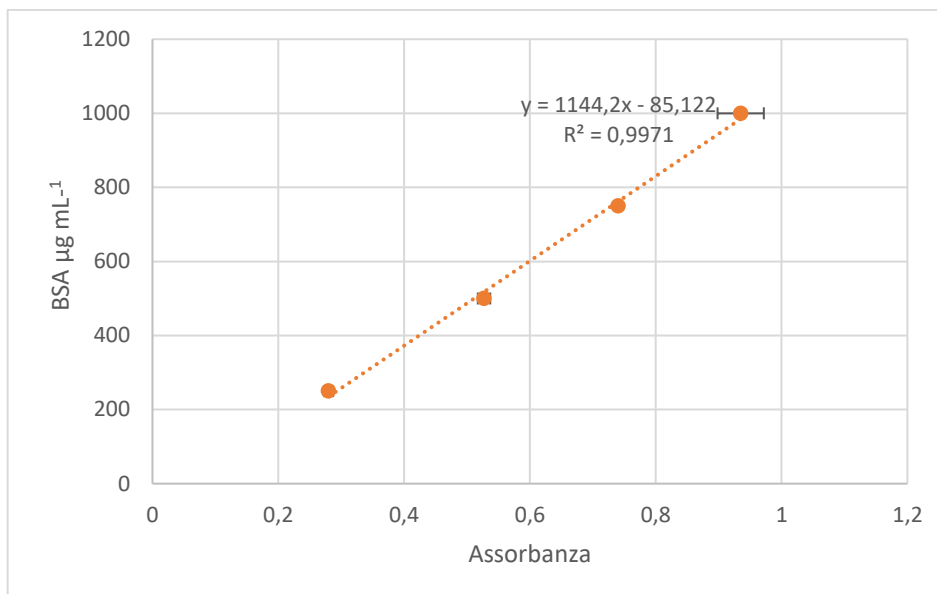


Figura 2.10: Retta di taratura utilizzata per la quantificazione delle proteine esterne

2.4.6 Titolazioni

Le titolazioni sono state usate per determinare le concentrazioni di CO_3^{2-} e HCO_3^- (g L^{-1}) in soluzione negli esperimenti in continuo a 30 g L^{-1} e 6 g L^{-1} di NaHCO_3 con o senza gorgogliamento dell'aria con 5% v/v di CO_2 .

Le titolazioni acido-base coinvolgono una reazione tra un acido e una base, e il punto di equivalenza viene solitamente determinato utilizzando indicatori cromatici di pH. Questi indicatori sono acidi o basi deboli che hanno una forma indissociata e una forma dissociata di colore diverso, e vengono aggiunti in piccole quantità alla soluzione da titolare. I due indicatori colorimetrici utilizzati sono: la fenolftaleina, nome IUPAC: 3,3-bis(4-idrossifenile)-1,(3H)-isobenzofuranone; e il verde di bromocresolo, nome IUPAC 2,6-Dibromo-4-[7-(3,5-dibromo-4-idrossi-2-metil-fenil)-9,9-diosso-8-oxa-9λ6-tiabicclonona-1,3,5-trien-7-il]-3-metil-fenolo.

Entrambi i reagenti colorimetrici vengono usati in forma di soluzione in etanolo allo 0,1%. La fenolftaleina a pH inferiori a 8,2 è incolore, a pH superiori a 9,8 gli ossidrili perdono i loro atomi d'idrogeno e la molecola impartisce un intenso color fucsia alla soluzione. Il verde di bromocresolo ha un range di pH in cui vira colore tra 3,3 e 5, in cui la soluzione cambia colore da blu nella forma basica a giallo nella forma acida.

Il procedimento sperimentale prevede l'utilizzo di un volume noto di filtrato, ottenuto dalla filtrazione sottovuoto della biomassa di *A. maxima* (paragrafo 2.3.1).

Ad esso si aggiungono indicativamente 3 gocce di fenolftaleina sotto agitazione. Il filtrato assumerà una diversa intensità di fucsia in base alla concentrazione di bicarbonato presente. Per raggiungere il punto di equivalenza e far tornare la soluzione incolore si utilizza l'HCl 0,5 M. Al punto di equivalenza il numero di equivalenti di HCl sarà uguale al numero di equivalenti di CO_3^{2-} in soluzione ($n\text{HCl}=n\text{CO}_3^{2-}$). Si aggiunge quindi alla soluzione il verde di bromocresolo, sempre indicativamente 3 gocce. Avendo il secondo indicatore un range di viraggio molto più acido rispetto alla fenolftaleina, la colorazione che si osserverà sarà di diverse intensità di blu. Il punto di equivalenza si raggiungerà aggiungendo nuovamente HCl 0,5M goccia a goccia al filtrato fino a quando si osserverà il viraggio al giallo della soluzione. Alla fine di questo passaggio, al punto di equivalenza si avrà che $n\text{HCl}= n\text{CO}_3^{2-} + n\text{HO}_3^-$. Con una semplice sottrazione si avranno le moli dello ione idrogeno-carbonato in soluzione. Per trovare la concentrazione in g L^{-1} delle diverse specie chimiche in soluzione bisognerà trovare le moli L^{-1} , considerando il volume di partenza per poi utilizzare il peso molecolare.

2.5 Estrazione e quantificazione del contenuto di pigmenti

Durante gli esperimenti batch con *A. maxima*, sono stati esaminati vari campioni al fine di monitorare la variazione del contenuto di clorofilla *a*, carotenoidi e ficobiliproteine durante la crescita della coltura. Invece, negli esperimenti in continuo, l'analisi a stato stazionario di questi composti ha permesso di studiare l'effetto delle variabili operative sul loro contenuto.

2.5.1 Clorofilla *a* e Carotenoidi

Per valutare come diverse condizioni operative influenzino la produzione di pigmenti, sia la clorofilla che i carotenoidi sono stati monitorati ad ogni stato stazionario. Come primo passo, i pigmenti sono stati estratti utilizzando la seguente procedura: 1 mL di campione è stato centrifugato per 5 minuti a 11000 rpm e il surnatante è stato rimosso con una micropipetta. La biomassa rimanente è stata sospesa con 1 mL di N,N-dimetilformammide (DMF), un solvente organico in grado di solubilizzare pareti e membrane dei cianobatteri. Il campione è stato poi

conservato in freezer a -18°C per 24 ore per consentire l'estrazione dei pigmenti. Per analizzare il contenuto di pigmenti, i campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 13500 rpm e il solvente con i pigmenti estratti è stato trasferito in una cuvetta di quarzo. Gli spettri di assorbimento nell'intervallo 350 nm - 750 nm sono stati acquisiti dallo spettrofotometro utilizzando una larghezza di banda di 0,5 nm. La quantificazione dei pigmenti è stata ottenuta applicando le correlazioni riportate da Wellburn, 1994 (Wellburn, 1994):

$$\text{Chl a } (\mu\text{g mL}^{-1}) = (\text{Abs}_{664} - \text{Abs}_{750}) * D * \varepsilon_{\text{chl-a}} * \left(\frac{V_{\text{DMF}}}{V_s}\right) \quad (\text{Eq. 2.24})$$

$$\text{Car } (\mu\text{g mL}^{-1}) = [(\text{Abs}_{461} - \text{Abs}_{750}) - (\text{Abs}_{664} - \text{Abs}_{750}) * 0.04 * \varepsilon_{\text{car}} * \left(\frac{V_{\text{DMF}}}{V_s}\right)] \quad (\text{Eq. 2.25})$$

Le formule utilizzate per calcolare la concentrazione dei pigmenti prevede l'utilizzo del fattore di diluizione D e dei coefficienti di assorbimento $\varepsilon_{\text{chl-a}}$ e ε_{car} , che corrispondono rispettivamente a 11,92 e 4. Si noti che i valori di assorbanza vengono normalizzati a 750 nm al fine di evitare possibili interferenze dovute a residui di estrazione.

2.5.2 Ficobiline

La produzione di ficocianina e alloficocianina è stata monitorata durante gli esperimenti in continuo a diversi tempi di permanenza e nei sistemi con riciclo. Per l'estrazione dei pigmenti, sono stati prelevati 10 mL di campione dal reattore e divisi in due provette da 5 mL ciascuna. Dopo una centrifugazione a 7500 rpm per 8 minuti, il surnatante è stato rimosso mediante una micropipetta. Successivamente, è stato aggiunto 1 mL di cloruro di calcio (CaCl_2) 10 g/L alla biomassa rimanente per estrarre le ficobiline. I campioni sono stati quindi conservati in freezer a -18°C per 3 cicli di congelamento e scongelamento per rompere le cellule delle microalghe. Dopo il terzo ciclo, i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 6000 rpm. Il surnatante contenente le ficobiline è stato analizzato con uno spettrofotometro nell'intervallo di spettro compreso tra 750 nm e 350 nm, utilizzando il cloruro di calcio 10 g/L come bianco, in cuvette di quarzo. Infine, le

ficobiline sono state quantificate applicando le correlazioni di Bennet e Bogorad (Bennett & Bogorad, 1973), riportate nelle equazioni 2.26 e 2.27:

$$\text{Chl a} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{[(\text{Abs}_{615} - \text{Abs}_{750}) - 0.474 * (\text{Abs}_{652} - \text{Abs}_{750})]}{5.34} * \left(\frac{V_{\text{CaCl}_2}}{V_s} \right) \quad (\text{Eq. 2.26})$$

$$\text{Car} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{[(\text{Abs}_{652} - \text{Abs}_{750}) - 0.208 * (\text{Abs}_{615} - \text{Abs}_{750})]}{5.09} * \left(\frac{V_{\text{CaCl}_2}}{V_s} \right) \quad (\text{Eq. 2.27})$$

2.6 Analisi statistica

I risultati sperimentali sono stati sottoposti ad un'analisi statistica per determinare la significatività delle differenze riscontrate. È stato eseguito il test Anova-one way per i dati parametrici e tramite Kruskal-Wallis per dati non parametrici con un livello di confidenza del 95% in entrambi in casi. Sono state analizzate diverse variabili, tra cui la concentrazione cellulare, il contenuto di pigmenti, la produttività e produzione di esopolisaccaridi a stazionario nelle diverse condizioni sperimentali. Il *grouping* tramite il test *Tukey* con livello di confidenza al 95% è stato utilizzato per la rappresentazione grafica dei dati.

CAPITOLO 3 – Effetto della concentrazione di bicarbonato sulla crescita di *A. maxima*

3.1 Esperimenti in batch per la determinazione dei parametri cinetici del bicarbonato

Il bicarbonato di sodio (NaHCO_3) è la fonte di carbonio più frequentemente utilizzata per la crescita del cianobatterio *Arthrospira* sp. e, trattandosi di un organismo alcalofilo, ne sono richieste elevate concentrazioni nel medium. Per valutare l'effetto della concentrazione di bicarbonato nella coltivazione di *A. maxima* sono stati eseguiti una serie di esperimenti in batch preliminari a diverse concentrazioni di NaHCO_3 . I diversi batch sono stati eseguiti con gorgogliamento di aria con il 5% v/v di CO_2 o in assenza di bubbling, per stabilizzare il valore di pH della coltura e valutare l'effetto dell'equilibrio delle specie carbonatiche in soluzione sulla crescita. In ogni condizione, da 0 a 30 gL^{-1} di NaHCO_3 , tutti gli altri nutrienti sono stati forniti in eccesso, ed è stato calcolato il tasso di crescita durante la fase esponenziale. Come mostrato in *Tabella 3.1*, si è constatato che tra le due impostazioni, aria con il 5% v/v di CO_2 e in assenza di bubbling, si ha una variazione della lunghezza della fase esponenziale: tre giorni per la condizione senza aria due giorni per la condizione con aria con il 5% v/v di CO_2 . I valori ottenuti, sono stati utilizzati per individuare i parametri cinetici di crescita legati alla concentrazione di bicarbonato, ed in particolare una costante di saturazione al 50% K_M . Per fare ciò, si è fittato il profilo del tasso di crescita in funzione della concentrazione di bicarbonato nel mezzo, utilizzando una cinetica di Michaelis-Menten, i cui parametri sono stati ottenuti applicando un processo di regressione e fitting tramite il solver di Excel (*Figura 3.1*).

Tabella 3.1: Tasso di crescita in funzione della concentrazione in g L^{-1} di NaHCO_3 in ingresso, per i batch con aria con il 5% v/v di CO_2 o senza *bubbling*

$\text{g NaHCO}_{3\text{in}} \text{ L}^{-1}$	Assenza di <i>bubbling</i> $\mu_{3\text{d}}$	Aria + 5% v/v di CO_2 $\mu_{2\text{d}}$
0	0	0
0,1	0,096	0,24
0,5	0,282	0,247
1	0,286	0,389
3,75	0,38	0,401
11,25	0,413	0,39
30	0,476	0,502

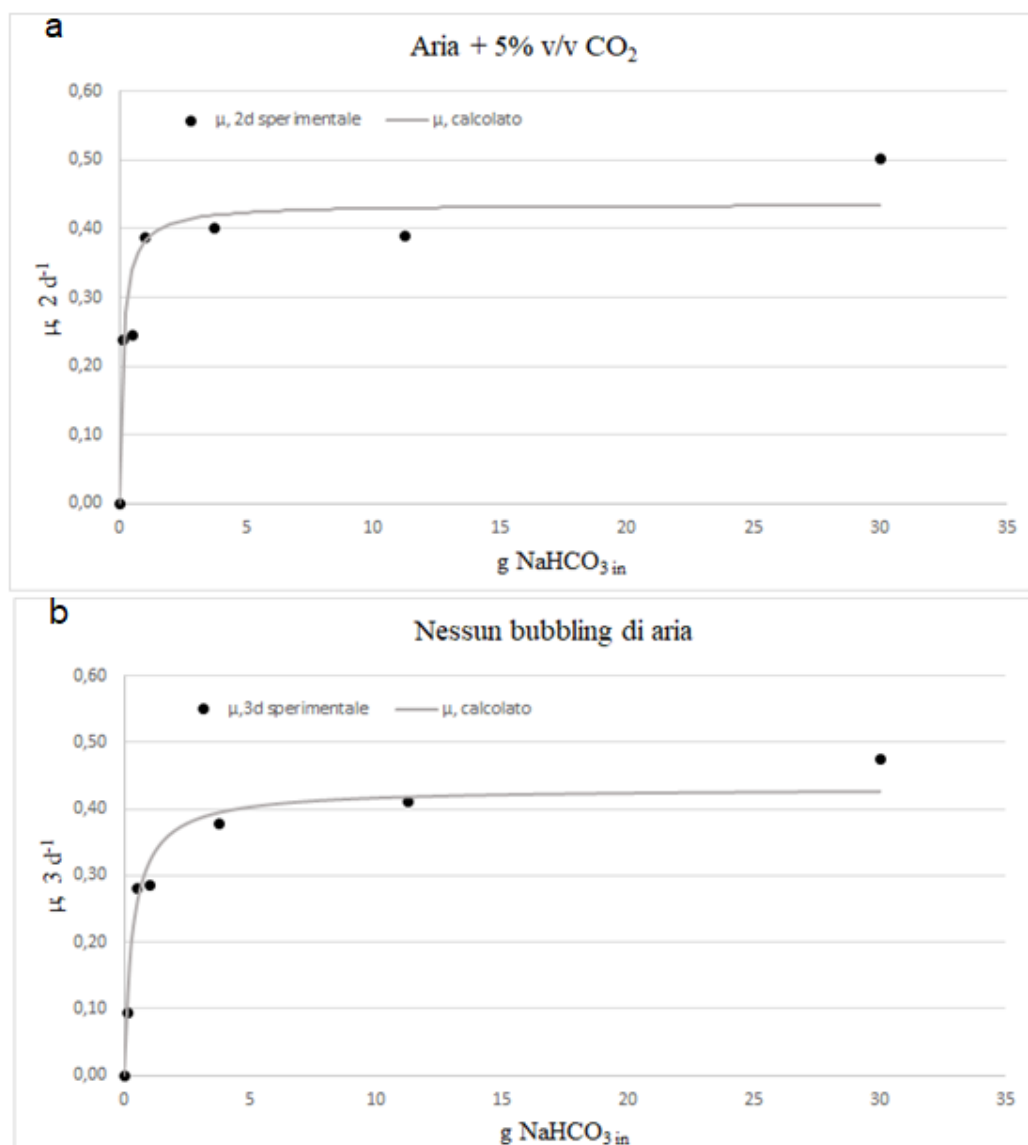


Figura 3.1: Fitting del profilo di μ_{max} per i batch con aria con il 5% v/v di CO_2 (a) e senza gorgogliamento di aria (b) in relazione alla concentrazione di bicarbonato in ingresso

L'andamento delle curve in figura è ben descritto dalla cinetica di Michaelis-Menten. Si può notare come la velocità di crescita arrivi ad un plateau all'aumentare della concentrazione in bicarbonato nel mezzo. In particolare, i valori di *half saturation constant* e velocità di crescita massimo ottenuti tramite il solver di Excel sono rispettivamente:

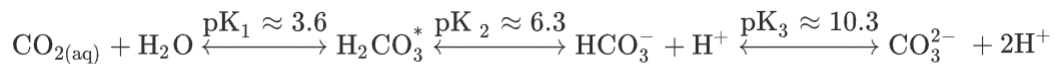
- a) Aria con il 5% v/v di CO₂: $K_M = 0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_{3\text{in}}$; $\mu_{\text{max}} = 0,44 \text{ d}^{-1}$
- b) Nessun gorgogliamento d'aria: $K_M = 0,35 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_{3\text{in}}$; $\mu_{\text{max}} = 0,43 \text{ d}^{-1}$

I parametri trovati dimostrano che il valore della *half saturation constant* si aggira tra 0,14 e 0,35 gL⁻¹ di bicarbonato di sodio. Studi sulla concentrazione di bicarbonato nel mezzo utilizzato per la coltivazione di Spirulina si possono trovare anche in letteratura, e, ad esempio, Fanka et al., (2022) hanno trovato che coltivando *Arthrospira* in 2,8 g L⁻¹ di NaHCO₃ in *open raceways PBR* in batch per 15 giorni non ha avuto impatti significativi sulla velocità di crescita rispetto allo Zarrouk standard, ottenendo una μ_{max} di $0.30 \pm < 0.01$ per lo Zarrouk standard e di 0.33 ± 0.01 per lo Zarrouk con minori concentrazioni di bicarbonato di sodio (Fanka et al., 2022). Tali dati suggeriscono un possibile risparmio di questo composto nella formulazione del mezzo. La differenza tra i due valori di K_M riscontrati nel presente lavoro è probabilmente da attribuire al pH e al minore coefficiente di scambio di materia in assenza di bubbling. Come già citato, Spirulina è un cianobatterio alcalofilo, esso ha bisogno del mantenimento di un certo pH (9-11) per la crescita. Il pH del terreno di coltura tende ad aumentare dopo l'inizio della coltivazione in batch, a causa del consumo della CO₂ disciolta nel mezzo. L'aumento del pH durante la crescita (entro 11) non ha effetti negativi sulla coltura di *A. maxima*, anche se sposta l'equilibrio del carbonio verso la forma carbonatica (Saxena et al., 2022). La variazione del pH durante la crescita di *A. maxima* è stata osservata anche negli esperimenti di questa tesi, con differenze maggiori nella condizione senza aria (Tabella 3.2), dove al terzo giorno si arriva anche a pH > 11. Le differenze sono meno marcate nelle condizioni con gorgogliamento di aria con il 5% v/v di CO₂ e nelle colture con concentrazioni maggiori di NaHCO₃, grazie all'effetto tamponante di tale composto anche in assenza dell'anidride carbonica.

Tabella 3.2: pH per i batch a diverse concentrazioni di NaHCO₃ nelle due condizioni, con aria con il 5% v/v di CO₂ e senza aria

Condizione	g L ⁻¹ NaHCO _{3in}	pH		
		Giorno 0	Giorno 1	Giorno 2
Aria + il 5% v/v di CO ₂	0,1	7,31	6,99	7,01
Assenza di bubbling	0,1	9,47	10,89	10,76
Aria + il 5% v/v di CO ₂	0,5	7,47	7,25	7,38
Assenza di bubbling	0,5	9,17	11,41	11,54
Aria + il 5% v/v di CO ₂	1	8,50	7,33	7,49
Assenza di bubbling	1	8,99	11,35	11,74
Aria + il 5% v/v di CO ₂	3,75	9,03	8,65	8,32
Assenza di bubbling	3,75	9,04	9,56	9,92
Aria + il 5% v/v di CO ₂	11,25	9,03	9,54	9,78
Assenza di bubbling	11,25	9,04	9,47	9,75
Aria + il 5% v/v di CO ₂	30	9,24	8,75	8,73
Assenza di bubbling	30	9,26	9,40	9,58

Osservando gli equilibri in soluzione in *Figura 3.2*, si può notare come a basse concentrazioni di NaHCO₃ l'assenza o la presenza del bubbling aria + 5% v/v CO₂ influisce notevolmente. In particolare nella condizione con 0,1 g L⁻¹ e 0,5 g L⁻¹ di NaHCO₃, in assenza di bubbling si osserva uno spostamento degli equilibri verso lo ione carbonato, dovuto ad un innalzamento del pH. Infatti, facendo riferimento all'equazione 1.2 e 1.3, gli equilibri delle forme carboniche in soluzione possono essere riassunte come (Markou et al., 2014):



dove H₂CO₃* si riferisce a CO_{2(aq)} + H₂CO₃, e la relazione tra pK e pH è: pH = pK + log([OH⁻]/[H⁺]). Tra pH 6,5 e 10, la forma di carbonio dominante è lo ione bicarbonato. Abbassando i valori di pH, si forma gradualmente più H₂CO₃* e quando il pH uguaglia la pK₂ la concentrazione di H₂CO₃* diventa pari a HCO₃⁻. Al contrario, aumentando i valori di pH si forma gradualmente più CO₃²⁻ e quando

il pH raggiunge uguaglia il pK3 la concentrazione di CO_3^{2-} diventa pari a HCO_3^- . A pH superiori alla pK3, quindi sopra valori di 10, la concentrazione di CO_3^{2-} è predominante, come nel presente caso dove dal secondo giorno di coltura nelle condizioni con $0,1 \text{ g L}^{-1}$ e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ di NaHCO_3 , in assenza di bubbling, il pH ha raggiunto valori di 11.

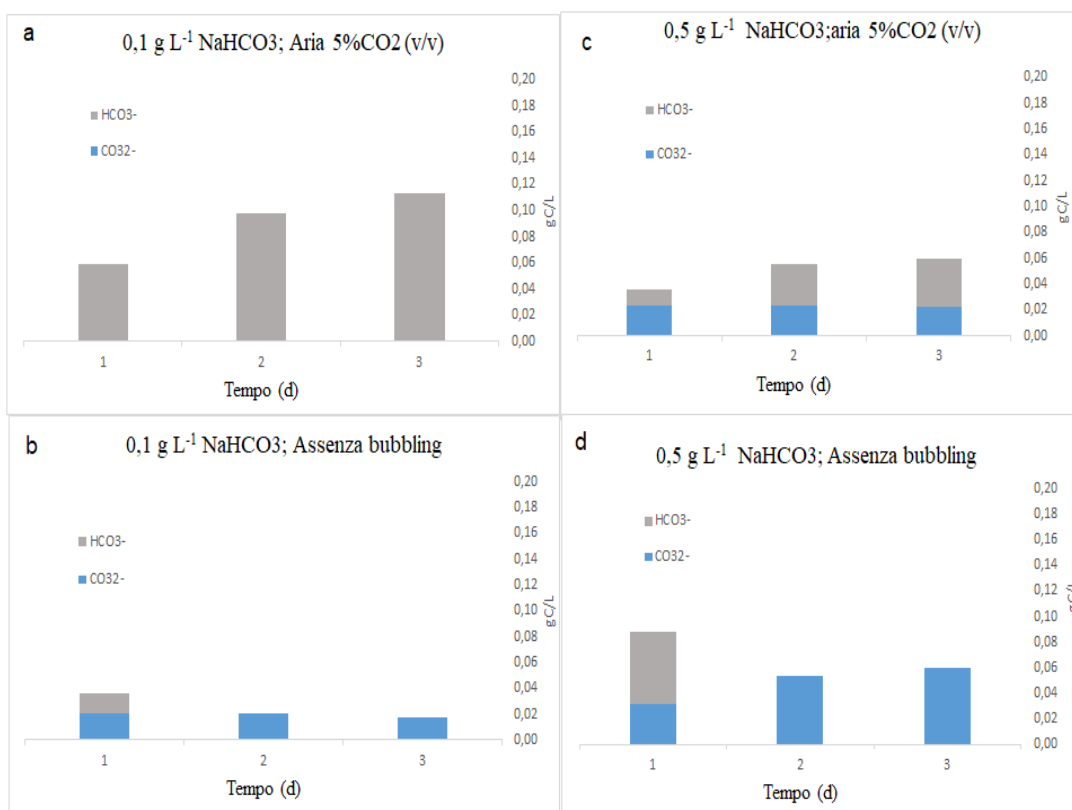


Figura 3.2: Forme carboniche per $0,1 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ con aria + 5%v/v di CO_2 (a) e senza aria (b) e per $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ con aria + 5% v/v CO_2 (c) e senza aria (d)

In questa fase preliminare si è quindi evidenziato come il mezzo utilizzato (lo Zarrouk) influisce sulla coltivazione di *Arthrospira maxima*. Abbassandone la concentrazione è necessario garantire il monitoraggio e mantenimento del pH della coltura in un range favorevole per garantire la presenza in soluzione di forme carboniche che la microalga è in grado di assimilare, evitando sia una troppa acidificazione che una troppa alcalinizzazione del mezzo. Infatti, le cellule dei cianobatteri sono in grado di importare sia HCO_3^- che CO_2 utilizzando specifici trasportatori cellulari o per diffusione diretta attraverso la membrana cellulare. Lo ione bicarbonato si concentra all'interno del carbossisoma dove viene riconvertito

in CO₂ grazie all'attività di diverse anidridi carboniche permettendo così il suo *uptake* e utilizzo (De Farias Silva et al., 2017).

3.2 Esperimenti in continuo

3.2.1 Effetto della concentrazione di bicarbonato per la coltivazione di *A. maxima* in continuo

Al fine di studiare l'effetto della concentrazione di bicarbonato nel mezzo in sistemi in continuo, è stata valutata la crescita di *A. maxima* variando la concentrazione di bicarbonato di sodio in ingresso, focalizzandosi in particolare sulla composizione di biomassa e la secrezione di composti inibenti.

3.2.1.1 Produzione di biomassa e consumo di nutrienti

La concentrazione di NaHCO₃ in ingresso è stata aumentata fino a 60 g L⁻¹, per verificare effetti limitanti o inibenti di un ampio range di concentrazione, anche in un'ottica di riciclo del mezzo, dove si potrebbe verificare un accumulo di sodio se non viene raggiunto uno stato stazionario. In *Figura 3.3* vengono mostrati i valori medi di concentrazione (Cx) in g L⁻¹ e produttività (Px) in g L⁻¹ d⁻¹, di *A. maxima* per le diverse condizioni.

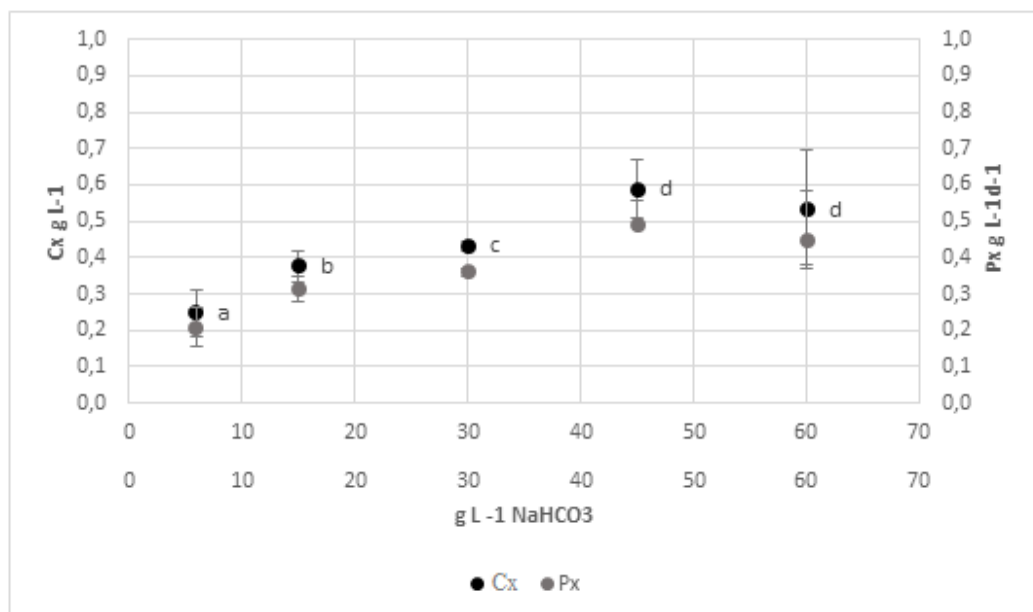


Figura 3.3: Concentrazione (Cx) e produttività (Px) di *A. maxima* a diverse concentrazioni di bicarbonato; lettere uguali corrispondono a una differenza non significativa tra i dati per $p < 0.05$

Come si può notare dal grafico, per concentrazioni basse di bicarbonato (NaHCO_3) si ha una progressiva diminuzione della produttività di biomassa. Sopra i 30 g L^{-1} si ha il raggiungimento di un plateau dove aumentando la concentrazione di NaHCO_3 nel terreno non si osservano effetti rilevanti sulla produzione di biomassa. In un sistema in continuo si ha una continua introduzione e rimozione di bicarbonato di sodio e di ioni idrogeno dalla soluzione. L'equilibrio del bicarbonato di sodio, non dipenderà solo dal pH del medium ma sarà influenzato dai bilanci di materia del carbonio al reattore. In generale, l'equilibrio del bicarbonato di sodio in un sistema in continuo dipende dalle condizioni operative del sistema stesso, come la concentrazione dei reagenti, la velocità di flusso della soluzione, il pH e la presenza di altri ioni o composti che possono interagire con il NaHCO_3 . In ogni caso, il NaHCO_3 è in grado di mantenere costante il pH di una soluzione in quanto è in grado di agire da tampone (De Farias Silva et al., 2017).

Per quanto riguarda il consumo di nutrienti, il contenuto di fosforo e nitrato è stato misurato sul filtrato ottenuto dalla separazione della biomassa dal medium. Le rese di consumo $Y_{P/X}$ e $Y_{N/X}$ vengono mostrate in *Tabella 3.3*:

Tabella 3.3: Rese di consumo di fosforo e nitrato sulla biomassa di *A. maxima*

$\text{g L}^{-1} \text{NaHCO}_3$	6	15	30	45	60
$Y_{P/X} \%$	$0,48\% \pm 0,016$	$0,47\% \pm 0,001$	$0,45\% \pm 0,001$	$0,52\% \pm 0,007$	$0,5\% \pm 0,001$
$Y_{N/X} \%$	$5,95\% \pm 0,04$	$10,18\% \pm 0,02$	$8,3\% \pm 0,03$	$13\% \pm 0,024$	$8,8\% \pm 0,021$

Il fosforo, così come anche il nitrato, viene fornito in eccesso alla coltura. La differenza riscontrata nella resa del consumo di azoto su biomassa a 6 gL^{-1} può essere attribuita ad una minore produzione di biomassa nella stessa condizione. In letteratura esistono infatti evidenze di un effetto non importante della salinità sull'assorbimento dello ione nitrato in specie tolleranti, come *Arthrospira* sp. (Zafar et al., 2021).

3.2.1.2 Contenuto di pigmenti

La composizione interna della biomassa è stata valutata in termini di produzione di pigmenti, in particolare clorofilla-*a* e carotenoidi. I dati sono stati analizzati con Anova one-way ed i valori medi a stazionario sono mostrati in *Figura 3.4*.

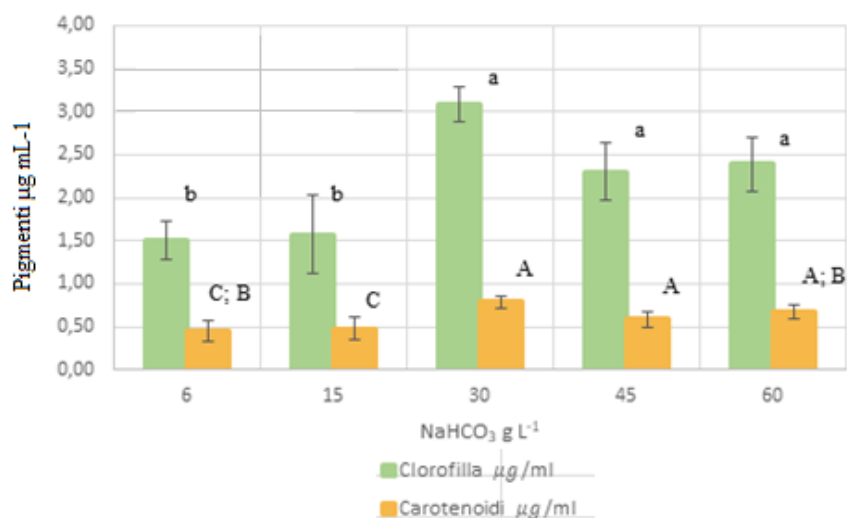


Figura 3.4: Valori medi di clorofilla-*a* e carotenoidi di *A. maxima* in diverse concentrazioni di bicarbonato; lettere uguali corrispondono a una differenza non significativa tra i dati per $p < 0.05$

La produzione di pigmenti rispecchia l'andamento della concentrazione di biomassa. Sebbene non ci siano differenze significative i valori medi sono inferiori a concentrazioni sopra i 30 g L⁻¹ di bicarbonato di sodio. Questo dato potrebbe essere legato ad uno stress salino. È stato visto che il cianobatterio è in grado di acclimatarsi a concentrazioni saline elevate. L'effetto di una maggiore salinità su *A. maxima* è principalmente attribuito ad effetti negativi degli ioni sodio sul macchinario fotosintetico (Markou et al., 2023). Inoltre, la salinità ha anche un effetto sulla morfologia dei tricomi e sulla composizione biochimica della biomassa, il che la rende un possibile modo per manipolare le caratteristiche morfologiche e biochimiche della biomassa prodotta. Aumentando la salinità, in genere aumenta il contenuto di carboidrati, mentre diminuiscono proteine, ficocianine, carotenoidi e fenoli totali (Markou et al., 2023).

3.2.1.3 Produzione di carboidrati

L'effetto della salinità è stato verificato sul contenuto di carboidrati nella biomassa. I valori medi della concentrazione di carboidrati vengono mostrati in *Figura 3.5*, e si può notare che effettivamente ad alte concentrazioni di bicarbonato di sodio si ha una differenza significativa nella produzione dei polisaccaridi. L'accumulo di carboidrati per le condizioni a 45 g L⁻¹ e 60 g L⁻¹ di NaHCO₃ può essere quindi

segno dell'imposizione di uno stress salino sulla microalga e conseguente adattamento di *A. maxima* alle condizioni di coltura. Infatti, le condizioni di stress causate da un aumento graduale della salinità, da diverse intensità di luce e dalla temperatura influenzano il contenuto di carboidrati. La salinità in particolare influisce sulla sintesi dei polisaccaridi a causa della necessità di mantenere un equilibrio osmotico tra l'ambiente intracellulare e quello extracellulare (Moreira et al., 2022). Essi sono infatti macromolecole polimeriche con strutture complesse, di cui xilosio, galattosio, glucosio, ramnosio e mannosio sono monomeri costitutivi sintetizzati dalle microalghe. Questi polisaccaridi si trovano principalmente come polimeri strutturali o polimeri di accumulo di energia per vari processi metabolici, oltre agli EPS con funzioni di protezione e interazione cellulare (Moreira et al., 2022).

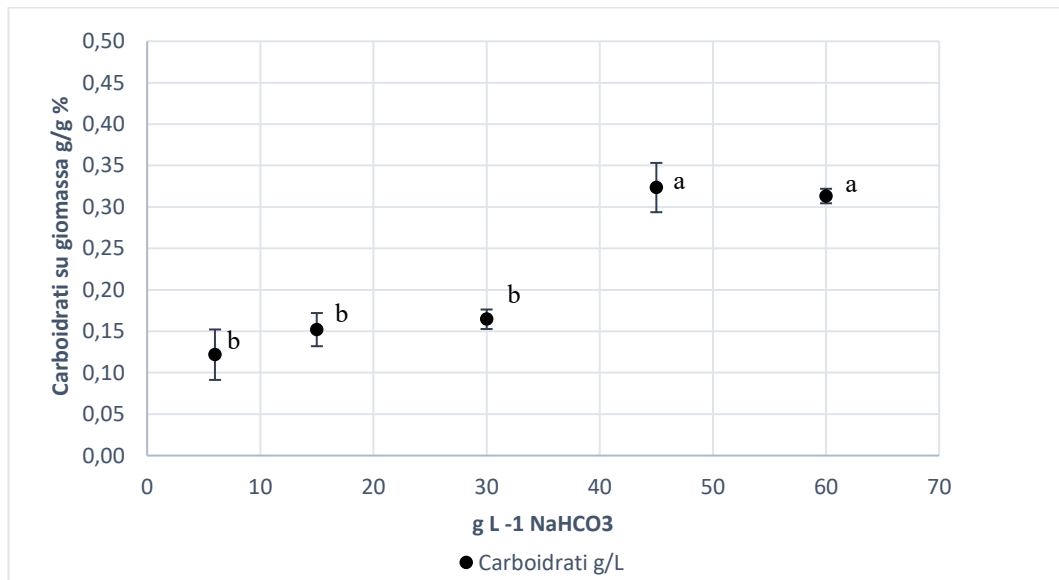


Figura 3.5: Produzione di carboidrati, valori medi per *A. maxima* in diverse concentrazioni di NaHCO₃; lettere uguali corrispondono a una differenza non significativa tra i dati per $p < 0.05$

3.2.1.4 Rilascio di composti nel medium – EPS

La concentrazione media degli EPS prodotti durante le diverse condizioni analizzate viene mostrata in *Figura 3.6*. L'analisi statistica con il metodo Kruskal-Wallis ha mostrato differenze significative tra i diversi dati ottenuti, si può notare che la concentrazione media si mantiene intorno agli stessi valori tranne per concentrazioni di bicarbonato di sodio a 6 g L^{-1} , dove la bassa produzione di EPS può essere associata anche ad una bassa produzione di biomassa, e per valori di 60 g L^{-1} , dove la più alta produzione di EPS può essere associata ad una condizione di stress salino.

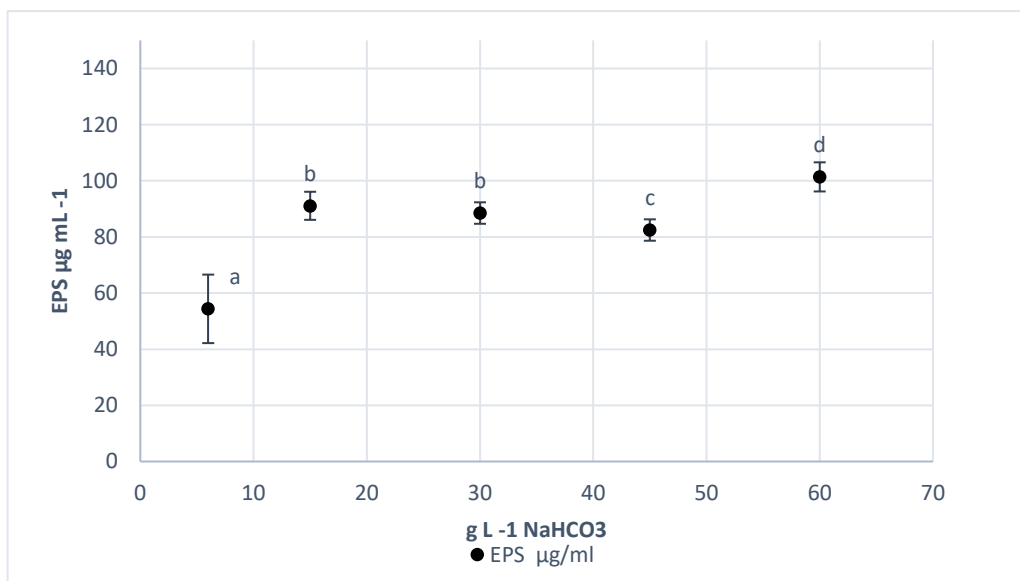


Figura 3.6: Produzione di EPS, valori medi per *A. maxima* in diverse concentrazioni di bicarbonato; lettere uguali corrispondono a una differenza non significativa tra i dati per $p < 0.05$

È noto, infatti, che *A. maxima* è in grado naturalmente di produrre diversi tipi di polisaccaridi esocellulari (EPS). La produzione di EPS cambia a seconda delle condizioni di coltura e può essere associata a situazioni di impoverimento dei nutrienti, elevata salinità, elevata intensità luminosa o altri stress ambientali. Si ritiene che la produzione di EPS abbia la funzione di proteggere il microrganismo da stress biotici e abiotici, nonché di facilitare l'adesione a substrati solidi (Phélippe et al., 2019). Tuttavia, nell'ambito della ricerca sull'influenza delle condizioni di coltura sull'abbondanza o sulla composizione degli EPS, con l'obiettivo di valutare, ad esempio, nuove conoscenze sulla plasticità metabolica dei cianobatteri, si evidenzia una grande difficoltà nel confrontare le indagini precedenti tra uno studio e l'altro, a causa dell'eterogeneità di definizioni e protocolli presenti in letteratura.

Nel caso specifico di *Arthrospira platensis*, dai dati pubblicati non emerge un chiaro consenso sulle condizioni ottimali di produzione o caratterizzazione degli EPS. Si ipotizza che le condizioni di coltura siano in grado di influenzare in modo significativo l'accumulo di EPS e, in particolare, la composizione degli EPS di *Arthrospira* sp. (Phélippé et al., 2019).

3.2.2 Effetto della concentrazione di bicarbonato sugli equilibri delle forme carboniche nella coltivazione di *A. maxima*

Se dal punto di vista cinetico il valore della *half saturation constant* suggerisce che concentrazioni intorno a 1 gL^{-1} di NaHCO_3 siano sufficienti a garantire una buona produttività di biomassa, ma nel caso di coltivazioni in continuo ad alte concentrazioni di biomassa è necessario verificare la quantità di bicarbonato richiesta dal bilancio di materia. Inoltre, a causa dell'effetto combinato di pH e disponibilità di carbonio, è importante verificare con esperimenti in continuo l'effettivo apporto di bicarbonato richiesto per la coltivazione estensiva. Per poter valutare come la concentrazione di NaHCO_3 influisce sulla coltivazione di *A. maxima* in continuo sono stati eseguiti esperimenti: con 6 g L^{-1} e 30 g L^{-1} di bicarbonato in ingresso, con aria + 5% CO_2 , aria senza somministrazione di CO_2 e senza gorgogliamento di aria. È stata valutata la concentrazione di *A. maxima* a stazionario (DW) ed il pH nelle diverse condizioni (Figura 3.7 e 3.9). Sono anche state misurate le forme carbonatiche tramite titolazione acido-basica (Figura 3.8 e 3.10). Il *mass transfer* dell'ossigeno nei reattori utilizzati è stato misurato per valutare la sua influenza nelle colture senza bubbling, tramite l'equazione 2.5. La k_{la} , costante del *mass transfer*, è stata ottenuta tramite il resolver di Excel, e risultata essere $k_{la, \text{O}_2} = 0,195 \text{ min}^{-1}$, dimostrando che non c'è accumulo di ossigeno nella condizione di coltivazione senza aria.

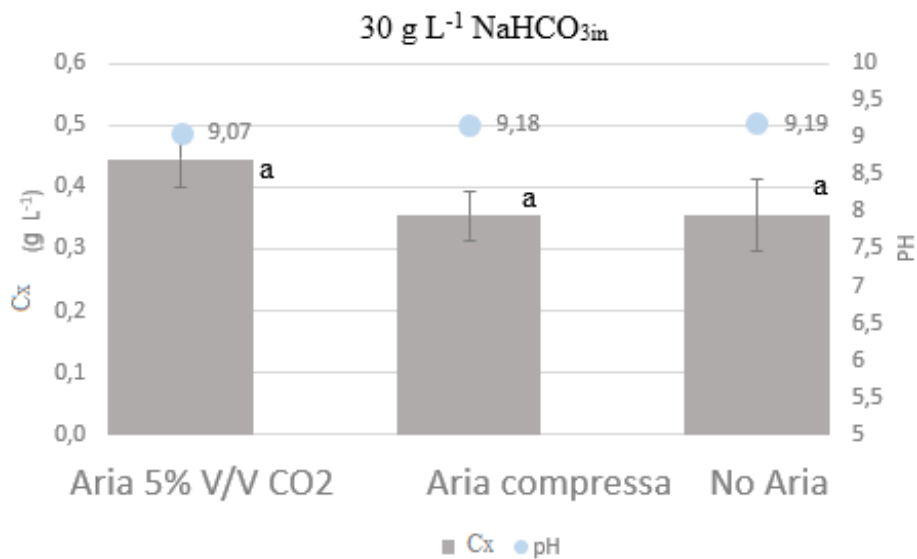


Figura 3.7: Concentrazione di biomassa (Cx) in g L⁻¹ e pH per la coltivazione di *A. maxima* con 30 g L⁻¹ di NaHCO₃ in ingresso, con aria + 5% v/v di CO₂, aria senza aggiunta di CO₂ e senza gorgogliamento di aria; lettere uguali corrispondono a una differenza non significativa tra i dati per p < 0.05

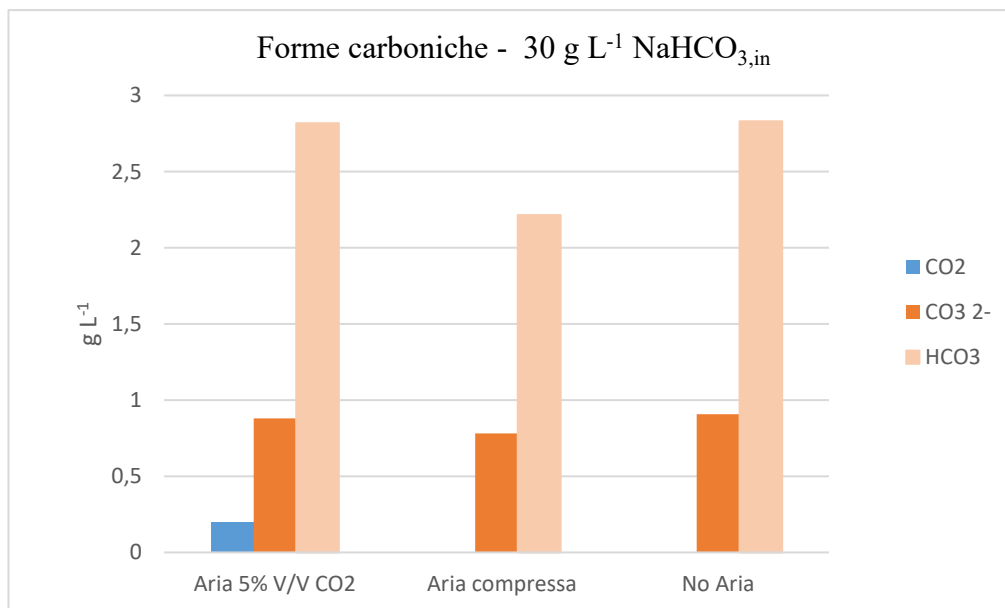


Figura 3.8: Forme carbonatiche per la coltivazione di *A. maxima* in 30 g L⁻¹ di NaHCO₃ in ingresso, con aria + 5% v/v di CO₂, aria compressa e senza aria

Per la coltivazione di *A. maxima* con 30 g L⁻¹ di NaHCO₃ in ingresso, non ci sono differenze significative per quanto riguarda la produzione di biomassa e il pH. Le forme prevalenti di carbonio in soluzione sono anche esse simili, tranne una leggera

minore concentrazione di HCO_3^- nella coltivazione con aria compressa che può essere attribuita allo stripping causato dall'insufflazione di ossigeno. Il bicarbonato risulta in largo eccesso per la crescita, come spiegato al paragrafo precedente, non permettendo di osservare una differenza significativa tra le tre condizioni.

Diminuendo la concentrazione di bicarbonato a 6 g L^{-1} , la concentrazione tra le tre condizioni testate non risulta a sua volta essere significativamente diversa anche se in media è stata osservata una concentrazione minore per la condizione con insufflazione di anidride carbonica: $0,24 \text{ g L}^{-1}$ contro $0,31 \text{ g L}^{-1}$ e $0,34 \text{ g L}^{-1}$ nelle condizioni con aria compressa e senza aria, rispettivamente. Seppur non statisticamente significativo a queste concentrazioni di bicarbonato, tale effetto è probabilmente dovuto ad un valore di pH inferiore quando si è insufflata aria con CO_2 . (Figura 3.9).

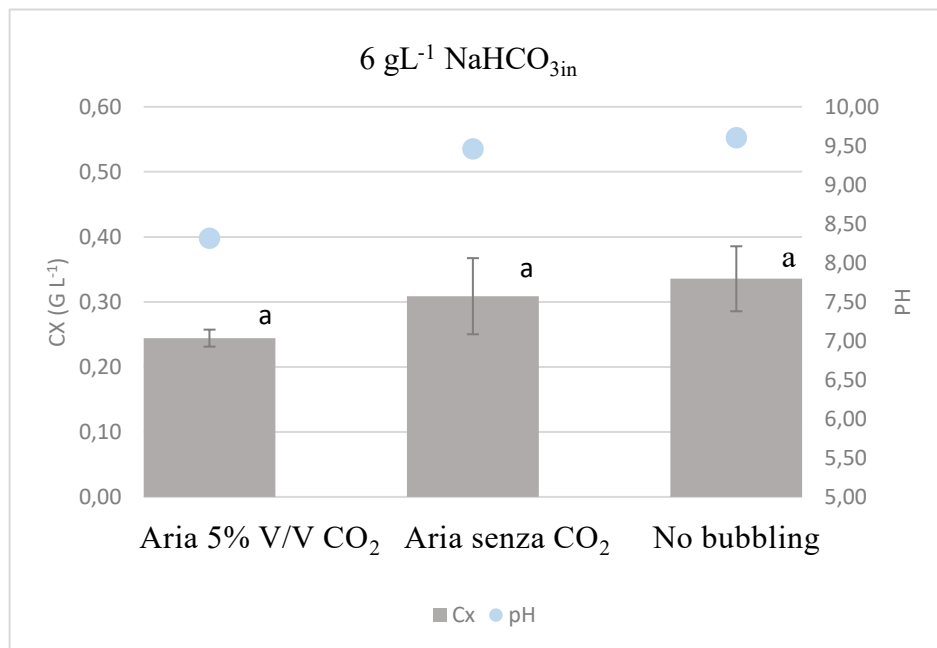


Figura 3.9: Concentrazione di biomassa (Cx) in g L^{-1} e pH per la coltivazione di *A. maxima* in 6 g L^{-1} di NaHCO_3 in ingresso, con aria + 5% v/v di CO_2 , aria compressa e senza aria; lettere uguali corrispondono a una differenza non significativa tra i dati per $p < 0,05$

La differenza riscontrata per il pH si può notare anche nelle diverse forme carboniche (Figura 3.7): l'insufflazione di anidride carbonica permette di avere un'alta concentrazione di HCO_3^- in soluzione. Nella condizione senza aria si nota un rovesciamento degli equilibri, con una concentrazione maggiore di carbonato rispetto allo ione bicarbonato dovuto all'innalzamento del pH.

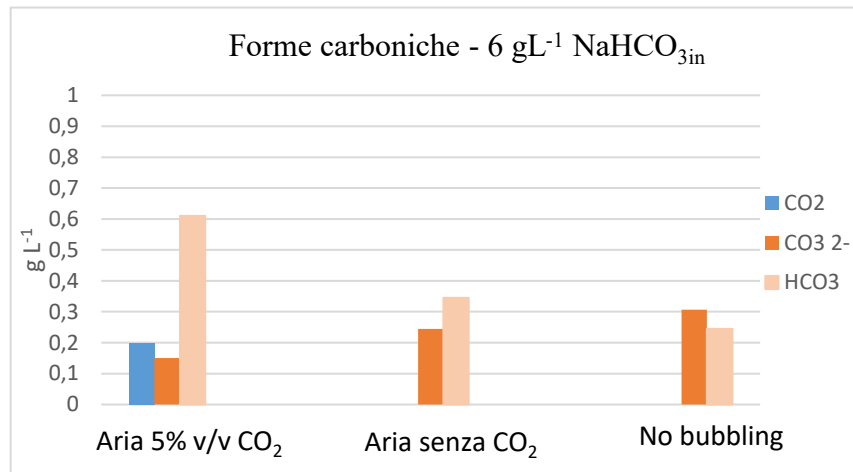


Figura 3.10: Forme carboniche per la coltivazione di *A. maxima* in 6 gL^{-1} di NaHCO_3 in ingresso, con aria + 5% v/v di CO_2 , aria compressa e senza aria

È stato evidenziato che in continuo si ha il mantenimento di un pH stabile anche a concentrazioni minori di bicarbonato di sodio nel mezzo. È da notare che rispetto a colture batch, dove il cambiamento di equilibrio tra HCO_3^- e CO_3^{2-} è stato associato ad una produttività minore di biomassa, in continuo ciò non è stato riscontrato grazie ad un apporto costante di bicarbonato di sodio che ha permesso produttività simili anche nelle condizioni senza bubbling. Lavorare in continuo potrebbe permettere di abbassare la concentrazione di bicarbonato di sodio necessaria per un'alta produttività di biomassa, tuttavia ulteriori considerazioni e approfondimenti sono necessari per capire in quale modo il *bubblig* di carbonio influisce sui bilanci totali e gli equilibri della coltura.

3.3 Considerazioni finali

Valutando la crescita di *A. maxima* a diverse concentrazioni di bicarbonato di sodio, in sistemi batch ed in continuo, si è evidenziato che:

- Per valutare una riduzione del bicarbonato di sodio nella coltivazione di *A. maxima* è necessario studiare in che modo le condizioni operative influiscono sugli equilibri delle forme carboniche, soprattutto per coltivazioni in sistemi batch dove l'avanzamento della coltura può spostare gli equilibri con un potenziale effetto inibitorio sulla microalga portando ad una diminuzione della produttività.
- Diverse concentrazioni di bicarbonato di sodio influiscono sulla composizione interna della biomassa di *A. maxima* con differenze significative nell'accumulo di carboidrati, e nel contenuto di pigmenti.
- In continuo, a concentrazioni di NaHCO_3 maggiori di 30 g L^{-1} la concentrazione di biomassa raggiunge un plateau senza osservare inibizione della crescita. La concentrazione del bicarbonato di sodio deve essere ottimizzata in coltura, sia per non incorrere in concentrazioni limitanti per la crescita, sia per evitare lo stress salino; una salinità elevata può causare l'accumulo di ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno) nelle cellule e diminuisce l'efficienza fotosintetica dei microrganismi attraverso la perossidazione dei tilacoidi e il danneggiamento del complesso PSII. I ROS sono estremamente tossici e degradano proteine, lipidi, DNA e altre macromolecole cellulari, inibendo la crescita cellulare e portando l'organismo alla morte (De Farias Silva et al., 2017).

CAPITOLO 4 – Accumulo di esopolisaccaridi nel mezzo di coltura ed effetto del rapporto di riciclo

4.1 Batch di controllo

A. maxima è stata coltivata in batch a 30°C e $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ per seguire la curva di crescita del cianobatterio nei fotobioreattori *flat panel* utilizzati nei successivi esperimenti con il riciclo. Gli esperimenti sono stati condotti in duplicato biologico per un tempo di 12 giorni. La curva di crescita viene riportata in *Figura 4.1*.

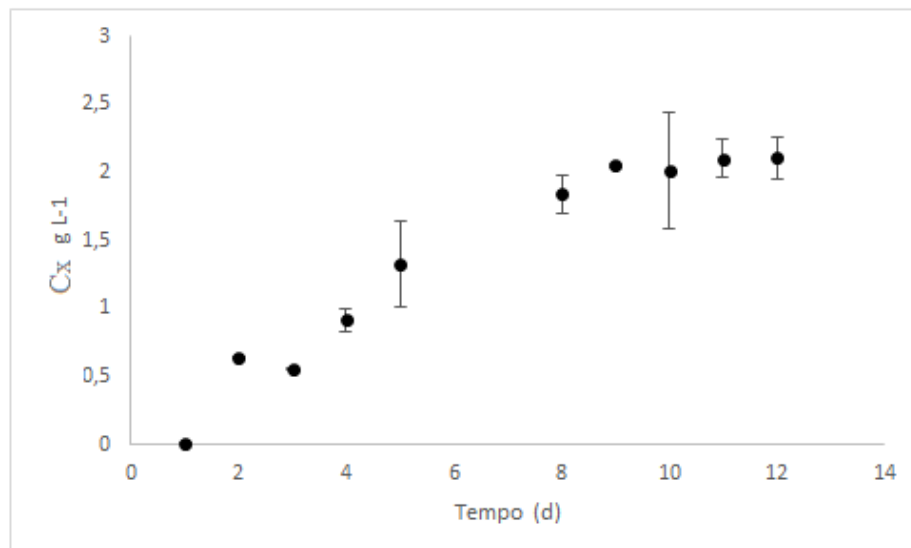


Figura 4.1: Concentrazione di biomassa (C_x) di *A. maxima* coltivata in batch

Nella fase esponenziale della curva è stato calcolato il tasso di crescita come riportato nell'equazione 2.1, ottenendo un valore pari a $0,39 \text{ d}^{-1}$, paragonabile a quello riscontrato in letteratura in condizioni simili per questo organismo (Ragaza et al., 2020). È stato seguito il consumo di nutrienti durante la crescita, osservando un calo progressivo della concentrazione di fosfati nel medium di crescita fino ad arrivare a 0 mg L^{-1} al giorno 7, corrispondente all'inizio della fase stazionaria di crescita. L'azoto, essendo stato fornito in largo eccesso con il terreno Zarrouk rimane in concentrazione non limitante nel medium durante la durata della coltura in batch. Per quanto riguarda la composizione interna della biomassa è stata seguita

la concentrazione di pigmenti e ficobiline (Figura 4.2) e quella di carboidrati (Figura 4.3).

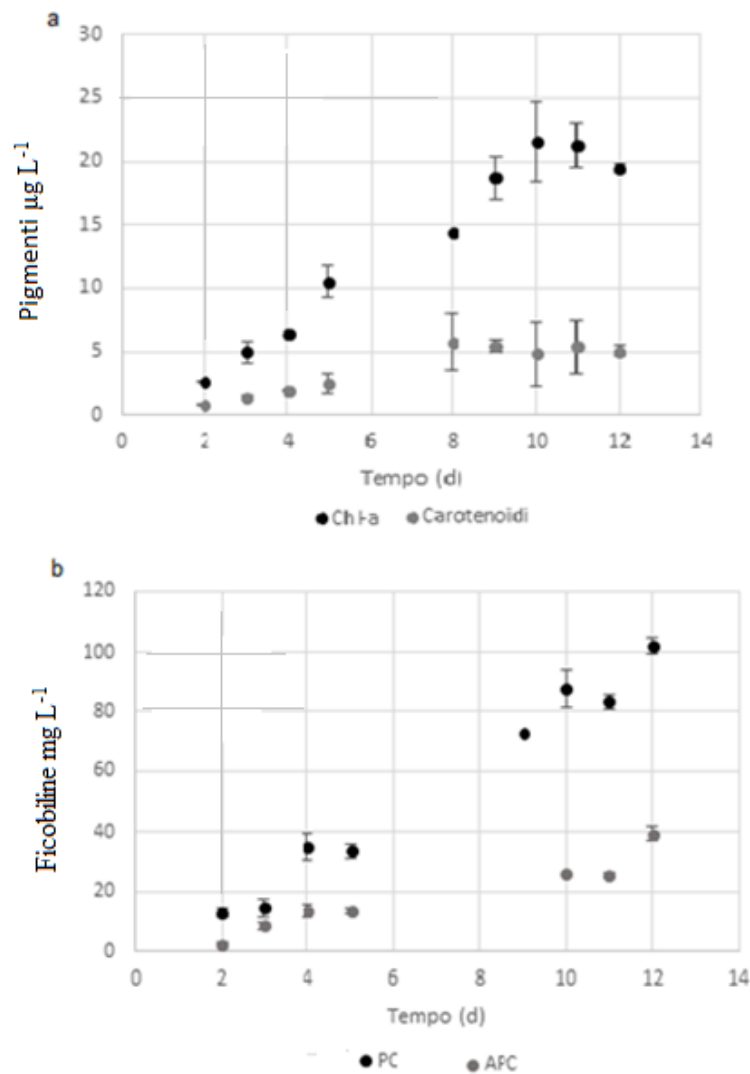


Figura 4.2: Produzione di pigmenti (a) e ficobiline (b) di *A. maxima* in batch

La concentrazione di clorofilla *a* segue il profilo di crescita di *A. maxima* e la concentrazione più elevata risulta essere di $21,52 \pm 3,13 \mu\text{g L}^{-1}$, simile ai dati riportati da Sili et al (2012) per diversi ceppi di *Arthrospira* sp. coltivati alle stesse temperature (Sili et al., 2012). Si osserva anche nel caso dei pigmenti il raggiungimento di una fase stazionaria e successivamente un calo di concentrazione a fine coltivazione. La concentrazione di ficobiline (ficocianina e alloficocianina) segue anch'essa la curva di crescita in fase esponenziale, ma continua ad aumentare anche alla fine della curva di crescita. In genere, infatti, durante le prime fasi di crescita di Spirulina, la quantità di clorofilla aumenta rapidamente, raggiungendo un picco dopo circa 5-7 giorni di coltura. Successivamente, la produzione di

clorofilla diminuisce mentre aumenta la produzione di altri pigmenti, come la ficocianina che fungono sia da pigmenti antenna sia da storage di amminoacidi ricchi in azoto (Thevarajah et al., 2022).

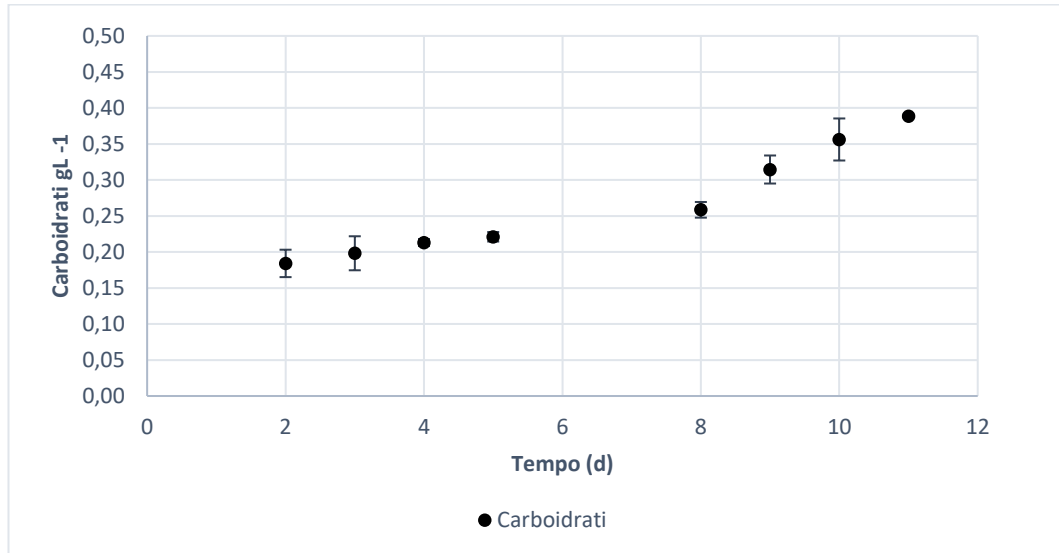


Figura 4.3: Produzione di carboidrati in batch per *A.maxima*

La concentrazione di carboidrati totali osservata durante la coltura in batch di *A. maxima* indica un accumulo progressivo dei polisaccaridi verso la fine della curva. L'accumulo di carboidrati è spesso associato ad una situazione di stress per la microalga (Moreira et al., 2022), come una carenza di nutrienti come nel caso presente, dove durante la coltura il fosforo diventa fortemente limitante. Il contenuto tipico di carboidrati di *Arthrospira* sp. è fra il 10%-20%, ma in condizioni di limitazione del fosforo accumula carboidrati fino al 60%-65% della biomassa secca. Inoltre, la biomassa arricchita di carboidrati di *A. platensis* dopo la limitazione dei nutrienti mostra una rapida capacità di bio-flocculazione, una caratteristica molto utile per raccogliere facilmente la biomassa (Markou et al., 2013).

Anche il pH può influenzare l'accumulo di carboidrati, e si sa che esso aumenta durante la coltivazione in batch portando ad una maggiore disponibilità di carbonio dovuta alla presenza di HCO_3^- nel terreno. La maggior parte dei carboidrati non è solubile e, quindi, deve essere complessa, poiché i carboidrati formano principalmente le pareti cellulari come polimeri simili alla cellulosa e glicani simili alla chitina (Sánchez-Bayo et al., 2020).

Infine, si è osservato che durante la coltivazione batch la produzione di EPS è rimasta attorno ad un valore medio di $111,15 \pm 15,29 \mu\text{g mL}^{-1}$ senza presentare un andamento chiaro. Si nota però l'accumulo di proteine nel medium esausto a fine coltivazione con una concentrazione di $168,13 \pm 10,38 \mu\text{g mL}^{-1}$, dovuto probabilmente a detriti e morte cellulare.

4.2 Controllo in continuo - Studio del tempo di permanenza (τ)

Per valutare le performance di *A. maxima* nei fotobioreattori da utilizzare successivamente per il riciclo, è stato analizzato il comportamento del cianobatterio in continuo a diversi tempi di permanenza. In particolare, sono stati analizzati tempi di permanenza di 1.2 giorni, 2 giorni e 3 giorni, mantenendo stabile la temperatura a 30°C e l'intensità luminosa a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. I reattori utilizzati possono essere approssimati ad un CSTR dove l'HRT è uguale al SRT ($R = 0$).

4.2.1 Produttività e consumo dei nutrienti

I valori medi per la produzione di biomassa (C_x , g L^{-1}) e produttività volumetrica (P_x , $\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$) vengono indicati in *Figura 4.4*.

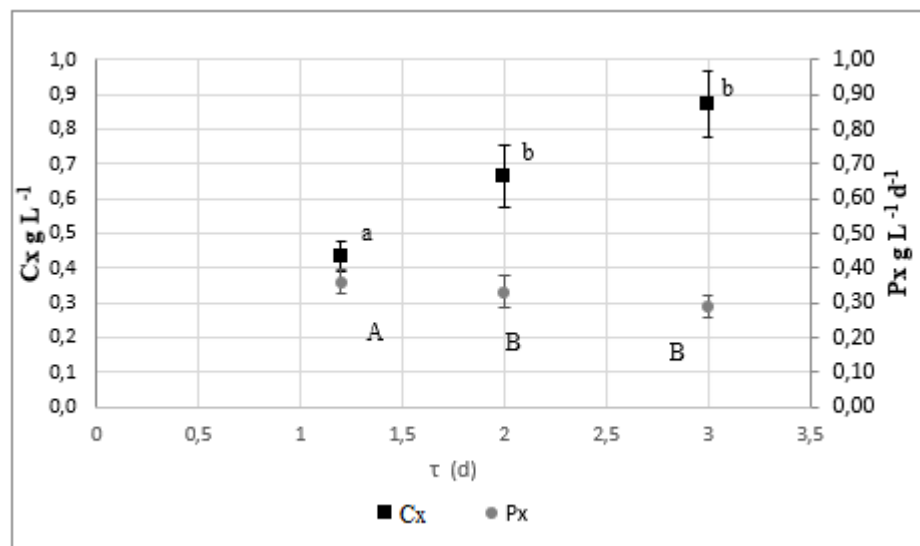


Figura 4.4: Concentrazione cellulare (C_x) e produttività (P_x) di *A. maxima* a diversi tempi di permanenza; lettere diverse corrispondono a una differenza significativa tra i dati per $p < 0.05$

Per ogni variazione del tempo di permanenza all'interno di un sistema biologico, si verifica una corrispondente variazione nella concentrazione cellulare allo stato stazionario e nel tasso di diluizione specifico del sistema, con un aumento della concentrazione cellulare all'aumentare del tau. Tuttavia, l'aumento della concentrazione cellulare allo stato stazionario in relazione all'incremento del tempo di permanenza non segue una relazione lineare. Ciò è dovuto all'aumento dell'effetto di auto-ombreggiamento, che diventa più significativo ad alti valori di tempo di permanenza (Sforza et al., 2015). Questo effetto si può osservare anche in figura, dove i valori medi di concentrazione a tau 2 e tau 3 non hanno una differenza significativa. La produttività volumetrica ad alti tempi di permanenza decresce, come tipicamente osservato in sistemi in continuo (Borella et al., 2021), ed infatti la produttività volumetrica più elevata si osserva per tau 1.2 con $P_x = 0,36 \text{ gL}^{-1}\text{d}^{-1}$. Aumentando il tempo di permanenza, infatti si può ottenere una maggiore concentrazione di biomassa allo stato stazionario, nelle colture concentrate, tuttavia, la penetrazione della luce è limitata, causando una minore efficienza di conversione dell'energia (Pastore et al., 2022).

Le rese di biomassa sui nutrienti vengono mostrate in *Tabella 4.1*.

Tabella 4.1: Resa dei nutrienti in biomassa (g g^{-1}).

$\text{g L}^{-1} \text{NaHCO}_3$	Tau 1.2	Tau 2	Tau 3
$Y_{P/X} \%$	$0,45\% \pm 0,001$	$0,31\% \pm 0,001$	$0,37\% \pm 0,001$
$Y_{N/X} \%$	$8,3\% \pm 0,03$	$4,7\% \pm 0,04$	$5,4\% \pm 0,03$

Misurando l'azoto e il fosforo consumati dalla biomassa allo stato stazionario, sono state rilevate diverse rese di nutrienti in rapporto alla biomassa in diverse condizioni operative, suggerendo che la composizione elementare della biomassa delle microalghe può cambiare variando il tempo di permanenza. Nello specifico, il tempo di residenza ha avuto un ruolo sul contenuto di azoto della biomassa. Anche se la concentrazione di azoto in ingresso è stata mantenuta costante, la resa di azoto in biomassa è diminuita con il tempo di residenza, come mostrato anche in letteratura (de Farias Silva & Sforza, 2016) e solitamente ciò avviene perché la sintesi proteica è maggiore quando gli organismi sono in una fase replicativa più

attiva (Borella et al., 2021). L'assorbimento del fosforo è legato all'intensità luminosa, e si può osservare un accumulo interno del nutriente ad alte intensità luminose, come trovato da de Farias Silva & Sforza, (2016) per la coltivazione di *C. vulgaris*. Tuttavia, a tempi di permanenza maggiori la densità cellulare aumenta all'interno dei reattori, con una diminuzione dell'efficienza fotosintetica (Sforza et al., 2015) che si può tradurre in una resa minore di fosforo nella biomassa, come è stato osservato durante gli esperimenti.

4.2.2 Composizione interna della biomassa

4.2.2.1 Produzione di pigmenti e ficobiline

È stata valutata la produzione di pigmenti e ficocianine per i diversi tempi di permanenza proposti. La produzione di pigmenti è correlata alla produzione di biomassa e *Arthrospira* sp. è considerata uno degli organismi con il più alto contenuto di clorofilla in natura, compreso tra l'1 e l'1,4% (López-Rodríguez et al., 2021), anche se solitamente la produzione commerciale riporta intervalli più bassi tra lo 0,5 e lo 0,9%. I carotenoidi principali identificati in *Arthrospira* sp. includono il β -carotene e la zeaxantina, e la loro produzione è fortemente influenzata dalle condizioni di coltura del cianobatterio, una produttività maggiore si riscontra in relazione a stress forti come l'accumulo di ROS (López-Rodríguez et al., 2021). La ficocianina-C (C-PC) risulta essere la principale ficobilina prodotta da *A. maxima*, ed in letteratura viene mostrato come contenuti alti di ficocianina si ottengono su scala di laboratorio (fino al 34,61%) rispetto a coltivazione su larga scala dove la produzione è fortemente influenzata dal pH della coltura con range dal 10% al 14% (Meher et al., 2019). I diversi contenuti di clorofilla, carotenoidi e ficobiline sono stati analizzati anche per la variazione del tempo di permanenza e vengono riportati in *Figura 4.5*. Si nota un incremento nel contenuto dei diversi pigmenti a tempi di permanenza maggiori, dovuto al raggiungimento di condizioni di fotolimitazione.

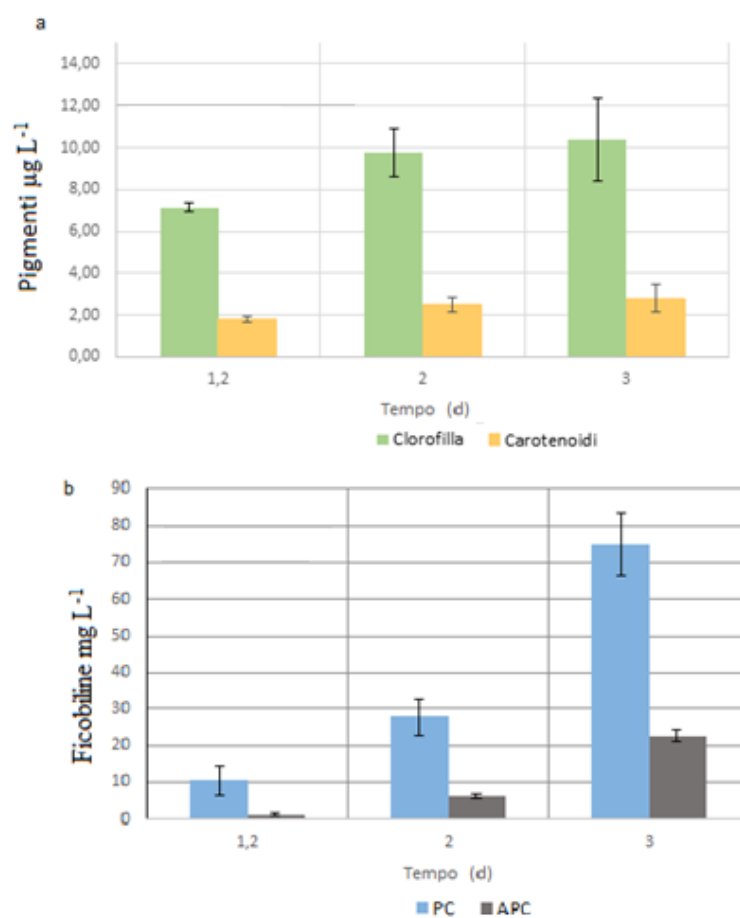


Figura 4.5: Contenuto di clorofilla-a e carotenoidi (a) e di ficobiline (b) di *A. maxima* a diversi tempi di permanenza

4.2.2.2 Produzione di carboidrati

La produzione di carboidrati da parte dei cianobatteri è diventata un'area di ricerca interessante nell'ultimo decennio per la sua potenziale applicazione come substrato per biocarburanti (Arias et al., 2020). In quest'ottica è interessante notare l'effetto del tempo di permanenza mostrato in *Figura 4.6*.

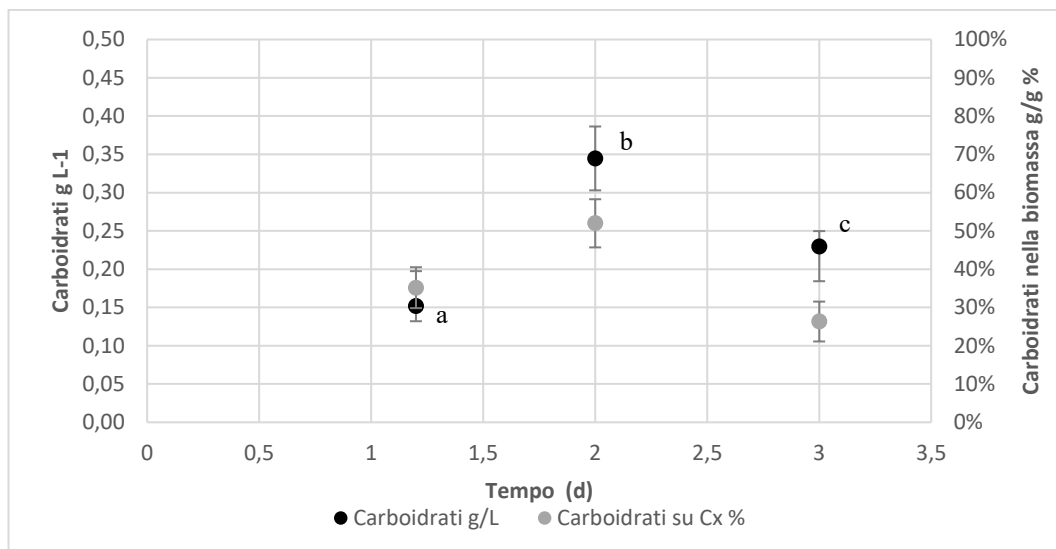


Figura 4.6: Carboidrati prodotti da *A. maxima* a diversi tempi di permanenza; lettere diverse corrispondono a una differenza significativa tra i dati per $p < 0.05$

In condizioni di nutrizione non limitanti e tempi di permanenza bassi non si è verificato alcun accumulo di composti di stoccaggio come i carboidrati, come trovato anche da Borella et al. (2021), con valori attorno al 30% della biomassa. La leggera diminuzione della concentrazione dei polisaccaridi a tau 3 giorni può essere legata ad un cambiamento nell'accumulo di composti riserva di energia nel cianobatterio, con uno spostamento verso composti di storage differenti, come i lipidi. I carboidrati infatti servono principalmente come deposito primario di energia e carbonio, mentre i lipidi fungono da storage secondario (de Farias Silva & Sforza, 2016).

4.2.3 Secrezione di composti nel medium

Per valutare l'effetto del tempo di permanenza sulla secrezione di metaboliti, sono stati misurati gli EPS e l'accumulo di proteine esterne nel medium nelle tre condizioni. A differenza della crescita in batch dove un accumulo di proteine esterne si può notare verso la fine della coltura, gli esperimenti in continuo non hanno mostrato questa tendenza con valori non rilevabili di proteine nel medium. Gli EPS vengono prodotti costitutivamente come parte della guaina di *Arthrospira* sp. e si possono accumulare in batch durante la fase stazionaria di crescita come

metaboliti secondari la cui cinetica di crescita è indipendente dalla produzione di biomassa (Trabelsi et al., 2009).

In continuo, la produzione degli EPS è risultata stabile nel tempo a stazionario, ma ha mostrato delle variazioni ai diversi tempi di permanenza testati, con valori medi ottenuti a stazionario riportati in *Tabella 4.2*.

Tabella 4.2: Concentrazione di EPS a diversi tempi di permanenza; lettere diverse corrispondono a una differenza significativa tra i dati per $p < 0.05$

Tau (giorni)	1.2	2	3
EPS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$87,22 \pm 12,86^b$	$139,54 \pm 10,96^a$	$119,39 \pm 9,97^a$

A tempi di permanenza maggiori di 1.2 giorni non è stata trovata una differenza significativa nella produzione di EPS, la cui concentrazione è maggiore, similmente a quanto osservato per la concentrazione cellulare. La produzione di esopolisaccaridi è influenzata quindi dal tempo di ritenzione idraulico, soprattutto per l'effetto che esso ha sull'efficienza fotosintetica, sull'up-take di nutrienti e sui cambiamenti nel medium di coltura a tau differenti (Trabelsi et al., 2009).

Dato che la condizione con maggiore produttività di biomassa risulta essere a tempo di permanenza di 1.2 giorni, condizione a cui si osserva anche una minore produzione di EPS, che secondo dati di letteratura sono composti potenzialmente inibenti ad elevate concentrazioni (Depraetere et al., 2015), si è scelta tale condizione per lo studio dell'effetto di diversi rapporti di riciclo sulle performance di *A. maxima*.

4.3 Effetto del rapporto di riciclo su colture in continuo di *A. maxima*

Per permettere la valutazione dell'effetto del riciclo del medium nella coltivazione in continuo di *A. maxima*, il medium in uscita dal reattore è stato filtrato sottovuoto per permettere la separazione della biomassa. Si ha in questo modo una dissociazione delle due variabili operative, HRT ed SRT che possono essere settate indipendentemente durante gli esperimenti, ed in particolare si ha che l'HRT è maggiore dell'SRT (Barbera et al., 2020). In base agli esperimenti preliminari di

controllo ($R = 0$) è stato visto che un tempo di permanenza di 1.2 giorni può essere una scelta valida per l'impostazione del riciclo, portando ad elevate produttività di biomassa. È da specificare che nel caso presente il tempo di permanenza di 1.2 giorni si riferisce al tempo di permanenza del solido SRT, mantenuto stabile nelle diverse condizioni analizzate. Il tempo di permanenza del liquido, invece, sarà influenzato dal rapporto di riciclo scelto.

Per ogni condizione si è preso come riferimento il controllo senza riciclo a τ 1.2 giorni con un C_x medio di $0,433 \pm 0,04$ g/L.

4.3.1 Concentrazione di *A. maxima* a diversi rapporti di riciclo

4.3.1.1 Caso limite: riciclo con reintegro minimo di nutrienti

La prima condizione analizzata è stato un riciclo pressoché totale del medium, quindi con un rapporto di riciclo R tendente a infinito, per verificare l'accumulo di materiale organico extracellulare e monitorare la crescita di *A. maxima* nel tempo. In *Figura 4.7* si può osservare la concentrazione cellulare in confronto al controllo nel tempo, in un esperimento di durata pari a 34 giorni. Il pH della coltura è stato monitorato senza osservare cambiamenti dovuti al riciclo, con un valore medio di $9,09 \pm 0,14$, diverso da quanto riportato in letteratura per sistemi con il riciclo in batch dove il pH della coltura aumenta ad ogni ciclo (Andrade et al., 2019), ma giustificabile dal fatto che è stata insufflata costantemente una miscela di aria arricchita con CO_2 al 5%, in grado di tamponare le possibili variazioni.

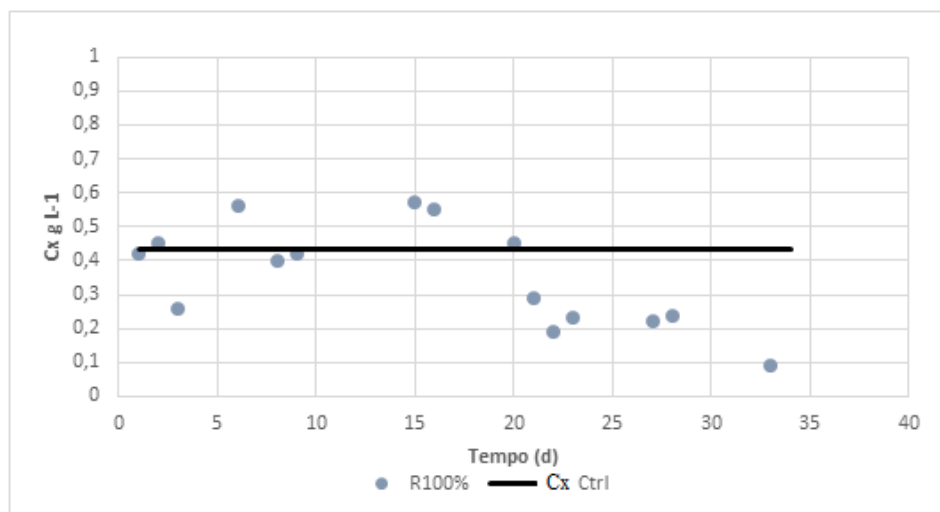


Figura 4.7: Crescita di *A. maxima* in terreno riciclato circa al 100%

Come si può notare in *Figura 4.9*, non si osserva il raggiungimento di uno stazionario, con un calo di concentrazione della coltura dopo 20 giorni e il *wash-out* al giorno 34. I macro e micronutrienti sono stati monitorati durante l'esperimento e reintegrati per evitare condizioni limitanti. La concentrazione di fosforo non è mai scesa sotto concentrazioni di $5,23 \pm 0,16 \text{ mg L}^{-1}$ e l'azoto sotto ai $56,53 \pm 2,29 \text{ mg L}^{-1}$ nel terreno utilizzato per il riciclo.

4.3.1.2 Rapporto di riciclo R=19.5

È stato quindi analizzato un riciclo con $R = 19.5$ (95%), constatando anche in questo caso un *wash-out* al giorno 28 (*Figura 4.8*).

Essendo la portata in ingresso al reattore pari a 292 mL d^{-1} , il rapporto di riciclo in questo caso è pari a 19.5 ed il tempo di permanenza del liquido HRT è di 23.4 giorni.

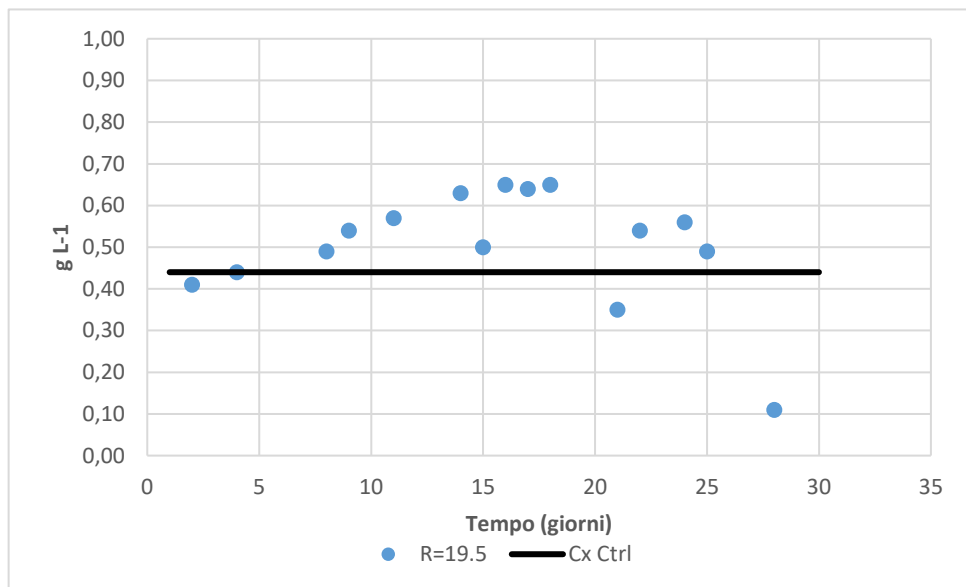


Figura 4.8: Crescita di *A. maxima* in terreno riciclato al 95%

Come nel caso limite mostrato al paragrafo precedente, la concentrazione di biomassa non ha raggiunto uno stazionario. Nel sistema con riciclo al 95% il reintegro dei nutrienti è stato effettuato tramite la portata del 5% di terreno fresco, e la loro concentrazione è stata monitorata nel tempo. La coltura non è mai arrivata a condizioni limitanti.

4.3.1.3 Riciclo R=3; R=5,6 e R=9

Una volta valutati rapporti di riciclo più alti si è scelto valutare il ricircolo di volumi più bassi di reintegro, con lo scopo di trovare un rapporto adatto per la coltivazione in continuo. Si è quindi indagato un riciclo del 75%, corrispondente ad un rapporto di riciclo uguale a 3, trovando che tale rapporto di riciclo permette l'ottenimento di uno stazionario con concentrazioni cellulari uguali alle condizioni di controllo. Sono stati indagati anche i rapporti uguali a 5,6 (85%) e 9 (90%). Per ottimizzare il consumo di acqua, infatti, è auspicabile riciclare quanto più possibile. Anche nei due casi R = 5.6 e R = 9 si sono raggiunti valori di concentrazione di biomassa medi allo stato stazionario uguali al controllo. I diversi valori medi sono stati analizzati con Anova one-way e vengono mostrati con le relative deviazioni standard in *Figura 4.9*.

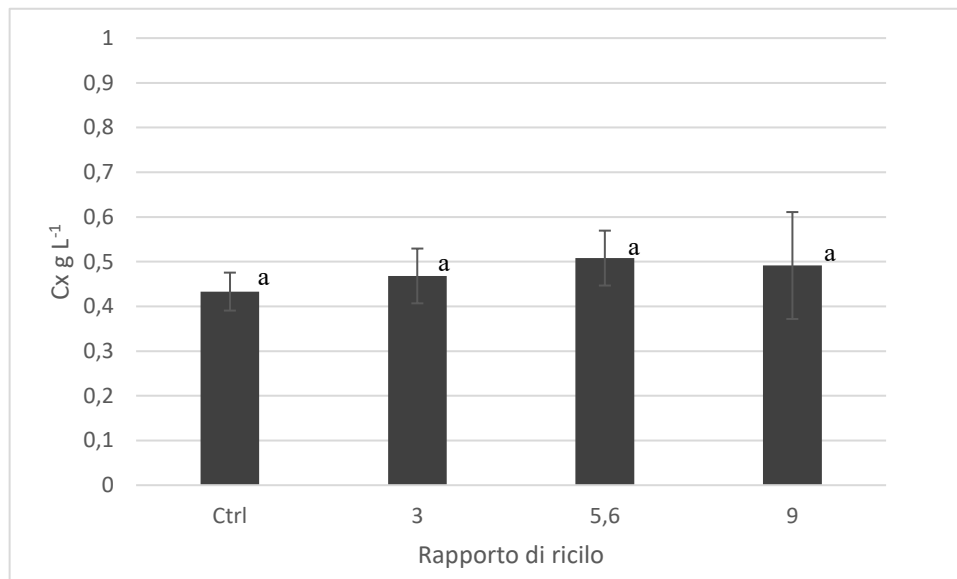


Figura 4.9: Concentrazione cellulare di *A. maxima* nel controllo e per diversi rapporti di riciclo; lettere diverse corrispondono a una differenza significativa tra i dati per $p < 0.05$

Il reintegro dei nutrienti è stato effettuato attraverso la portata di terreno fresco, trovando rese del *uptake* di fosforo paragonabili al controllo, ad esempio nel caso del riciclo al 75%, $Y_{P/X}$ del $0,42 \pm 0,001$ e consumo di azoto $Y_{N/X}$ del $6,0\% \pm 0,0002$.

Gli esperimenti hanno avuto una durata tale da garantire un ricambio totale del mezzo per più di due volte ($> 2 \cdot \text{HTR}$), pertanto si può ritenere che gli esperimenti abbiano raggiunto effettivamente uno stato stazionario.

4.3.2 Inibizione della crescita: possibile ruolo degli EPS

Si sa da studi in batch che metaboliti secondari, nutrienti non consumati e detriti cellulari si accumulano nel mezzo riciclato (Depraetere et al., 2015). Questi causano diversi cambiamenti nelle proprietà fisiche del mezzo, come l'aumento dell'alcalinità, la concentrazione incerta di nutrienti, un maggiore rischio di contaminazione di altri microrganismi, con conseguenti effetti negativi sulla coltivazione di *Arthrospira* (Li et al., 2022). La materia organica disciolta (DOM), potrebbe avere un effetto negativo sulla crescita delle microalghe nell'acqua riutilizzata, come indicato da diversi studi (Depraetere et al., 2015; H. Lu et al., 2019; Rodolfi et al., 2003). Nelle colture di microalghe, il DOM può provenire dalle stesse microalghe attraverso diversi meccanismi come la diffusione passiva, la lisi cellulare e l'essudazione attiva, come nel caso di *Arthrospira* sp. e la produzione di EPS (Z. Lu et al., 2020). Esaminando i risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi, in nessuna condizione proposta si ha avuto accumulo di proteine esterne, quindi ci si focalizzerà sugli esopolisaccaridi, che rappresentano il principale metabolita secondario trovato nel medium di riciclo. La produzione di EPS ed un loro possibile effetto sul *wash-out* riscontrato a rapporti di riciclo elevati è stato valutato durante gli esperimenti.

La concentrazione di EPS per i diversi rapporti di riciclo viene mostrata in *Figura 4.10* per le condizioni in cui è stato raggiunto il *wash-out*, e i valori medi per le condizioni a stazionario in *Figura 4.11*. Si evidenzia un aumento della concentrazione di EPS nel tempo negli esperimenti con riciclo superiore al 90%, mentre condizioni stabili sono state ottenute nelle restanti condizioni.

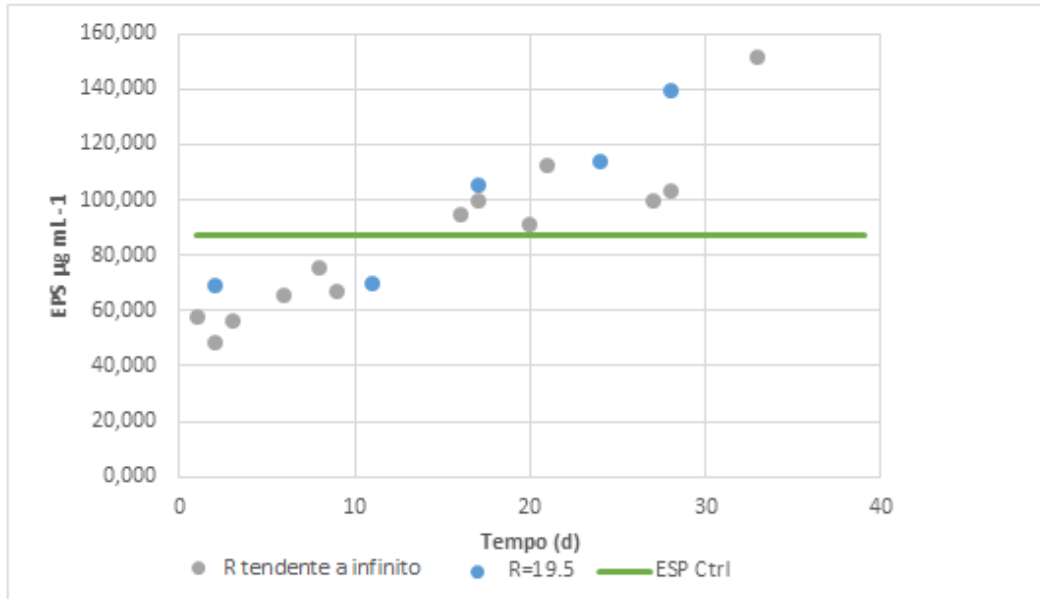


Figura 4.10: Concentrazione degli EPS nel tempo nelle condizioni con ricircolo R=19.5 e caso limite per *A. maxima*

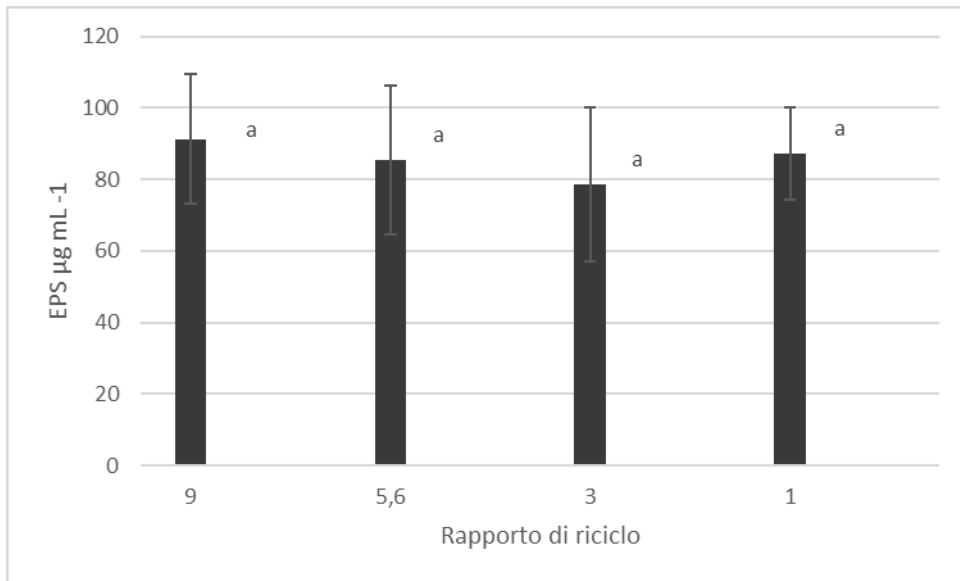


Figura 4.11: Produzione di EPS di *A. maxima* nel controllo e per diversi rapporti di ricircolo; lettere diverse corrispondono a una differenza significativa tra i dati per $p < 0.05$

Come si può notare alla fine degli esperimenti si hanno concentrazioni maggiori di esopolisaccaridi per il ricircolo al 100% e 95%.

Per spiegare in maniera quantitativa i risultati ottenuti relativamente a biomassa e accumulo di EPS sono stati applicati i bilanci di materia per i diversi HRT analizzati, rifacendosi allo schema riportato in *Figura 4.12*.

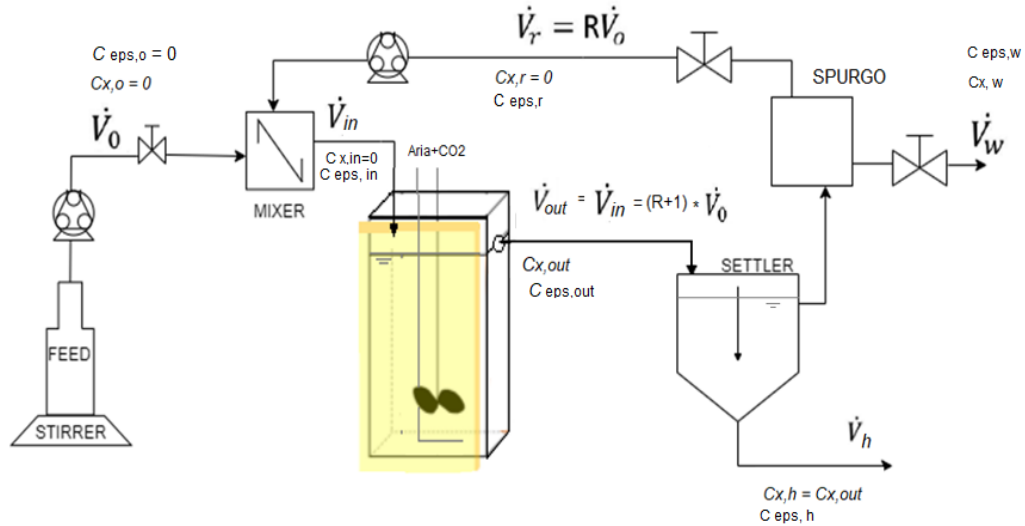


Figura 4.12: Schema processo in continuo con riciclo del medium, riadattato da Barbera et al., 2020.

Nei casi di riciclo al 75%, 85% e 90%, essendo stato raggiunto lo stazionario, non si hanno cambiamenti della produzione nel tempo. Inoltre, nel sistema utilizzato non si ha riciclo di biomassa, che esce dal reattore e viene separata al sedimentatore, $C_{x,in}$, C_{xr} e C_{x0} sono uguali a 0. Risolvendo il bilancio per la biomassa al reattore a stazionario, si può notare che la concentrazione dipende unicamente da SRT, infatti:

$$C_{x,out} = r_x \dot{V}_r / \dot{V}_{out} = r_x * SRT \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Invece, nel caso degli EPS si ha una dipendenza anche dalla portata in ingresso, essendo questi presenti nella stream di riciclo:

$$C_{eps,out} = (C_{eps,in} \dot{V}_{in} + Y_{eps} * r_s * \dot{V}_r) / \dot{V}_{out} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

La cinetica di formazione degli EPS, quindi del loro possibile accumulo, viene messa in relazione alla cinetica di crescita della biomassa tramite un termine di resa. Come mostrato in figura 4.13 e nella *Tabella 4.3* quando viene raggiunto uno stato stazionario, anche gli EPS sono stabili nel tempo. Questi invece aumentano molto,

con valori di resa superiori a $300 \mu\text{g g}^{-1}$ quando non viene raggiunto lo stazionario, ad indicare un effetto tossico del loro accumulo.

Tabella 4.3: Valori di concentrazione di biomassa e produzione di EPS per le varie condizioni di riciclo; lettere diverse corrispondono a una differenza significativa tra i dati per $p < 0.05$. Nel caso 100% e 95% si riporta il valore degli EPS a fine esperimento prima del wash out della coltura, negli altri casi vengono riportati i valori medi a stazionario.

Riciclo	SRT (d)	\dot{V}_0 (mLd^{-1})	HRT (d)	Durata esperimento (d)	C_X (g L^{-1})	EPS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$Y_{\text{EPS}/X}$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
100%	1,2	-	Tendente a infinito	33 giorni No stazionario	w.o.	$164,31 \pm$ $6,31$	>300
95%	1,2	14,6	23,97	28 No stazionario	w.o.	$139,74 \pm$ $1,78$	>300
90%	1,2	29,2	11,99	40 giorni stazionario	$0,49 \pm$ $0,11^a$	$91,20 \pm$ $18,06^a$	$160,9 \pm$ $19,53$
85%	1,2	43,8	7,99	25 giorni stazionario	$0,51 \pm$ $0,061^a$	$85,29 \pm$ $20,80^a$	$139,11 \pm$ $17,31$
75%	1,2	73	4,79	39 giorni stazionario	$0,47 \pm$ $0,06^a$	$78,64 \pm$ $21,50^a$	$134,27 \pm$ $14,8$
0%	1,2	292	1,20	26 giorni stazionario	$0,43 \pm$ $0,04^a$	$87,22 \pm$ $12,86^a$	$125,32 \pm$ $17,6$

In termini di concentrazione, la presunta tossicità degli EPS nel riciclo si può notare per valori maggiori di $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. L'effetto di tossicità, tuttavia, non sembra legato alla concentrazione di EPS, in quanto questa risulta paragonabile a quella riscontrata a tau 2 e 3 giorni, quanto piuttosto all'aumentato rapporto EPS su biomassa, con il wash out della coltura per rapporti superiori a $300 \mu\text{g g}^{-1}$. La presenza di EPS interferisce anche con altre fasi del processo di produzione, rallentando la velocità di filtrazione durante la raccolta, molto probabilmente a causa di un aumento della viscosità del terreno di coltura (Cuellar-Bermudez et al., 2023). Nello studio di Depraetere et al. (2015) l'inibizione degli EPS sulla crescita di *Arthrospira sp.* è stata indagata anche tramite l'aggiunta di una concentrazione di esopolisaccaridi simile alle concentrazioni raggiunte nel riciclo, ad una coltura in terreno fresco. Essi hanno riscontrato una riduzione del tasso di crescita, ma con un effetto non significativo, inferiore alla riduzione della crescita osservata in coltura con riciclo ripetuto nel tempo. Ciò suggerisce che i polisaccaridi hanno un ruolo importante nella riduzione del tasso di crescita in una coltura con terreno riciclato,

ma anche altri fattori sono da considerare (Depraetere et al., 2015). L'inibizione può essere causata anche da molecole più piccole come gli acidi grassi liberi, come è stato osservato nelle colture di *Monodus* sp. (Bosma et al., 2008).

4.3.3 Composizione della biomassa

La composizione interna della biomassa, in termini di accumulo di carboidrati e produzione di pigmenti è stata analizzata nei due estremi di riciclo, più basso con R=3 e più alto con reintegro minimo. L'accumulo di carboidrati è risultato simile in entrambe le condizioni con valori medi uguali al controllo (*Tabella 4.4*):

Tabella 4.4: Accumulo di carboidrati nella coltivazione di *A. maxima* in condizioni di controllo, R 100% e R 75%

Carboidrati/C _x %	R 100%	R 75%	Ctrl
	36,89 ± 0,10	33,16 ± 0,05	35,17 ± 0,05

Per quanto riguarda la variazione della concentrazione di pigmenti, nel riciclo con minimo reintegro si ha una progressiva diminuzione della produzione in corrispondenza con la diminuzione della concentrazione cellulare. Si osserva un massimo di produzione al primo giorno di coltura, con valori del $7,02 \pm 0,23 \mu\text{g g}^{-1}$ per la clorofilla a e del $1,88 \pm 0,45 \mu\text{g mL}^{-1}$ per i carotenoidi per arrivare ad un minimo di $2,25 \pm 1,01 \mu\text{g g}^{-1}$ di chl-a e $0,73 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ carotenoidi al ventesimo giorno. Dopo il ventesimo giorno a causa della progressiva riduzione della concentrazione cellulare le rese dei pigmenti su biomassa diventano non più applicabili. Per il riciclo al 75%, essendo stato raggiunto uno stazionario di produzione è stato possibile valutare il contenuto di pigmenti a stazionario rispetto alla biomassa, con valori medi del $6,68 \pm 1,69 \mu\text{g g}^{-1}$ di clorofilla e del $2,34 \pm 0,85 \mu\text{g g}^{-1}$ di carotenoidi, simili alla produzione nel controllo. La diminuzione dei pigmenti durante il riciclo si riscontra anche in letteratura (Andrade et al., 2019), dove la minor concentrazione di pigmenti è spesso associata ad esperimenti eseguiti in batch o fed-batch dove ad ogni ciclo di riciclo corrispondono produttività minori.

In conclusione, riciclare fino a un rapporto di riciclo di 9 in sistemi in continuo permette di ottenere prestazioni simili di *A. maxima* nel terreno riciclato e fresco. L'esperimento a R=9 è stato condotto per 40 giorni a stazionario. Utilizzando Zarrouk fresco per la coltivazione di *A. maxima* per 40 giorni, con una portata in

ingresso di 292 mL d^{-1} sarebbero necessari $11,64 \text{ L}$ di acqua. L'utilizzo di un rapporto di riciclo R uguale a 9 ha permesso di ottimizzare al 90% la richiesta di acqua e nutrienti, con $1,164 \text{ L}$ di acqua richiesti. Portato su larga scala, un processo in continuo con riciclo potrebbe effettivamente permettere di produrre quantità costanti di biomassa risparmiando allo stesso tempo notevoli quantità di acqua.

Conclusioni

Lo scopo del presente lavoro di tesi sperimentale è stato lo studio di diversi rapporti di riciclo sulle prestazioni di *Arthrospira maxima* in continuo, al fine di ridurre il consumo di acqua nel processo e lo spreco di nutrienti, per una produzione su larga scala più ecosostenibile.

Inizialmente, è stato studiato l'effetto della concentrazione di bicarbonato di sodio nel terreno di coltura Zarrouk, per comprendere gli effetti dell'equilibrio carbonatico nel mezzo. Attraverso esperimenti a diverse concentrazioni di NaHCO_3 sia in batch (da 0 a 30 g L^{-1} ; con aria + 5% v/v di CO_2 e senza *bubbling* di aria) che in continuo (da 6 a 60 g L^{-1}) è stato dimostrato che la concentrazione di bicarbonato di sodio e l'aggiunta di CO_2 sono importanti per il mantenimento del pH stabile e l'*uptake* del carbonio con differenze sostanziali tra le due impostazioni. In batch, lo studio dell'effetto della concentrazioni di bicarbonato ha permesso di ottenere il valore della *half saturation constant* k_M che risulta parzialmente influenzata dal pH della coltura. L'aggiunta della CO_2 permette di mantenere pH più stabili, con conseguente mantenimento di alte concentrazioni dello ione bicarbonato in soluzione anche a concentrazioni basse di NaHCO_3 . In continuo invece, dal momento che la produzione di biomassa è maggiore, sono necessarie concentrazioni di bicarbonato molto più elevate. Il range testato è stato allargato molto, per verificare anche possibili effetti di inibizione ad alta concentrazione, che potrebbero verificarsi quando si effettua un riciclo del mezzo di coltura. Aumentando la concentrazione di bicarbonato fino a 60 g L^{-1} , la microalga ha subito cambiamenti nella composizione dovuti a stress salino. Infine, la CO_2 in coltura continua ha un ruolo nel mantenimento del pH della soluzione, ma con un impatto minore rispetto al bicarbonato di sodio, la cui continua aggiunta al reattore permette il mantenimento di un sistema tampone e il continuo rifornimento dello ione bicarbonato necessario ad *A. maxima* per la crescita.

Inoltre, sono stati condotti studi preliminari di crescita del cianobatterio sia in batch, per verificare l'eventuale accumulo di metaboliti nelle diverse fasi di crescita, che in continuo, variando il tempo di permanenza (1.2 giorni, 2 giorni e 3 giorni), per individuare un massimo di produttività. A tal fine, sono stati osservati i consumi di nutrienti e le variazioni nella composizione interna della biomassa, con focus sulla

presenza nel medium di composti organici potenzialmente inibenti come gli EPS. In continuo, la produttività maggiore è stata ottenuta ad un tempo di permanenza di 1.2 giorni, con una concentrazione di biomassa pari a $0,43 \pm 0,30 \text{ g L}^{-1}$ e una concentrazione di EPS pari a $87,2 \pm 12,86 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Tale condizione è stata scelta come controllo per il sistema con riciclo. Il riciclo è stato effettuato dopo separazione della biomassa dal medium e il reintegro ha interessato solo il medium, disaccoppiando quindi il tempo di permanenza del solido da quello del liquido (HRT>SRT). Sono stati testati diversi rapporti di riciclo, dal caso limite con reintegro minimo, a rapporti di riciclo R pari a 3, 5.6, 9 e 19.5. Con rapporti di riciclo elevati (> 9) la coltura non raggiunge la stabilità e si ha il *wash-out* della coltura, mentre riciclare fino al 90% del medium (R=9) ha permesso di ottenere concentrazioni di biomassa a stazionario uguali al controllo ($0,49 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$), risparmiando così il 90% di acqua necessaria alla coltura (da 11.64 L nel caso senza riciclo a soli 1.64 L di acqua pulita nel caso con ricircolo, con un reattore di volume 350 mL). Nelle diverse condizioni è stato quantificato l'accumulo di EPS nel medium trovando che tale rapporto si mantiene costante quando viene raggiunto lo stato stazionario, mentre rese sopra i $300 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ corrispondono ad un *wash-out* della coltura.

In generale, i risultati mostrano che il riciclo del medium in continuo può essere un'ottima strategia per ridurre il consumo di acqua e nutrienti nella coltivazione di *A. maxima*, ma occorre considerare con attenzione il rapporto di riciclo per non compromettere la produttività del cianobatterio.

Bibliografia

Ahmad, I., Abdullah, N., Koji, I., Yuzir, A., & Eva Muhammad, S. (2021). Evolution of Photobioreactors: A Review based on Microalgal Perspective. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1142(1), 012004. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1142/1/012004>

Ali, S., & Saleh, A. M. (2012). *SPIRULINA - AN OVERVIEW*. <https://www.semanticscholar.org/paper/SPIRULINA-AN-OVERVIEW-Ali-Saleh/b3cb124a472d6796ea49d0c9b659c90ef922a6ac>

Andrade, B. B., Cardoso, L. G., Assis, D. de J., Costa, J. A. V., Druzian, J. I., & da Cunha Lima, S. T. (2019a). Production and characterization of *Spirulina* sp. LEB 18 cultured in reused Zarrouk's medium in a raceway-type bioreactor. *Bioresource Technology*, 284, 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.144>

Andrade, B. B., Cardoso, L. G., Assis, D. de J., Costa, J. A. V., Druzian, J. I., & da Cunha Lima, S. T. (2019b). Production and characterization of *Spirulina* sp. LEB 18 cultured in reused Zarrouk's medium in a raceway-type bioreactor. *Bioresource Technology*, 284, 340–348. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.144>

Anto, S., Mukherjee, S. S., Muthappa, R., Mathimani, T., Deviram, G., Kumar, S. S., Verma, T. N., & Pugazhendhi, A. (2020). Algae as green energy reserve: Technological outlook on biofuel production. *Chemosphere*, 242, 125079. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125079>

Araujo, R., & Peteiro, C. (2021). *Algae as food and food supplements in Europe*. <https://doi.org/10.2760/049515>

Arias, D. M., Uggetti, E., & García, J. (2020). Assessing the potential of soil cyanobacteria for simultaneous wastewater treatment and carbohydrate-enriched biomass production. *Algal Research*, 51, 102042. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102042>

Barbera, E., Grandi, A., Borella, L., Bertuccio, A., & Sforza, E. (2019). Continuous Cultivation as a Method to Assess the Maximum Specific Growth Rate of Photosynthetic Organisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00274>

Barbera, E., Sforza, E., Grandi, A., & Bertuccio, A. (2020). Uncoupling solid and hydraulic retention time in photobioreactors for microalgae mass production: A model-based analysis. *Chemical Engineering Science*, 218, 115578. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2020.115578>

Belay, A. (2013). Biology and Industrial Production of *Arthrospira* (*Spirulina*). In A. Richmond & Q. Hu (A. c. Di), *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 339–358). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch17>

- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). COMPLEMENTARY CHROMATIC ADAPTATION IN A FILAMENTOUS BLUE-GREEN ALGA. *Journal of Cell Biology*, 58(2), 419–435. <https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419>
- Borella, L., Sforza, E., & Bertucco, A. (2021a). Effect of residence time in continuous photobioreactor on mass and energy balance of microalgal protein production. *New Biotechnology*, 64, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.05.006>
- Borella, L., Sforza, E., & Bertucco, A. (2021b). Effect of residence time in continuous photobioreactor on mass and energy balance of microalgal protein production. *New Biotechnology*, 64, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.05.006>
- Bosma, R., Miazek, K., Willemsen, S. m., Vermuë, M. h., & Wijffels, R. h. (2008). Growth inhibition of *Monodus subterraneus* by free fatty acids. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(5), 1108–1114. <https://doi.org/10.1002/bit.21963>
- Cogne, G., Gros, J.-B., & Dussap, C.-G. (2003). Identification of a metabolic network structure representative of *arthrospira (spirulina) platensis* metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(6), 667–676. <https://doi.org/10.1002/bit.10808>
- Costa, J. A. V., Freitas, B. C. B., Rosa, G. M., Moraes, L., Morais, M. G., & Mitchell, B. G. (2019). Operational and economic aspects of *Spirulina*-based biorefinery. *Bioresource Technology*, 292, 121946. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121946>
- Cuellar-Bermudez, S. P., Bleus, D., Mees, M. A., Struyf, T., Lama, S., Vandamme, D., Adriaensens, P., Scherrers, R., Thielemans, W., Van den Ende, W., Wattiez, R., & Muylaert, K. (2023). Isolation, purification, and metal-induced gelation of released polysaccharides from spent culture medium of *Arthrospira*. *Algal Research*, 103010. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103010>
- Daneshvar, E., Wicker, R. J., Show, P.-L., & Bhatnagar, A. (2022). Biologically-mediated carbon capture and utilization by microalgae towards sustainable CO₂ biofixation and biomass valorization – A review. *Chemical Engineering Journal*, 427, 130884. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130884>
- de Farias Silva, C. E., & Sforza, E. (2016). Carbohydrate productivity in continuous reactor under nitrogen limitation: Effect of light and residence time on nutrient uptake in *Chlorella vulgaris*. *Process Biochemistry*, 51(12), 2112–2118. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.015>
- De Farias Silva, C. E., Sforza, E., & Bertucco, A. (2017). Effects of pH and Carbon Source on *Synechococcus* PCC 7002 Cultivation: Biomass and Carbohydrate Production with Different Strategies for pH Control. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(2), 682–698. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2241-2>
- Depraetere, O., Pierre, G., Noppe, W., Vandamme, D., Foubert, I., Michaud, P., & Muylaert, K. (2015). Influence of culture medium recycling on the performance of

- Arthrospira platensis cultures. *Algal Research*, 10, 48–54.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.014>
- Fanka, L. S., da Rosa, G. M., de Moraes, M. G., & Costa, J. A. V. (2022). Outdoor Production of Biomass and Biomolecules by Spirulina (Arthrospira) and Synechococcus cultivated with Reduced Nutrient Supply. *BioEnergy Research*, 15(1), 121–130.
<https://doi.org/10.1007/s12155-021-10320-1>
- Farooq, W., Suh, W. I., Park, M. S., & Yang, J.-W. (2015). Water use and its recycling in microalgae cultivation for biofuel application. *Bioresource Technology*, 184, 73–81.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.140>
- Fernandes, B. D., Mota, A., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2015). Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: Approaches, applications and future trends. *Biotechnology Advances*, 33(6, Part 2), 1228–1245.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.004>
- Fernández, F. G. A., Reis, A., Wijffels, R. H., Barbosa, M., Verdelho, V., & Llamas, B. (2021). The role of microalgae in the bioeconomy. *New Biotechnology*, 61, 99–107.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.11.011>
- Figler, A., B-Béres, V., Dobronoki, D., Márton, K., Nagy, S. A., & Bácsi, I. (2019). Salt Tolerance and Desalination Abilities of Nine Common Green Microalgae Isolates. *Water*, 11(12), Artigo 12. <https://doi.org/10.3390/w11122527>
- Fon Sing, S., Isdepsky, A., Borowitzka, M. A., & Lewis, D. M. (2014). Pilot-scale continuous recycling of growth medium for the mass culture of a halotolerant Tetraselmis sp. in raceway ponds under increasing salinity: A novel protocol for commercial microalgal biomass production. *Bioresource Technology*, 161, 47–54.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.010>
- Gonçalves, G. C., Nazari, M. T., Magro, F. G. G., Margarites, A. C. F., & Colla, L. M. (2022). Effects of culture medium recycling in the chemical composition of Spirulina platensis biomass cultivated in semi-continuous mode. *Ciência e Natura*, 44, e52–e52.
<https://doi.org/10.5902/2179460X69474>
- Gorgich, M., Mata, T. M., Martins, A. A., Branco-Vieira, M., & Caetano, N. S. (2020). Comparison of different lipid extraction procedures applied to three microalgal species. *Energy Reports*, 6, 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2019.09.011>
- Hadj-Romdhane, F., Jaouen, P., Pruvost, J., Grizeau, D., Van Vooren, G., & Bourseau, P. (2012). Development and validation of a minimal growth medium for recycling Chlorella vulgaris culture. *Bioresource Technology*, 123, 366–374.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.085>
- Hamouda, R. A., Hussein, M. H., Elhadary, A. M. A., & Abuelmagd, M. A. (2020). Extruded polysaccharide/protein matrix from Arthrospira platensis cultures mediated silver

nanoparticles biosynthesis and capping. *Applied Nanoscience*, 10(10), 3839–3855.
<https://doi.org/10.1007/s13204-020-01490-z>

Ismail, M. M. S., El-Ayouty, Y. M., & Piercey-Normore, M. (2016). Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.003>

Jerney, J., & Spilling, K. (2020). Large Scale Cultivation of Microalgae: Open and Closed Systems. In K. Spilling (A c. Di), *Biofuels from Algae: Methods and Protocols* (pp. 1–8). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9813-0_130

Kim, T., Choi, W.-S., Ye, B.-R., Heo, S.-J., Oh, D., Kim, S., Choi, K.-S., & Kang, D.-H. (2018). Cultivating *Spirulina maxima*: Innovative Approaches. In A. Tiwari (A c. Di), *Cyanobacteria*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74265>

Klanchui, A., Vorapreeda, T., Vongsangnak, W., Khannapho, C., Cheevadhanarak, S., & Meechai, A. (2012). SYSTEMS BIOLOGY AND METABOLIC ENGINEERING OF ARTHROSPIRA CELL FACTORIES. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4), e201210015. <https://doi.org/10.5936/csbj.201210015>

Lafarga, T., Fernández-Sevilla, J. M., González-López, C., & Acién-Fernández, F. G. (2020). *Spirulina* for the food and functional food industries. *Food Research International*, 137, 109356. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109356>

Lafarga, T., Sánchez-Zurano, A., Villaró, S., Morillas-España, A., & Acién, G. (2021). Industrial production of spirulina as a protein source for bioactive peptide generation. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.018>

Li, Z., Liu, Y., Zhou, T., Cao, L., Cai, Y., Wang, Y., Cui, X., Yan, H., Ruan, R., & Zhang, Q. (2022). Effects of Culture Conditions on the Performance of *Arthrospira platensis* and Its Production of Exopolysaccharides. *Foods*, 11(14), Artículo 14. <https://doi.org/10.3390/foods11142020>

Loftus, S. E., & Johnson, Z. I. (2017). Cross-study analysis of factors affecting algae cultivation in recycled medium for biofuel production. *Algal Research*, 24, 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.007>

López-Rodríguez, A., Mayorga, J., Flaig, D., Fuentes, G., Cotabarren, J., Obregón, W. D., & Gómez, P. I. (2021). Comparison of two strains of the edible cyanobacteria *Arthrospira*: Biochemical characterization and antioxidant properties. *Food Bioscience*, 42, 101144. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101144>

Lu, H., Cheng, J., Zhu, Y., Li, K., Tian, J., & Zhou, J. (2019). Responses of *Arthrospira* ZJU9000 to high bicarbonate concentration (HCO₃⁻: 171.2 mM): How do biomass productivity and lipid content simultaneously increase? *Algal Research*, 41, 101531. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101531>

- Lu, Z., Loftus, S., Sha, J., Wang, W., Park, M. S., Zhang, X., Johnson, Z. I., & Hu, Q. (2020). Water reuse for sustainable microalgae cultivation: Current knowledge and future directions. *Resources, Conservation and Recycling*, *161*, 104975. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2020.104975>
- Madkour, F. F., Kamil, A. E.-W., & Nasr, H. S. (2012). Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, *38*(1), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2012.09.003>
- Malchira, N., Mehar, J., Mudliar, S., & Shekh, A. (2019). Recent Advances in Microalgal Bioactives for Food, Feed, and Healthcare Products: Commercial Potential, Market Space, and Sustainability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12500>
- Markou, G., Angelidaki, I., Nerantzis, E., & Georgakakis, D. (2013). Bioethanol Production by Carbohydrate-Enriched Biomass of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *Energies*, *6*(8), Articolo 8. <https://doi.org/10.3390/en6083937>
- Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, *88*(10), 3389–3401. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.042>
- Markou, G., Kougia, E., Arapoglou, D., Chentir, I., Andreou, V., & Tzovenis, I. (2023). Production of *Arthrospira platensis*: Effects on Growth and Biochemical Composition of Long-Term Acclimatization at Different Salinities. *Bioengineering*, *10*(2), Articolo 2. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020233>
- Markou, G., Vandamme, D., & Muylaert, K. (2014). Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Research*, *65*, 186–202. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.025>
- Masojídek, J., Sergejevová, M., Malapascua, J. R., & Kopecký, J. (2015). Thin-Layer Systems for Mass Cultivation of Microalgae: Flat Panels and Sloping Cascades. In A. Prokop, R. K. Bajpai, & M. E. Zappi (A c. Di), *Algal Biorefineries* (pp. 237–261). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_7
- Matsudo, M. C., Bezerra, R. P., Sato, S., Converti, A., & de Carvalho, J. C. M. (2012). Photosynthetic efficiency and rate of CO₂ assimilation by *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* continuously cultivated in a tubular photobioreactor. *Biotechnology Journal*, *7*(11), 1412–1417. <https://doi.org/10.1002/biot.201200177>
- Mehar, J., Shekh, A., M. U., N., Sarada, R., Chauhan, V. S., & Mudliar, S. (2019). Automation of pilot-scale open raceway pond: A case study of CO₂-fed pH control on *Spirulina* biomass, protein and phycocyanin production. *Journal of CO₂ Utilization*, *33*, 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.07.006>

- M. Figueroa-Torres, G., K. Pittman, J., & Theodoropoulos, C. (2022). A highly productive mixotrophic fed-batch strategy for enhanced microalgal cultivation. *Sustainable Energy & Fuels*, 6(11), 2771–2782. <https://doi.org/10.1039/D2SE00124A>
- Moreira, J. B., Vaz, B. da S., Cardias, B. B., Cruz, C. G., Almeida, A. C. A. de, Costa, J. A. V., & Morais, M. G. de. (2022). Microalgae Polysaccharides: An Alternative Source for Food Production and Sustainable Agriculture. *Polysaccharides*, 3(2), Artigo 2. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3020027>
- Norhasyima, R. S., & Mahlia, T. M. I. (2018). Advances in CO₂ utilization technology: A patent landscape review. *Journal of CO₂ Utilization*, 26, 323–335. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.05.022>
- Oliveira, M. A. C. L. de, Monteiro, M. P. C., Robbs, P. G., & Leite, S. G. F. (1999). Growth and Chemical Composition of *Spirulina Maxima* and *Spirulina Platensis* Biomass at Different Temperatures. *Aquaculture International*, 7(4), 261–275. <https://doi.org/10.1023/A:1009233230706>
- Pandey, B., Jha, S., Mishra, V., Singh, R., Dikshit, A., & Shukla, S. (2021). *SPIRULINA AND AQUACULTURE: A NEW HOPE FROM EARTH TO SKY*. 126–136.
- Papini, A., Falsini, S., & Karssa, T. (2021). *Taxonomy and Species Delimitation in Cyanobacteria*. <https://doi.org/10.20944/preprints202103.0212.v1>
- Pastore, M., Primavera, A., Milocco, A., Barbera, E., & Sforza, E. (2022). Tuning the Solid Retention Time to Boost Microalgal Productivity and Carbon Exploitation in an Industrial Pilot-Scale LED Photobioreactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 61(23), 7739–7747. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.2c01031>
- Pedersen, O., Colmer, T., & Sand-Jensen, K. (2013). Underwater Photosynthesis of Submerged Plants – Recent Advances and Methods. *Frontiers in plant science*, 4, 140. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00140>
- Peter, A. P., Koyande, A. K., Chew, K. W., Ho, S.-H., Chen, W.-H., Chang, J.-S., Krishnamoorthy, R., Banat, F., & Show, P. L. (2022). Continuous cultivation of microalgae in photobioreactors as a source of renewable energy: Current status and future challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 154, 111852. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111852>
- Phélippé, M., Gonçalves, O., Thouand, G., Cogne, G., & Laroche, C. (2019). Characterization of the polysaccharides chemical diversity of the cyanobacteria *Arthrospira platensis*. *Algal Research*, 38, 101426. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101426>
- Ragaza, J. A., Hossain, Md. S., Meiler, K. A., Velasquez, S. F., & Kumar, V. (2020). A review on *Spirulina*: Alternative media for cultivation and nutritive value as an aquafeed. *Reviews in Aquaculture*, 12(4), 2371–2395. <https://doi.org/10.1111/raq.12439>

- Raouf, B., Kaushik, B. D., & Prasanna, R. (2006). Formulation of a low-cost medium for mass production of Spirulina. *Biomass and Bioenergy*, *30*(6), 537–542. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2005.09.006>
- Ravelonandro, P. H., Ratianarivo, D. H., Joannis-Cassan, C., Isambert, A., & Raherimandimby, M. (2011). Improvement of the growth of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO₂ addition. *Food and Bioprocess Processing*, *89*(3), 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.009>
- Reichert, C. C., Reinehr, C. O., & Costa, J. a. V. (2006). Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *23*, 23–28. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322006000100003>
- Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Barsanti, L., Rosati, G., & Tredici, M. R. (2003). Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. Mass cultivation. *Biomolecular Engineering*, *20*(4), 243–248. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00063-7)
- Sánchez-Bayo, A., Morales, V., Rodríguez, R., Vicente, G., & Bautista, L. F. (2020). Cultivation of Microalgae and Cyanobacteria: Effect of Operating Conditions on Growth and Biomass Composition. *Molecules*, *25*(12), Artículo 12. <https://doi.org/10.3390/molecules25122834>
- Sathinathan, P., Parab, H. M., Yusoff, R., Ibrahim, S., Vello, V., & Ngho, G. C. (2023). Photobioreactor design and parameters essential for algal cultivation using industrial wastewater: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *173*, 113096. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.113096>
- Saxena, R., Rodríguez-Jasso, R. M., Chávez-Gonzalez, M. L., Aguilar, C. N., Quijano, G., & Ruiz, H. A. (2022). Strategy Development for Microalgae *Spirulina platensis* Biomass Cultivation in a Bubble Photobioreactor to Promote High Carbohydrate Content. *Fermentation*, *8*(8), Artículo 8. <https://doi.org/10.3390/fermentation8080374>
- Sforza, E., Calvaruso, C., Meneghesso, A., Morosinotto, T., & Bertucco, A. (2015). Effect of specific light supply rate on photosynthetic efficiency of *Nannochloropsis salina* in a continuous flat plate photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(19), 8309–8318. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6876-7>
- Shimamatsu, H. (2004). Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia*, *512*(1), 39–44. <https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000020364.23796.04>
- Sierra, E., Acien, F. G., Fernández, J. M., García, J. L., González, C., & Molina, E. (2008). Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chemical Engineering Journal*, *138*(1), 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.06.004>
- Sili, C., Torzillo, G., & Vonshak, A. (2012a). *Arthrospira* (*Spirulina*). In B. A. Whitton (A c. Di), *Ecology of Cyanobacteria II* (pp. 677–705). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_25

- Sili, C., Torzillo, G., & Vonshak, A. (2012b). *Arthrospira* (Spirulina). In B. A. Whitton (A c. Di), *Ecology of Cyanobacteria II* (pp. 677–705). Springer Netherlands.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_25
- Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2017). Spirulina – From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *69*, 157–171.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.010>
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *101*(2), 87–96.
<https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Stunda-Zujeva, A. (2020). Review of *Spirulina/Arthrospira* Growth Medium Modifications. *Key Engineering Materials*, *850*, 153–158.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.850.153>
- Thevarajah, B., Nishshanka, G. K. S. H., Premaratne, M., Nimarshana, P. H. V., Nagarajan, D., Chang, J.-S., & Ariyadasa, T. U. (2022). Large-scale production of Spirulina-based proteins and c-phycocyanin: A biorefinery approach. *Biochemical Engineering Journal*, *185*, 108541. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108541>
- Trabelsi, L., M'sakni, N. H., Ben Ouada, H., Bacha, H., & Roudesli, S. (2009). Partial characterization of extracellular polysaccharides produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *14*(1), 27–31.
<https://doi.org/10.1007/s12257-008-0102-8>
- Ugwu, C., Ogbonna, J., & Tanaka, H. (2002). Improvement of mass transfer characteristics and productivities of inclined tubular photobioreactors by installation of internal static mixers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *58*(5), 600–607.
<https://doi.org/10.1007/s00253-002-0940-9>
- Vasumathi, K. K., Premalatha, M., & Subramanian, P. (2012). Parameters influencing the design of photobioreactor for the growth of microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *16*(7), 5443–5450. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.06.013>
- Vazquez, C. F., & Sanchez, L. J. (2022, ottobre 3). *An overview of the algae industry in Europe*. JRC Publications Repository. <https://doi.org/10.2760/813113>
- Vonshak, A., & Tomaselli, L. (2002). *Arthrospira* (Spirulina): Systematics and Ecophysiology. In B. A. Whitton & M. Potts (A c. Di), *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space* (pp. 505–522). Springer Netherlands.
https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7_18
- Wang, B., Lan, C. Q., & Horsman, M. (2012). Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advances*, *30*(4), 904–912.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.019>

Wei, Y.-M., Kang, J.-N., Liu, L.-C., Li, Q., Wang, P.-T., Hou, J.-J., Liang, Q.-M., Liao, H., Huang, S.-F., & Yu, B. (2021). A proposed global layout of carbon capture and storage in line with a 2 °C climate target. *Nature Climate Change*, *11*(2), Articolo 2. <https://doi.org/10.1038/s41558-020-00960-0>

Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, *144*(3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

Yu, J., Hu, H., Wu, X., Wang, C., Zhou, T., Liu, Y., Ruan, R., & Zheng, H. (2019). Continuous cultivation of *Arthrospira platensis* for phycocyanin production in large-scale outdoor raceway ponds using microfiltered culture medium. *Bioresource Technology*, *287*, 121420. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121420>

Yuan, D., Yao, M., Wang, L., Li, Y., Gong, Y., & Hu, Q. (2019). Effect of recycling the culture medium on biodiversity and population dynamics of bio-contaminants in *Spirulina platensis* mass culture systems. *Algal Research*, *44*, 101718. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101718>

Zafar, A. M., Javed, M. A., Aly Hassan, A., Mehmood, K., & Sahle-Demessie, E. (2021). Recent updates on ions and nutrients uptake by halotolerant freshwater and marine microalgae in conditions of high salinity. *Journal of Water Process Engineering*, *44*, 102382. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102382>

Zhu, L. D., Takala, J., Hiltunen, E., & Wang, Z. M. (2013). Recycling harvest water to cultivate *Chlorella zofingiensis* under nutrient limitation for biodiesel production. *Bioresource Technology*, *144*, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.061>

Zijffers, J.-W. F., Janssen, M., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2008). Design Process of an Area-Efficient Photobioreactor. *Marine Biotechnology*, *10*(4), 404–415. <https://doi.org/10.1007/s10126-007-9077-2>

Zuccaro, G., Yousuf, A., Pollio, A., & Steyer, J.-P. (2019). *Microalgae Cultivation Systems* (pp. 11–29). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817536-1.00002-3>

Siti web:

<https://www.vantagemarketresearch.com/industry-report/spirulina-market-2001>