

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



**Adattamento cromatico in consorzi microalgali come
strategia per aumentare l'efficienza di conversione
energetica di fotobioreattori LED**

Relatore: Prof.ssa Eleonora Sforza
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Correlatore: Dr.ssa Lisa Borella
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Controrelatore: Prof. Roberto Battistutta
Dipartimento di Scienze Chimiche

Laureando: Danilo Marchese

Anno Accademico 2021/2022

ABSTRACT

Le microalghe rappresentano una delle potenziali alternative sostenibili ai processi tradizionali di produzione di *chemicals* ed energia. Lo sviluppo di fotobioreattori illuminati artificialmente per la loro coltivazione ha contribuito negli ultimi anni ad aumentare la produttività ma presenta ancora dei limiti. Infatti, la scarsa capacità di convertire l'energia luminosa rende i costi di produzione in questi sistemi proibitivi. Le lampade LED monocromatiche e ad alta efficienza possono rappresentare una soluzione, ma sono state scarsamente adoperate in tal senso. L'obiettivo principale è trovare le condizioni in cui sia massimizzata l'efficienza di conversione energetica di un sistema illuminato artificialmente. Questa tesi, quindi, mira a ottimizzare ulteriormente l'efficienza di conversione energetica sfruttando l'adattamento cromatico complementare (CCA), meccanismo evoluto nei cianobatteri per assorbire con maggiore efficacia le lunghezze d'onda attive fotosinteticamente. Nel presente lavoro di tesi sperimentale è stato sfruttato il CCA del cianobatterio *T. tenuis*, coltivato in consorzio con la microalga verde *S. obliquus*, per aumentare l'efficienza di conversione energetica in fotobioreattori in continuo illuminati artificialmente con lampade LED monocromatiche e ad alta efficienza. Si è osservato che, a fronte di produttività comparabili con quelle attuali, a basse intensità d'illuminazione è possibile raggiungere un'efficienza di conversione energetica maggiore (21,96%) rispetto alle singole specie, abbassando anche i costi per l'illuminazione. In un'ottica di "biorefinery" il consorzio è stato studiato per la produzione di ficobiliproteine, molecole di alto valore commerciale, e la biomassa rimanente è stata valorizzata testandone l'attività biostimolante in semi di cetriolo (*Cucumis sativus*).

INDICE

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE	1
1.1 SOSTENIBILITÀ: STATO DELL’ARTE E PROSPETTIVE.....	1
1.2 MICROALGHE.....	2
1.2.1 Fotosintesi Ossigenica.....	2
1.2.1.1 Pigmenti Fotosintetici	3
1.2.1.2 Radiazione Luminosa e Photosynthetically Active Radiation (PAR).....	3
1.2.1.3 Fase Luminosa della Fotosintesi	5
1.2.2 Microalghe: classificazione e caratteristiche.....	6
1.2.2.1 <i>Chlorophyta</i>	7
1.2.2.2 <i>Cyanophyta</i>	7
1.2.3 Coltivazione e applicazioni delle microalghe	8
1.2.3.1 Fattori che influenzano la crescita microalgale	8
1.2.3.2 Modalità Batch e Fed-Batch.....	10
1.2.3.3 Modalità in Continuo	11
1.2.3.4 Sistema Aperto: Open Ponds.....	13
1.2.3.5 Sistema Chiuso: Fotobioreattori.....	13
1.2.3.6 Confronto tra sistema aperto e sistema chiuso	14
1.2.3.7 Illuminazione Artificiale	14
1.2.3.8 Stato dell’Arte e Applicazioni.....	16
1.2.3.9 Microalghe come “ <i>Biorefineries</i> ”.....	18
1.3 CIANOBATTERI E ADATTAMENTO CROMATICO COMPLEMENTARE (CCA).....	20
1.3.1 Fotosintesi e Ficobiliproteine (PBPs).....	20
1.3.2 Applicazioni delle PBPs.....	22
1.3.3 Adattamento Cromatico Complementare (CCA).....	23
1.3.3.1 CA di <i>tipo I</i> e di <i>tipo II</i>	24
1.3.3.2 CA di <i>tipo III</i>	24
1.3.3.3 Potenzialità Biotecnologiche e Industriali del CCA.....	26
1.4 MICROALGHE COME BIOSTIMOLANTI AGRICOLI.....	28
1.4.1 Biostimolanti tradizionali.....	28
1.4.2 Microalghe come Biostimolanti	30
1.4.2.1 Molecole Bioattive	30
1.4.2.2 Applicazioni delle microalghe come biostimolanti.....	31
1.5 SCOPO DELLA TESI.....	33

CAPITOLO 2 – MATERIALI E METODI	35
2.1 SPECIE COLTIVATE E CONDIZIONI DI CRESCITA.....	35
2.2 SISTEMA DI ILLUMINAZIONE	36
2.3 SISTEMI DI COLTIVAZIONE.....	38
2.3.1 Esperimenti in Batch	38
2.3.1.1 Analisi Respirometrica.....	39
2.3.2 Esperimenti in Continuo	41
2.4 MONITORAGGIO DELLA CRESCITA CELLULARE	43
2.4.1 Densità Ottica (OD)	43
2.4.2 Peso Secco.....	43
2.3.3 Conta Cellulare.....	44
2.4 BILANCI DI MASSA ED ENERGIA.....	45
2.4.1 Produttività Volumetrica	45
2.4.2 Produttività Areale	45
2.4.3 Efficienza Fotosintetica ed Energetica.....	45
2.4.4 Costi Energetici	46
2.5 MISURE ANALITICHE.....	46
2.5.1 Proteine.....	47
2.5.2 Carboidrati.....	48
2.5.3 Esopolisaccaridi	49
2.5.4 Clorofilla e Carotenoidi.....	50
2.5.5 Ficobiliproteine	51
2.6 ESPERIMENTI DI BIOSTIMOLAZIONE.....	52
2.6.1 Prove di Germinazione.....	53
2.6.2 Attività auxino-simile.....	54
2.7 ANALISI STATISTICA	54
 CAPITOLO 3 – ESPERIMENTI IN BATCH E IN	
CONTINUO.....	55
3.1 ESPERIMENTI PRELIMINARI IN BATCH CON <i>T. TENUIS</i>.....	55
3.1.1 Effetto della lunghezza d'onda sulla crescita di <i>T. tenuis</i>	55

3.1.2 Concentrazione di ficobiliproteine e studio del CCA di tipo 3 in <i>T. tenuis</i> ...	58
3.1.3 Effetto della lunghezza d'onda sulla cinetica di crescita di <i>T. tenuis</i>	59
3.1.4 Considerazioni sulla caratterizzazione della crescita di <i>T. tenuis</i>	63
3.2 ESPERIMENTI IN CONTINUO	64
3.2.1 Effetto dell'intensità luminosa	64
3.2.1.1 Concentrazione e produttività volumetrica di biomassa	64
3.2.1.2 Efficienza fotosintetica.....	67
3.2.1.3 Considerazioni riassuntive sull'effetto dell'intensità luminosa	69
3.2.2 Effetto dello spettro luminoso sulla crescita del consorzio.....	70
3.2.2.1 Concentrazione e produttività volumetrica di biomassa	70
3.2.2.1.1 Crescita in OL	72
3.2.2.1.2 Crescita in RL	73
3.2.2.1.3 Crescita in GL.....	74
3.2.2.2 Efficienza fotosintetica.....	75
3.2.2.3 Contenuto di pigmenti.....	78
3.2.2.4 Contenuto di ficobiliproteine.....	79
3.2.2.5 Dinamica tra le specie all'interno del consorzio	82
3.2.2.6 Considerazioni riassuntive sull'effetto della lunghezza d'onda	84
3.2.3 Effetto del tempo di permanenza	85
3.2.3.1 Concentrazione e produttività volumetrica di biomassa	85
3.2.3.2 Efficienza fotosintetica.....	86

CAPITOLO 4 – APPLICAZIONI DELLA BIOMASSA PRODOTTA IN OTTICA DI “BIOREFINERY” E VALUTAZIONE DEI COSTI DI ILLUMINAZIONE..... 89

4.1 PRODUTTIVITÀ AREALE DI BIOMASSA	89
4.2 EFFICIENZA DI CONVERSIONE ENERGETICA	91
4.3 COSTI PER L'ILLUMINAZIONE DEL PBR	93
4.4 APPLICAZIONI DEL CONSORZIO IN OTTICA DI BIOREFINERY.....	94
4.4.1 Produttività di PBPs	94
4.4.2 Utilizzo del consorzio come biostimolante	96
4.4.2.1 Composizione biochimica del consorzio utilizzato nelle prove di biostimolazione	98

CONCLUSIONI..... 101

BIBLIOGRAFIA..... 103

CAPITOLO 1 – Introduzione

1.1 Sostenibilità: Stato dell'Arte e Prospettive

L'umanità del XXI secolo deve affrontare importanti questioni che minano l'incolumità della stessa e del pianeta che abita: la crisi climatica, l'aumento della popolazione e la carenza di risorse idriche e alimentari, la degradazione degli ecosistemi e la perdita di biodiversità. Le attività antropiche, come la deforestazione, l'emissione di gas serra e l'inquinamento ambientale, sono la causa principale di tali problematiche. La comunità scientifica è concorde sulla necessità di iniziare al più presto una "transizione ecologica" che implica l'abbandono graduale dei tradizionali processi produttivi (IPCC, 2022). Un forte incentivo arriva anche dalle istituzioni: l'Unione Europea, con il pacchetto "*Fit for Fifty Five*", mira ad abbattere del 55% le emissioni di gas serra rispetto al 1990 entro il 2030 e a raggiungere la carbon-neutralità entro il 2050 (UE, 2021). Per potere raggiungere questi obiettivi è necessario ridurre le emissioni, sfruttando fonti energetiche rinnovabili e pulite, e convertire le pratiche agricole e industriali verso una sostanziale sostenibilità. A ciò si arriva tramite un processo di diversificazione, sfruttando, cioè, materie prime e risorse da fonti naturali, compatibili con gli equilibri del nostro pianeta. Tra queste, nell'ultima decade, sta iniziando a prendere piede l'ipotesi di sfruttare le microalghe. Questi microorganismi sono già coltivati in larga scala in alcune nazioni: la sola Cina produce 35.000 tonnellate annue di biomassa microalgale, due terzi della produzione globale, davanti USA e Australia (Barros de Medeiros et al., 2022). Alla base del crescente interesse vi sono diverse cause, tra cui la facilità di coltivazione e la velocità di crescita. Ma soprattutto le microalghe possono essere considerate delle "fabbriche sostenibili" del futuro: sfruttando l'energia luminosa e sequestrando anidride carbonica, esse producono una grande varietà di molecole che possono essere estratte e impiegate come carburanti *green*, biostimolanti naturali, mangimi in allevamento e acquacoltura, alimenti ricchi di nutrienti, nutraceutici e farmaceutici per la salute umana. Siamo, tuttavia, ancora lungi dal rendere questi organismi e i loro prodotti di largo consumo: per soddisfare le richieste globali, è necessario che la loro coltivazione in larga scala raggiunga alte rese, mantenendo bassi i costi di produzione.

1.2 Microalghe

Sotto il nome “*microalghe*” sono classificati microorganismi fotosintetici unicellulari, procariotici ed eucariotici, dalla enorme biodiversità. Sono praticamente ubiquitari, essendosi adattati ad occupare differenti habitat e nicchie (Arsad et al., 2022). Prevalentemente parte del fitoplancton marino e acquatico, alcune specie sopravvivono in ambienti dalle condizioni estreme, come acque salmastre, sorgenti termali e terreni aridi (Hopes et al., 2015). Sotto il piano morfologico e biochimico una descrizione univoca è impossibile: cellule singole o organizzate in strutture filamentose, di forma, grandezza e colore variabili (Tomás Lafarga et al., 2022). Possono produrre e accumulare una varietà di molecole bioattive e d’interesse multidisciplinare, come pigmenti, antiossidanti, polisaccaridi, proteine, lipidi ecc. (Metting Jr, 1996). Rispetto ad altri organismi fotosintetici d’interesse per l’uomo, come le piante, le microalghe convertono l’energia luminosa con una efficienza maggiore, che può arrivare, in certe condizioni, al 30% nel range di lunghezze d’onda in cui è attiva la fotosintesi (Priyadharsini et al., 2022). La versatilità e capacità di sfruttare con efficienza l’energia luminosa ha spinto gli scienziati a studiarle e coltivarle per potere ottenere fonti di energia, composti per il mercato alimentare e *chemicals* sostenibili e a basso impatto ambientale.

1.2.1 Fotosintesi Ossigenica

I primi organismi fotosintetici, probabilmente cianobatteri procariotici, si sono evoluti sulla terra circa 2,5 miliardi di anni fa e la loro attività ha determinato il rilascio e l’accumulo di sempre maggiori quantità di ossigeno (O₂) in atmosfera (“*Catastrofe dell’ossigeno*”) condizionando fortemente il corso dell’evoluzione delle specie (Ligrone, 2019; Schirromeister et al., 2015). L’O₂, infatti, rappresenta il sottoprodotto di scarto della *fotosintesi ossigenica*. Attraverso questo processo l’energia luminosa derivante dal sole o da fonti artificiali viene convertita in energia chimica, cioè molecole carboniose derivanti dalla CO₂ che sostengono e alimentano i diversi pathway del metabolismo cellulare:



1.2.1.1 Pigmenti Fotosintetici

La “cattura” dei fotoni non potrebbe avvenire senza la presenza di cromofori in grado di assorbirli, comunemente noti come *pigmenti*. Si tratta di molecole strutturalmente complesse presenti nei tilacoidi, strutture membranose all’interno dei cloroplasti o dispersi nel citosol (quest’ultimo nel caso di procarioti fotoautotrofi). Tra i pigmenti più noti, la *clorofilla a* (ma ne esistono diverse varianti strutturali, classificate dalla “b” alla “f”) è strutturalmente simile alla *porfirina* presente nell’emoglobina: possiede una struttura tetrapirrolica, al cui centro è presente un atomo di Mg^{2+} , da cui si diparte a sua volta una lunga catena alchilica, utile all’ancoraggio in membrana (Burns Woodward et al., 1990). I *carotenoidi* (suddivisi in caroteni e xantofille), lunghe catene carboniose poli-insature derivanti dai tetraterpeni, sono soprattutto utili nella protezione dell’apparato fotosintetico dall’eccesso di radiazione luminosa incidente, evitando la sovrapproduzione e l’accumulo di O_2 e di derivati radicalici di questo (noti come ROS – *Reactive Oxygen Species*) (Edge et al., 1997; Rock, 1997). Oltre ai pigmenti appena descritti, ne esistono altri che vengono sfruttati nel processo fotosintetico da alcuni organismi, tra cui la *xantofilla*, la *feofitina a e b* e le *ficobiline* (D’Alessandro et al., 2016). L’attività dei pigmenti si esplica nella loro capacità di assorbire l’energia portata dai fotoni di specifiche lunghezze d’onda (λ), mediando la conversione dell’energia luminosa in energia chimica (Kiang et al., 2007). Più nello specifico, quando un fotone della giusta lunghezza d’onda colpisce una molecola di clorofilla o di carotene ne causa l’*eccitazione*, cioè delle transizioni elettroniche negli orbitali a più alta energia che danno il via al processo di fotosintesi.

1.2.1.2 Radiazione Luminosa e Photosynthetically Active Radiation (PAR)

La gamma di radiazioni presenti nella luce solare compone lo spettro elettromagnetico (Figura 1.1). Si va da radiazioni con alta lunghezza d’onda (*onde radio, microonde*) a radiazioni con bassa lunghezza d’onda e altamente energetiche (*raggi UV, raggi X e raggi gamma*) (Sliney, 2016).

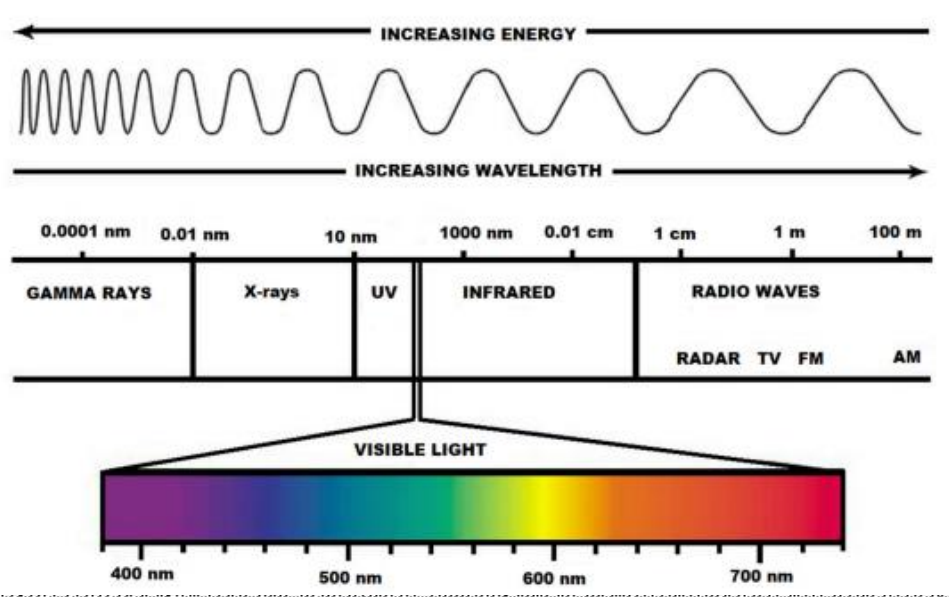


Figura 1.1 Spettro della radiazione elettromagnetica in funzione della lunghezza d'onda e dell'energia (Ailioaie et al., 2020).

Le radiazioni elettromagnetiche con λ compresa tra 400 e 750 nm (visibile) sono capaci di innescare il processo fotosintetico e per questo sono dette *Photosynthetically Active Radiations* (PAR). I diversi pigmenti, infatti, assorbono specifiche lunghezze d'onda nel visibile: le clorofille hanno dei massimi di assorbimento nel blu e nel rosso, i carotenoidi assorbono nel blu e le ficobiline assorbono tra il verde e il rosso (500-650 nm) (Figura 1.2) (Pagels et al., 2020).

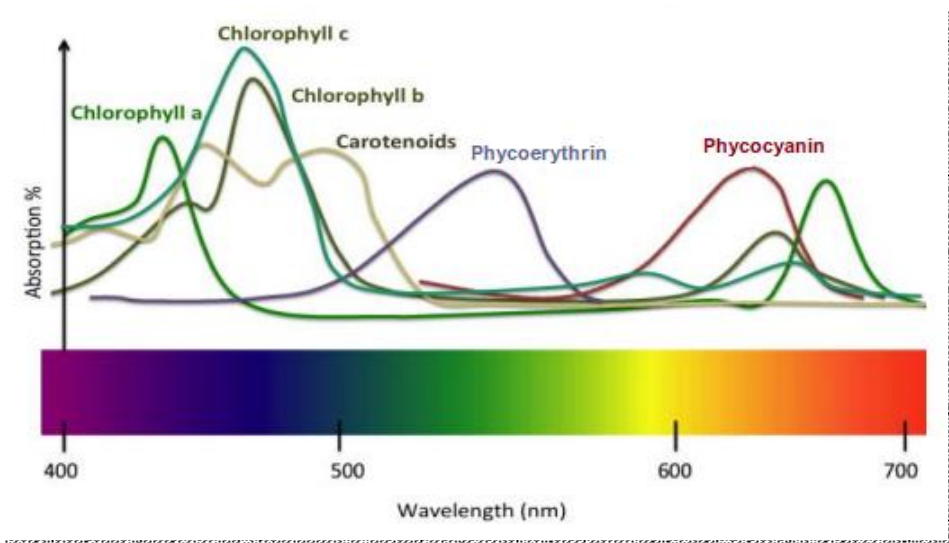


Figura 1.2 Spettro di assorbimento nel PAR di diversi pigmenti presenti nelle microalghe (Redmond, 2017).

1.2.1.3 Fase Luminosa della Fotosintesi

Nelle membrane tilacoidali, i pigmenti sono associati a delle proteine a formare dei macro-complessi noti come *fotosistema I* e *II* (PSI e PSII). Ad ausilio dei fotosistemi sono presenti dei complessi di pigmenti accessori (carotenoidi, clorofilla-b o ficobiliproteine) e proteine che formano i *Light Harvesting Complexes* (LHCs). Il ruolo di questi ultimi è quello di convogliare la gran parte dell'eccitazione derivante dall'energia luminosa ai *centri di reazione* (RCs) dei due fotosistemi, dove è presente invece la clorofilla a. A causa dell'eccitazione e delle transizioni elettroniche a suo carico, la clorofilla del PSII (detto anche P680 a causa delle proprietà spettrali) cede i suoi elettroni a più alta energia a delle proteine a valle e riacquisisce il suo potenziale d'eccitazione strappando due elettroni ad una molecola di H₂O, formando protoni (H⁺) e O₂ (processo di *fotolisi dell'acqua*). Gli elettroni perduti dal cromoforo vengono immessi in una catena di trasporto composta da complessi proteici, tra cui il *plastoquinone* (PQ) e il *citocromo b₆/f* (Cyt b₆/f). Questi, attraverso reazioni di ossidoriduzione e seguendo un gradiente decrescente di potenziale redox, generano un potenziale chimico ai due lati della membrana tilacoidale, pompando protoni dal lume verso lo stroma (Figura 1.3). Il potenziale chimico generatosi, dunque, è dissipato grazie all'*ATP sintasi*, un complesso macro-molecolare che permette il rientro nel lume dei protoni e sfrutta l'energia liberata dal potenziale chimico per produrre molecole di ATP a partire da ADP e P_i.

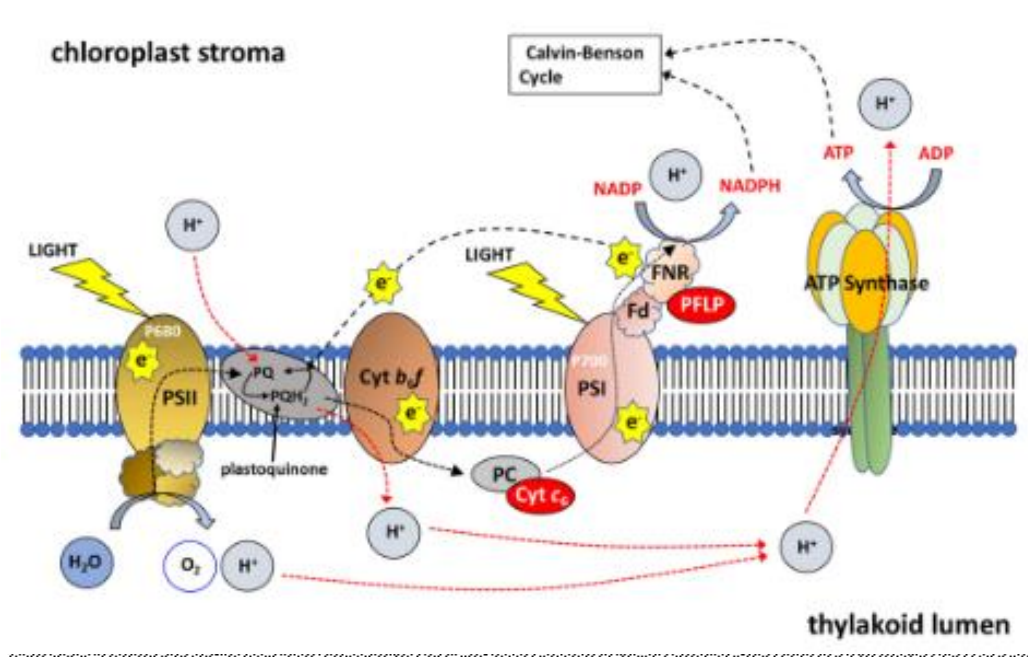


Figura 1.3 Schematizzazione della fase luminosa della fotosintesi ad opera dei fotosistemi, della catena di trasporto e dell'ATP sintetasi (Simkin, 2019).

Il trasporto elettronico procede fino ad un nuovo centro di reazione, il PSI (P700) dove si ripete la reazione fotochimica su descritta. In questo caso non avviene la scissione dell'acqua e gli elettroni perduti dalla clorofilla sono rimpiazzati da quelli in arrivo dalla catena di trasporto a monte. Gli elettroni immessi dal PSII percorrono un'ulteriore catena di trasporto, costituita da *proteine ferro-zolfo* (Fe-S) e *ferridossina* (Fd), e arrivano all'enzima $NADP^+$ Riduttasi, il quale li cede al $NADP^+$ formando $NADPH + H^+$.

L'ATP e il $NADPH + H^+$ prodotti durante la fase luminosa sostengono energeticamente e chimicamente il metabolismo centrale di tutti gli organismi fotosintetici che, iniziando dalla fissazione della CO_2 , culmina nella produzione di molecole carboniose complesse nel ciclo di Calvin-Benson (CBC).

1.2.2 Microalghe: classificazione e caratteristiche

Una classificazione univoca delle microalghe non è presente in letteratura scientifica. Da una più recente analisi, circa 75.000 specie appartengono a questo raggruppamento, ma è probabile che in futuro questa cifra cresca, poiché nuove specie vengono descritte continuamente (Guiry, 2012). Esistono, comunque, due divisioni principali: quella procariotica, cui appartengono i *phyla Cyanophyta* e

Prochlorophyta e quella eucariotica, popolata da differenti *phyla*, tra i quali i più estesi sono *Chlorophyta*, *Glaucophyta*, *Rhodophyta*, *Cryptophyta* e *Dinophyta* (Shaikh et al., 2022). All'interno di ogni *phylum* esistono svariate classi, tra cui, in termini di maggior numero di specie annotate e descritte, degne di menzioni sono *Chlorophyceae*, *Rhodophyceae*, *Phaeophyceae*, *Bacillophyceae* ecc. (Guiry et al., 2022). La gran parte delle specie descritte ed applicate appartengono ai *phyla* *Cyanophyta* e *Chlorophyta*.

1.2.2.1 Chlorophyta

Note anche come “alghe verdi”, a questo *phylum* sono ascritti organismi eucariotici unicellulari di dimensioni comprese tra 2 e 50 µm, talvolta flagellati e con spesse pareti composte di cellulosa e pectine (Baudeflet et al., 2017; Cormaci et al., 2014). Occupano principalmente ecosistemi acquatici e marini, nonostante possano proliferare anche in ambienti terrestri. Possiedono un singolo cloroplasto all'interno del quale sono presenti *clorofilla a* e *clorofilla b* (oltre a carotene e xantofille) che danno a questi microorganismi il caratteristico colore verde (Metting Jr, 1996). La classe *Chlorophyceae* annovera le specie maggiormente note nella comunità scientifica e in ambito commerciale: a questa appartengono i generi *Chlamydomonas*, organismo modello in ficologia, *Haematococcus* e *Dunaliella*, produttori di pigmenti di interesse commerciale, *Scenedesmus* e *Chlorella*, ricchi in lipidi e altre macromolecole.

1.2.2.2 Cyanophyta

Per lo più noti come *cianobatteri*, i rappresentanti di questa divisione sono batteri gram-negativi unicellulari o pluricellulari, organizzati sovente in colonie o strutture filamentose (Allaf et al., 2022; Guiry et al., 2022). Proliferano in praticamente qualunque tipo di ecosistema, anche il più estremo (come le sorgenti termali) e alcune specie producono tossine pericolose per i vertebrati (Catherine et al., 2013; Sánchez-Baracaldo, 2015). Sono anche noti come “*blue-green algae*” a causa della presenza di ficocianina e ficoeritrina nei LHCs, oltre clorofilla e carotenoidi (Meriluoto et al., n.d.). Questi pigmenti permettono ai cianobatteri di ampliare lo spettro di assorbimento all'interno del range PAR e di colonizzare specifiche nicchie ecologiche (Barsanti et al., 2014). Stando al database tassonomico AlgaeBase (www.algaebase.org) più di 5.000 specie sono divise in sette principali ordini: *Nostocales*, *Synechococcales*, *Gloeobacterales*, *Pleurocapsales*,

Oscillatoriales, *Chroococcales* e *Spirulinales* (Guiry et al., 2022). Alcune specie (principalmente appartenenti agli ordini *Nostocales* e *Gloeobacterales*) sono capaci di fissare l'azoto atmosferico (N₂) e convertirlo in una forma assimilabile (nitrati e nitriti), grazie al differenziamento di cellule specializzate, le *eterocisti*. Questo processo è noto come *azotofissazione* (Vidal et al., 2021).

Classificate tra i cianobatteri possiamo trovare diverse specie che sono sfruttate a livello commerciale, su tutte *Spirulina* spp., usata in nutraceutica e cosmetica (Fais et al., 2022). Seguono *Nostoc* spp., *Synechocystis* spp. e *Aphanizomenon* spp., d'interesse industriale per la produzione di biofuel, cosmetici e chemicals ad uso farmaceutico (Zahra et al., 2020).

1.2.3 Coltivazione e applicazioni delle microalghe

L'interesse della comunità scientifica e delle industrie per le microalghe è da ricercare in diversi fattori: la rapidità di crescita in spazi ridotti e senza particolari necessità nutritive; la presenza di molecole bioattive di interesse multidisciplinare come pigmenti, lipidi, proteine, vitamine ecc. le rendono, in prospettiva, una risorsa con un impatto positivo sull'ambiente e sull'uomo (Yousuf, 2019). Per la loro produzione industriale in larga scala è necessario lo sviluppo e l'ottimizzazione di tecniche e modalità di coltivazione artificiale, per limitare le difficoltà che tali organismi incontrano nei loro habitat naturali. L'intervento umano nella crescita e proliferazione delle microalghe permette di controllare parzialmente o in toto i fattori che le influenzano.

1.2.3.1 Fattori che influenzano la crescita microalgale

Essendo organismi fotoautotrofi, le microalghe necessitano di luce per operare il metabolismo fotosintetico. Tale variabile e la sua modulazione è fondamentale nella coltivazione delle microalghe. Infatti, sia la quantità che la qualità della luce a cui sono esposte influenzano diversamente differenti processi metabolici (Carvalho et al., 2011; Nwoba et al., 2019). In questa sede bisogna puntualizzare che alcune specie, come *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis* e *Scenedesmus obliquus*, sono capaci di crescere anche in assenza di luce, in modo, cioè, *eterotrofico* (Zuccaro et al., 2019).

La presenza e il corretto bilanciamento di tutti i macro- e micro-nutrienti, inoltre, è fondamentale. Secondo il "*Redfield Ratio*" le microalghe hanno una composizione

caratteristica di carbonio, azoto e fosforo: il rapporto tra questi tre elementi (C:N:P) è, in media, 106:16:1 e discostamenti da questo possono destabilizzare il normale metabolismo di sintesi dei componenti macromolecolari come polisaccaridi, proteine e DNA (Geider et al., 2002; Goldman et al., 1979). In realtà è anche noto come le alghe possano variare la loro composizione in termini di quota di azoto e fosforo, come risposta alle variazioni ambientali (*Droop Model*). In linea generale, comunque, il Redfield Ratio rimane un bilancio di massa generale che ben rappresenta gli ordini di grandezza dei rapporti tra nutrienti. Allo stesso modo è necessario che siano presenti in tracce anche vitamine ed elementi come Fe, Mg, Co, Zn ecc. (Ahmad et al., 2021). Sia l'eccesso che il deficit di queste sostanze possono inficiare negativamente i pathway metabolici principali e secondari e quindi la crescita, ma dall'altra parte può essere usato *ad hoc* come espediente per la produzione e l'accumulo di molecole di interesse (Yousuf, 2019). Molte specie, infatti, si proteggono dalla carenza di nutrienti sintetizzando e accumulando acidi grassi, polioidrossialcanoati, pigmenti e antiossidanti (Gauthier et al., 2020; P. Singh et al., 2016). Ovviamente, date le loro necessità metaboliche, le microalghe necessitano di CO₂ per il sostentamento del ciclo di Calvin-Benson.

Nonostante alcune eccezioni, le microalghe crescono a pH debolmente alcalini, vicini alla neutralità (6-8) (Brindhadevi et al., 2021). Variazioni del pH possono influenzare l'uptake di ioni e metaboliti, la disponibilità di fosforo e azoto nel mezzo di crescita così come la produzione di lipidi e altre macromolecole (Brindhadevi et al., 2021; J. Jin et al., 2016). Inoltre, a pH molto alcalini si assiste ad un'alterazione della distribuzione delle cariche superficiali delle cellule, causando fenomeni di aggregazioni spesso (ma non sempre) indesiderati. I valori ottimali di temperatura tollerati dalle microalghe si attestano in un range molto ampio, essendo tale parametro specie-specifico. Infatti, sebbene buona parte delle specie oggi note proliferi a temperature ambientali (25-30°C), esistono specie psicrofile (<15-20°C) e termofile (>50°C) (Ras et al., 2013). Temperature non ottimali hanno generalmente effetti negativi sulla fotosintesi e sulla stessa fissazione della CO₂, anche se, talora, condizioni di stress associate a questo parametro sono risultate stimolanti per la produzione di metaboliti d'interesse, come ad esempio acidi grassi poliinsaturi (PUFAs) e lipidi neutri (Paliwal et al., 2017; Suparmaniam et al., 2022; Zuccaro et al., 2019).

Anche le condizioni operative del sistema di coltura influenzano la performance di coltivazione. Parametri come il *mescolamento* e lo *stress idrodinamico* associatovi, lo *spessore* del liquido di coltura e il *tempo di permanenza* possono essere decisivi nello stabilire le condizioni ottimali di crescita. Le modalità di coltivazione scelte e le variabili operative adoperate vengono pertanto costantemente studiate e ottimizzate nei processi in piccola e larga scala.

1.2.3.2 Modalità Batch e Fed-Batch

Le microalghe possono essere coltivate, in medio-grande scala, all'interno di bioreattori in cui sono forniti una fonte luminosa, CO₂ e nutrienti. Riguardo questi ultimi, indipendentemente dalla scala considerata, si possono operare tre modalità di crescita delle microalghe. In una coltura del tipo “*batch*” il reattore viene riempito di terreno fresco e inoculato. Al suo interno sono garantiti il mescolamento, CO₂ e luce (Figura 1.4, a). Non essendoci un supplemento di nutrienti, nel tempo le cellule crescono e proliferano fino al loro completo consumo. Nel caso di organismi foto-autotrofi, la luce rappresenta il principale nutriente e la fase di morte si instaura a causa della carenza di micro-nutrienti o per l'accumulo di tossine. Una modalità simile è sempre corredata di una *curva di crescita* dove la concentrazione della biomassa è espressa in funzione del tempo (Figura 1.4, b).

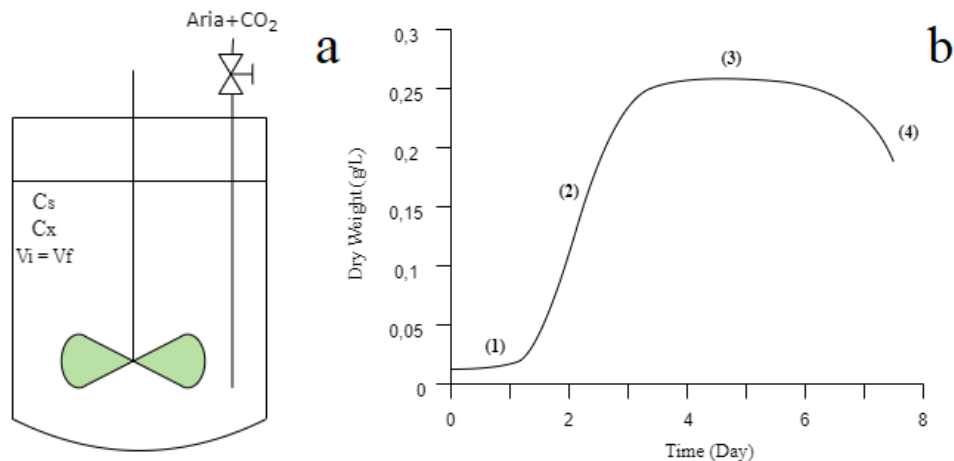


Figura 1.4 (a) Schema di un bioreattore in modalità batch; **(b)** Curva di crescita della biomassa algale in modalità batch: (1) fase lag; (2) fase esponenziale; (3) fase stazionaria; (4) fase di morte..

Dopo una prima fase (1) in cui le cellule necessitano di acclimatarsi alle condizioni di coltura (*lag phase*), la concentrazione inizia ad aumentare in modo esponenziale

(fase esponenziale) poiché le cellule iniziano a crescere e dividersi attivamente (2). Quando i nutrienti sono stati quasi del tutto consumati, la crescita cellulare si attenua e la concentrazione si mantiene stabile (fase stazionaria) (3). Se la coltura viene mantenuta oltre questa fase si può assistere ad un decremento della concentrazione cellulare: infatti le cellule non hanno più sostentamento per la divisione e contestualmente si accumulano prodotti di scarto che sono tossici per la sopravvivenza cellulare stessa (fase di morte) (4).

In modalità “*fed-batch*”, invece, il volume di coltura iniziale è minore rispetto a quello di una modalità batch. Il bioreattore viene portato a volume lentamente, mediante il supplemento continuo di terreno fresco (Q_e) (Figura 1.5). Concettualmente, questa modalità è molto simile a quella batch, con la differenza che il tempo di coltura viene ampliato, raggiungendo di conseguenza una resa maggiore (Figueroa-Torres et al., 2022).

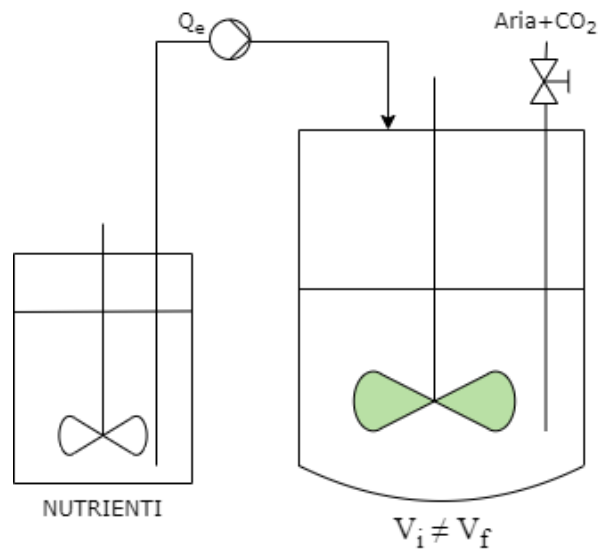


Figura 1.5 Schema di un bioreattore in modalità *fed-batch*.

1.2.3.3 Modalità in Continuo

Nella modalità in continuo non si ha un andamento variabile della crescita in funzione del tempo come nei casi suddetti. Ciò poiché mentre vengono forniti nutrienti in ingresso (Q_e) si ha anche un'uscita di terreno, prodotti e biomassa dal bioreattore (Q_u) (Figura 1.6). Dopo aver aspettato un tempo opportuno (fase transiente) si instaura uno *stato stazionario* ($Q_e = Q_u$). Stesso equilibrio si mantiene per la concentrazione cellulare (C_x). Poiché le cellule si moltiplicano a velocità

variabili ma specifiche, la biomassa in uscita ($C_{x,u}$) viene rimpiazzata continuamente mediante il processo di divisione cellulare. La concentrazione di biomassa nel reattore, dunque, in questa modalità non dipende dal tempo, in funzione del quale resta costante, bensì dal *tempo di ritenzione idraulica* (τ , days), definito come il rapporto tra il volume operativo del reattore (V_R) e la portata in ingresso (Q_e) o uscita (Q_u). Il corretto bilanciamento della portata di nutrienti in ingresso e quindi del tempo di ritenzione idraulica è fondamentale in un processo in continuo: se troppo alto si rischia di avere una bassa produttività; se troppo basso la biomassa lascerà il bioreattore poiché non vi è tempo sufficiente per la moltiplicazione cellulare, fenomeno noto come “wash-out”.

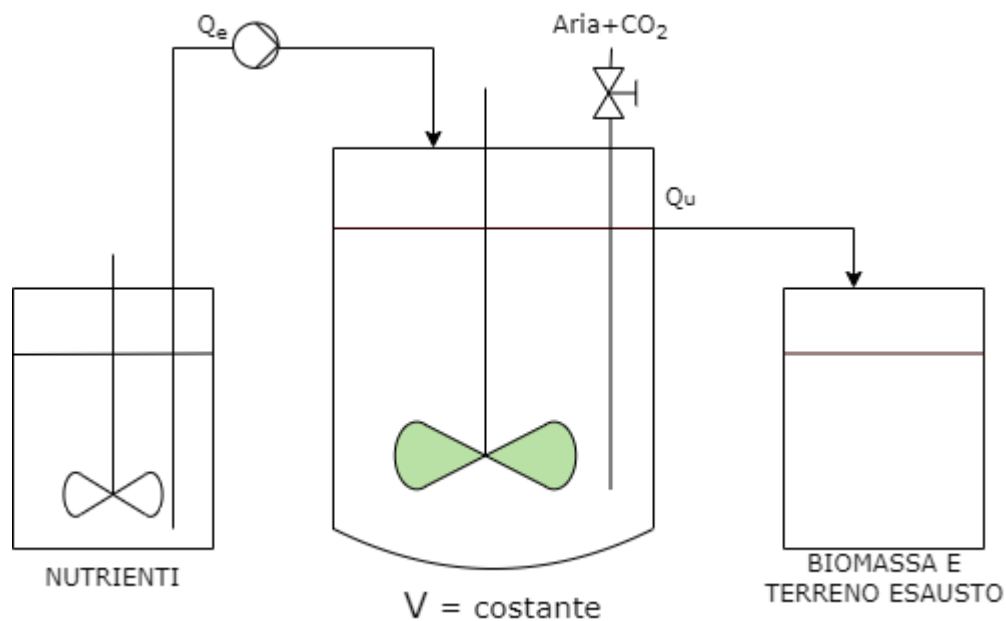


Figura 1.6 Schema di un bioreattore in modalità in continuo.

La coltivazione in continuo, seppur operativamente più complessa rispetto alle modalità precedenti, permette di ottenere una maggiore produttività di biomassa (biomassa/tempo) e/o prodotti di interesse. Inoltre, l’instaurarsi di uno stato stazionario consente un maggiore controllo del processo e delle sue variabili e una generale riproducibilità (Peter et al., 2022).

È opportuno anche menzionare una modalità a cavallo tra quella batch e in continuo, cioè la modalità in semi-continuo. In questo caso il bioreattore viene portato a stato

stazionario ma questo viene mantenuto operativo per un tempo predefinito (qualche giorno), come avviene in un batch.

1.2.3.4 Sistema Aperto: Open Ponds

La coltivazione delle microalghe in un sistema aperto avviene simulando le condizioni di crescita di un ambiente naturale. Oltre ai bacini artificiali e i “*lagoon*”, gli “*open ponds*” sono maggiormente sfruttati nelle coltivazioni su media e larga scala (Jerney et al., 2018). Si tratta di vasche di dimensioni variabili (da qualche metro quadrato a ettari di superficie). Possono essere di forma circolare (*circular ponds*) o a circuito (*raceway ponds*), sono poco profondi (30-50 cm) e consentono il flusso in continuo di grossi volumi di liquido esposti alle condizioni ambientali di luce, temperatura e CO₂ (Shen et al., 2009). Questi, spesso consistenti in acque reflue urbane o industriali (*High Rate Algal Ponds – HRAP*), sono messi in circolo a bassi tempi di residenza grazie a pale rotanti (“*paddlewheels*”) fino alla zona di raccolta (“*harvesting*”), dove le cellule vengono separate dal liquido (Figura 1.7) (Khan et al., 2022; Samir et al., 2022).

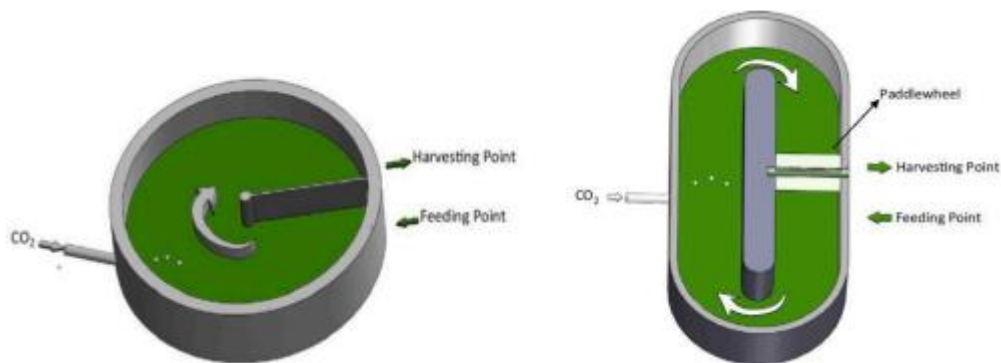


Figura 1.7 Illustrazione di due tipologie di open ponds per la coltivazione di microalghe: “*circular open pond*” (sx) e “*raceway open pond*” (dx) (Khan et al., 2022).

1.2.3.5 Sistema Chiuso: Fotobioreattori

La coltivazione di organismi foto-autotrofi può avvenire anche all'interno di compartimenti confinati, noti come *fotobioreattori* (PhotoBioReactors - PBRs). L'illuminazione può derivare da fonti naturali (come per gli *open ponds*), risparmiando così sul costo dell'energia elettrica, o essere fornita in maniera controllata tramite sistemi di illuminazione artificiale (Sirohi et al., 2022). I PBRs sono generalmente costruiti con materiali trasparenti alle radiazioni luminose incidenti (plastica, vetro, polivinilcloruro ecc.) e possono avere differenti forme

(*tubulari, verticali, flat-panel* ecc.) (Dange et al., 2022). Possono essere operati nelle tre modalità viste in precedenza (vedi paragrafi §1.2.3.2 e 1.2.3.3) , garantendo un adeguato mescolamento e un afflusso costante di aria o CO₂.

1.2.3.6 Confronto tra sistema aperto e sistema chiuso

Sia i sistemi aperti che quelli chiusi hanno i rispettivi vantaggi e svantaggi. La scelta della tecnologia più adeguata dipende in buona parte dallo scopo applicativo del processo. I sistemi aperti sono noti per essere economicamente e logisticamente più vantaggiosi. Lo sfruttamento dell'energia solare e della CO₂ atmosferica è alla base dell'abbattimento dei costi energetici primari (illuminazione) e ausiliari (sistemi di mescolamento, pompe per il *bubbling* ed il *feeding*) che nei PBRs invece rappresentano una buona fetta percentuale dei costi di mantenimento (Narala et al., 2016). Secondo Santos et al. (2022), i costi energetici possono essere ridotti fino a 0,41 EUR/m³ in un sistema aperto. Allo stesso modo i costi di mantenimento e manutenzione per i PBRs incidono per il 32-36% sul totale. Tale percentuale scende al 12% nei sistemi aperti (Barsanti et al., 2018). Questi, però, non garantiscono alte rese, con densità cellulari di circa 0,3 g/L (Rehman et al., 2022). Infatti, oltre alla bassa concentrazione della biomassa, si ha una bassa conversione della CO₂ atmosferica, con la necessità di investire per un sistema di *bubbling* (Paul et al., 2021). I parametri operativi che influenzano la crescita, come il pH, la temperatura e la quantità e qualità della luce, sono soggetti alle fluttuazioni stagionali e locali. Un ulteriore problema è rappresentato dalla possibilità di contaminazioni batteriche, fungine o di altre specie di microalghe (Udayan et al., 2022). Ciò non permette lo sfruttamento della biomassa per l'estrazione di prodotti a valore aggiunto, vanificando i vantaggi economici. Nei PBRs è possibile, invece, manipolare e controllare i diversi parametri "ambientali" fino ai valori ottimali per la crescita di diverse specie. Ne risulta un processo più produttivo e riproducibile rispetto ai sistemi aperti (J. Sen Tan et al., 2020). La quasi totale assenza di contaminazioni apre alla possibilità di produrre chemicals dall'alto valore commerciale (30€ kg⁻¹ nel settore alimentare e nutraceutico) (van der Voort et al., 2015).

1.2.3.7 Illuminazione Artificiale

Nelle coltivazioni in larga scala di organismi foto-autotrofi l'illuminazione è un parametro determinante. Sia la qualità (*lunghezza d'onda*) che la quantità (*intensità*)

della luce a cui le cellule sono esposte influenzano diversi processi metabolici (Baidya et al., 2021). Anche se esiste una variabilità specie-specifica (Maltsev et al., 2021), sembra che lunghezze d'onda nel blu (400-450 nm) stimolino l'accumulo di acidi grassi poli-insaturi (PUFAs) e lipidi in generale (Habibi et al., 2019; C. Jin et al., 2021); la luce rossa il processo fotosintetico e la divisione cellulare e la luce verde la produzione di clorofilla e di pigmenti accessori come le ficobiliproteine (Coward et al., 2016; Mohammed et al., 2014; Mohsenpour et al., 2013). Per avere le migliori condizioni di crescita e ottenere alte produttività, dunque, è vantaggioso potere modulare le variabili d'illuminazione, cosa che, seppur possibile in alcuni sistemi ibridi (aperti e illuminati artificialmente), non è sufficiente nei sistemi aperti. I PBRs, d'altro canto, possono essere dotati di sistemi di illuminazione artificiale che superano tale problematica. Certamente, i costi di impianto e operativi aumentano, quindi l'illuminazione artificiale può essere utilizzata solo in presenza di energia elettrica prodotta da fonti rinnovabili, o per produzione di composti ad alto valore aggiunto

Il sistema di illuminazione ideale, tuttavia, deve essere efficiente a convertire l'energia elettrica di alimentazione in energia luminosa e conseguentemente in energia chimica. Oggi, l'efficienza fotosintetica (la frazione di energia luminosa convertita in energia chimica) raggiungibile in un PBR illuminato con luci tradizionali (lampade a fluorescenza, FL o HID, *High Density Discharge*) è molto scarsa (1-2%), principalmente, tra le altre, a causa della dissipazione termica dell'energia o dal mancato assorbimento di certe lunghezze d'onda dalla biomassa (Schulze et al., 2014). Le strategie proposte per aumentare l'efficienza fotosintetica riguardano maggiormente l'incremento delle prestazioni metaboliche delle microalghe attraverso l'uso dell'ingegneria genetica e la modifica dell'apparato fotosintetico (Vecchi et al., 2020). L'alternativa potrebbe essere rappresentata, tuttavia, dall'uso di luci LED. Esse necessitano di energia in input due volte e dieci volte inferiore rispettivamente alle lampade a fluorescenza e ad incandescenza (Porto et al., 2022; Sungheetha et al., 2020). Questo permette di abbassare parte dei costi dell'elettricità di un impianto. Oltre a vantaggi logistici (durabilità, direzionalità e versatilità), i LED hanno una efficienza di conversione che può raggiungere l'80% (Borella et al., 2022; Schulze et al., 2014; Zanolli et al., 2022). Negli ultimi anni, inoltre, sono stati ideati LED monocromatici con spettri di

emissione decisamente più stretti rispetto ai LED bianchi (Figura 1.8, b e c) (Porto et al., 2022).

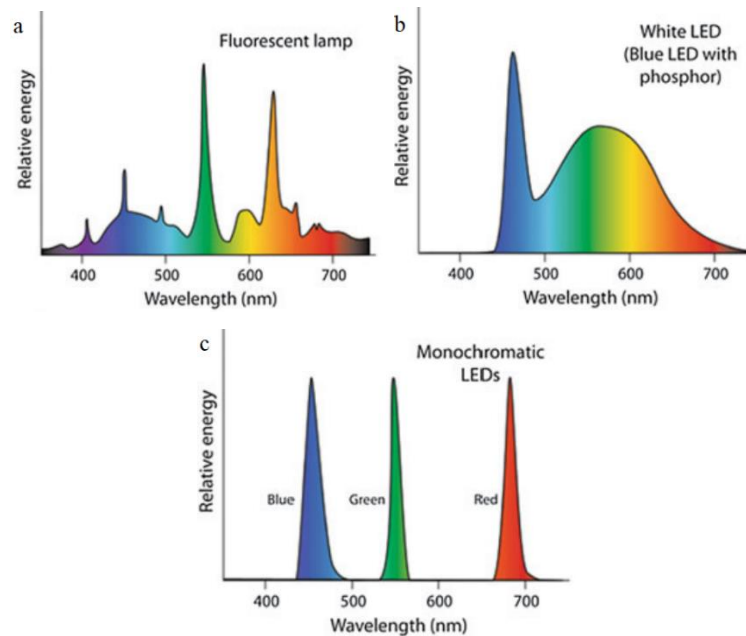


Figura 1.8 Spettro di differenti sistemi di illuminazione per PBRs. **(a)** lampada a fluorescenza; **(b)** lampada a LED bianco; **(c)** lampade a LED monocromatiche (Dutta Gupta, 2017).

L'uso di LED monocromatici permette di superare due limitazioni:

- 1) viene incrementata l'efficienza di conversione energetica, poiché non si hanno lunghezze d'onda superflue che sono presenti nelle FLs e nei LED bianchi (Borella et al., 2022);
- 2) Nelle lampade convenzionali certe lunghezze d'onda (come il rosso, che è importante per alcuni processi) non sono ben rappresentate. Ciò viene risolto con l'uso di LED monocromatici singoli ed in combinazione in cui è possibile modulare quantità e qualità delle lunghezze d'onda emesse.

1.2.3.8 Stato dell'Arte e Applicazioni

L'interesse industriale per la coltivazione delle microalghe in larga scala è in forte crescita. D'altronde, nel 2017, il mercato globale dei prodotti contenenti microalghe valeva 32,60 miliardi di dollari e le stime per il 2026 portano tale cifra a più di 50 miliardi di dollari (Rahman, 2020). A far da propulsore a questo trend in ascesa è

la ricerca: in un'analisi bibliometrica condotta da Rumin et al. (2020) viene stimato che, nel solo 2018, siano stati pubblicati più di 5000 papers inerenti alle microalghie. Ed infatti, queste ultime vantano un grande ventaglio di applicazioni (Figura 1.9).

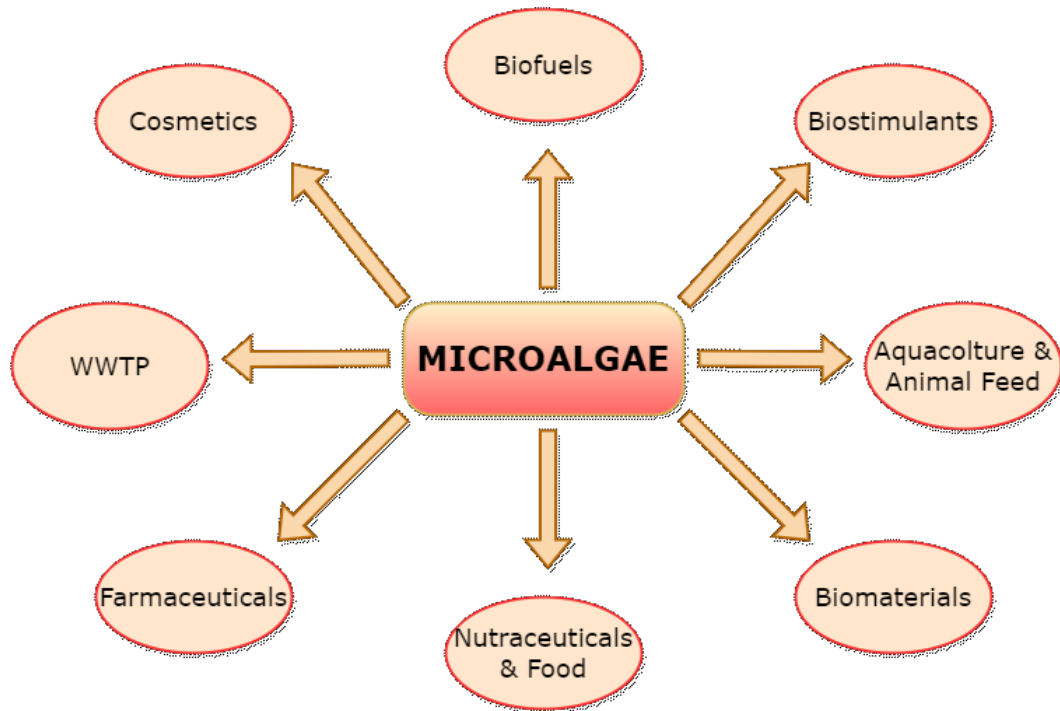


Figura 1.9 Schema delle possibili applicazioni delle microalghie in differenti settori.

Nel dibattito della crisi climatica ed energetica in corso e della necessità di fonti “green” e sostenibili, le microalghie si presentano tra le possibili alternative del futuro, in termini di impatto ambientale e sostenibilità. Specie appartenenti ai generi *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. e *Nannochloropsis* sp. sintetizzano e accumulano grosse quantità di lipidi e carboidrati (Zewdie et al., 2020). La trasformazione di questi metaboliti primari è alla base della produzione di *biofuels* (biodiesel e bioetanolo) (Kandasamy et al., 2022).

Tra le applicazioni di minor valore economico ma di interesse sociale e ambientale abbiamo anche il trattamento delle acque reflue agricole, urbane e industriali (*Wastewater Treatment Plant* - WWTP) (Lutzu et al., 2021). Le microalghie possono crescere agevolmente in acque con contaminanti organici e inorganici, determinandone contestualmente la loro rimozione. Ad esempio, esse sono capaci di assorbire ed accumulare azoto (N) e fosforo (P) organici derivanti da reflui agro-alimentari e domestici che sono alla base di fenomeni di inquinamento ed

eutrofizzazione (Abdel-Razek et al., 2019; X. Chen et al., 2018; Conley et al., 2009). Alcune specie sono state studiate per il rimedio di metalli pesanti, come Cd^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} , sversati nelle acque superficiali e di falda da differenti processi industriali (Abdel-Razek et al., 2019; Aslam et al., 2019). Per le stesse ragioni possono essere utilizzate in acquacoltura, nel trattamento e riciclo delle acque effluenti (Ansari et al., 2017; Yang Liu et al., 2019).

Le microalghe sono sfruttate anche in ambito agro-alimentare e zootecnico. Ricche in azoto e fosforo, esse potrebbero sostituire parzialmente i fertilizzanti agricoli di origine fossile la cui produzione non è sostenibile (Álvarez-González et al., 2022; Dineshkumar et al., 2019). Alcune sostanze bioattive e fitoormonali che producono possono fungere da biostimolanti per aumentare la produttività agricola (González-Pérez et al., 2022). Infine, la biomassa algale, ricca di lipidi, proteine e carboidrati, può essere trasformata per produrre mangimi per la zootecnia e l'acquacoltura (Bature et al., 2022; Villar-Navarro et al., 2022)

Oltre ai metaboliti prodotti e sfruttati per i biocarburanti, mangimi o biostimolanti, le microalghe sintetizzano un'ampia varietà di molecole bioattive di maggior valore commerciale. Acidi grassi essenziali e pigmenti come i carotenoidi e l'astaxantina possono essere commercializzati come integratori alimentari e anti-ossidanti (Kapoor et al., 2022; Satish Kumar et al., 2022). Le ficobiliproteine potrebbero essere sfruttate in ambito cosmetico e nutraceutico, come colorante naturale, e medico-farmaceutico, data la loro supposta attività antiossidante, antiinfiammatoria e antitumorale (Pagels et al., 2019). Infine, alimenti prodotti dalla trasformazione industriale di microalghe del genere *Arthrospira*, note comunemente come *Spirulina*, stanno iniziando a comparire negli scaffali come sostituti dei tradizionali alimenti vegetali e cerealicoli (Tomas Lafarga et al., 2020).

1.2.3.9 Microalghe come “Biorefineries”

In accordo con lo studio condotto da Llamas et al., 2021, il costo medio di produzione attuale della biomassa microalgale si aggira tra i 5 e i 12 €/kg, a seconda che si considerino rispettivamente sistemi aperti e chiusi (Llamas et al., 2021). Tali cifre, soprattutto nei PBRs, vanno aggiornate al rialzo tenendo conto della crisi energetica in atto e dell'aumento del prezzo dell'energia elettrica (Eurostat, 2022).

L'uso delle tecnologie a basso costo (come i *raceway ponds*) è limitato alla produzione di chemicals e utili di basso valore commerciale. Parallelamente, però, l'uso dei PBRs e dei vantaggi associati comporta grossi investimenti e costi consistenti. La copertura di questi può avvenire, però, applicando il concetto di "*biorefinery*": come in una raffineria petrolifera, la biomassa coltivata viene impiegata a più scopi (Feed et al., 2007). Ad esempio, nel processo di estrazione di molecole bioattive, come pigmenti o biopolimeri, così come anche nel processo di WWT, la biomassa rimanente può essere ulteriormente valorizzata per l'ottenimento di biodiesel, mangimi o biostimolanti e biofertilizzanti (Malik et al., 2022; Ubando et al., 2022). In tal modo, a parità di costi sostenuti, si avrà un maggior ricavo.

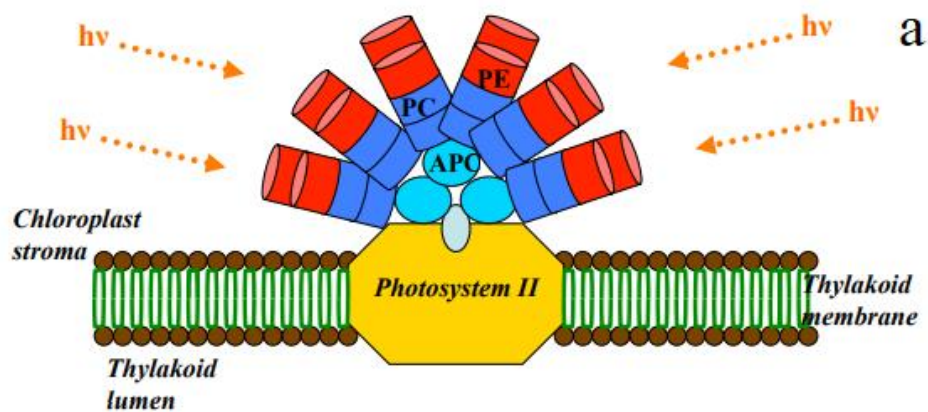
1.3 Cianobatteri e Adattamento Cromatico Complementare (CCA)

Nei cianobatteri il meccanismo fotosintetico si è evoluto per ampliare il range di lunghezze d'onda fotosinteticamente attive. Infatti, oltre a clorofilla e carotenoidi, essi possiedono ulteriori complessi di cattura dell'energia luminosa: i *ficobilisomi*. La presenza di questi complessi proteici è fondamentale per rispondere a variazioni della qualità della luce o vincere la competizione con altri organismi foto-autotrofi. Questa complessa quanto efficace risposta adattativa è nota da più di un secolo come *Adattamento Cromatico Complementare* (CCA). Tale fenomeno risulta interessante anche nell'ottica di coltivazione industriale dei cianobatteri, poiché permetterebbe di aumentare l'efficienza di conversione energetica nei PBRs e contestualmente di sfruttare a scopi commerciali i pigmenti che lo mediano.

1.3.1 Fotosintesi e Ficobiliproteine (PBPs)

Le clorofille e i carotenoidi, i principali pigmenti fotosintetici, assorbono una buona parte della radiazione elettromagnetica nell'UV-visibile. Tuttavia, riflettono completamente radiazioni di lunghezza d'onda compresa tra 500 e 650 nm (Tanaka et al., 2019). L'incapacità del processo fotosintetico di sfruttare queste radiazioni (e l'energia associata) è nota come “*Green Gap*” (Koifman et al., 2021). In natura, però, i cianobatteri e le alghe rosse estendono l'attività fotosintetica a queste lunghezze d'onda, grazie alla presenza di pigmenti accessori noti come *ficobilisomi* (PBSs). I PBSs sono grossi complessi multi-proteici associati alla membrana dei tilacoidi, capaci di assorbire fotoni di lunghezza d'onda compresa tra 450-650 nm (giallo-verde) e di trasferirne l'energia alla clorofilla presente nei fotosistemi I e II (Adir et al., 2020). I PBSs sono composti da due tipi di molecole: cromofori tetrapirrolici, le *biline* (PB), sono legati covalentemente a differenti proteine, in generale note come *ficobiliproteine* (PBPs) (Lamparter, 2004; Richardson, 2022). La composizione proteica dei PBSs è molto complessa. L'unità minima è rappresentata da un etero-dimero $\alpha\beta$, formato dalle omonime subunità che legano covalentemente i cromofori PB (Ma et al., 2022). Gli etero-dimeri si associano a formare una struttura trimerica $\alpha\beta_3$ di forma discoidale e con uno spazio vuoto al centro. Due trimeri, a loro volta, si impilano a formare una struttura esamerica ($\alpha\beta_6$).

(Dagnino-Leone et al., 2022). La sovrapposizione di diversi esameri, infine, dà vita alla complessità strutturale dei PBSs. Essa può essere comunque semplificata in due distinte macro-regioni. La regione più interna, a contatto con la membrana dei tilacoidi, detta “core”, è formata da *alloficocianina* (APC) la cui λ_{\max} di assorbimento è 650 nm (H. Chen et al., 2022). La APC non ha un ruolo attivo nella cattura dell’energia luminosa: essa, infatti, tramite delle proteine linker, ancora i PBSs alla membrana dei tilacoidi, nei pressi dei centri di reazione; inoltre, i cromofori presenti (*ficocianobiline* – PCBs) fanno da “ponte” tra i fotosistemi e le regioni più distali dei PBSs, note come “rods”. Questi sono delle strutture di forma cilindrica e cave al centro, tenute insieme da diverse proteine linker (Sanfilippo et al., 2019). Tale geometria è data da esameri impilati di altri due tipi di PBPs: la *ficocianina* (PC – $\lambda_{\max} = 620$ nm) e la *ficoeritrina* (PE – $\lambda_{\max} = 565$ nm) (Figura 1.10, a) (Dagnino-Leone et al., 2022). Queste due PBPs e i loro cromofori (rispettivamente *ficocianobilina*, PCB e *ficoeritrobilina*, PEB) rappresentano delle vere e proprie antenne che assorbono le λ tra 500 e 650 nm e trasferiscono l’eccitazione, passando per le APC, alla clorofilla nei centri di reazione (Figura 1.10, b).



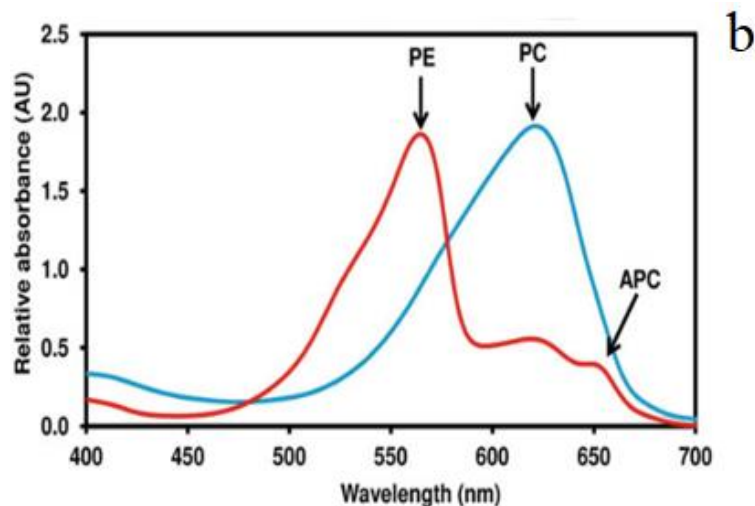


Figura 1.10 (a) Organizzazione strutturale dei PBSs; **(b)** Spettri di assorbimento dei tre cromofori principali costituenti i PBSs (Rastogi, 2021).

La composizione dei PBSs è estremamente dinamica: ad eccezione della APC e della PC che occupa la porzione più interna dei *rods*, detta appunto *costitutiva* (PCc), il livello di espressione di PE, PC e delle altre proteine associate dipende non solo dalla *qualità* della luce incidente ma anche dalla presenza di azoto e dall'organismo investigato (Grossman et al., 1993; Liotenberg et al., 1996; Ojit et al., 2015). Le PBPs rappresentano, dunque, una importante risorsa adattativa per i cianobatteri (si veda par. §1.3.3) ma non soltanto: per le loro proprietà esse trovano applicazione in diversi settori.

1.3.2 Applicazioni delle PBPs

Secondo un report di *Future Market Inside*, il valore commerciale al 2018 delle PBPs si attesta sui 112,3 milioni di USD (H. T. Tan et al., 2021). A seconda del settore di mercato in esame e del grado di purezza, il prezzo al grammo di questi pigmenti varia da 130 a 15,000 USD (Pagels et al., 2019). Bisogna inoltre considerare la progressiva sensibilizzazione dell'opinione pubblica sull'uso di chemicals nocivi per la salute umana e dell'ambiente (Kannaujiya et al., 2021). In questo senso, le PBPs si presentano in diversi segmenti di mercato come un'alternativa naturale e sicura per il consumatore. In ambito alimentare, i coloranti blu sicuri e naturali sono pochi. Nel 2013, la *Food and Drug Administration* ha approvato la commercializzazione di PC da *Spirulina* spp. ed oggi viene sfruttata come colorante naturale e additivo nutrizionale in alimenti, bevande e inchiostri da

diverse aziende (Stanic-Vucinic et al., 2018). APC, PE e PC hanno proprietà spettroscopiche che le rendono sfruttabili nelle biotecnologie e nella biologia molecolare: esse sono usate come *probes* fluorescenti in immuno-biologia, nel *DNA tagging*, nelle tecniche citometriche e microscopiche e nella diagnosi tissutale e tumorale (Kannaujiya et al., 2021; Vinothkanna et al., 2020). Le PBP s stanno suscitando interesse di numerosi ricercatori e industrie per le potenziali applicazioni in ambito biomedico. La PC ha mostrato attività antiossidante contro radicali perossidi e superossidi (Wu et al., 2016). Studi *in vivo* hanno indicato una buona attività di scavenging contro danni ossidativi al fegato e ai reni (Garcia-Pliego et al., 2021; Yufeng Liu et al., 2000). Diversi studi hanno evidenziato che le PBP s possono fungere da anti-infiammatorio (Guo et al., 2022; Prabakaran et al., 2020; Reddy et al., 2000). La PC è risultata attiva contro infiammazioni in cellule epiteliali della prostata e bronchiali (Bergandi et al., 2022). La PC di *S. platensis* sembra avere una attività inibitoria sulla proliferazione di cellule tumorali *in vitro* (Yufeng Liu et al., 2000). Un risultato simile è stato descritto da Li su cellule HeLa (Li et al., 2006). Studi più recenti mostrano come la PC potrebbe bloccare la transizione *epithelial-to-mesenchymal* (EMT) in cellule tumorali cervicali (Ji et al., 2020). La PE potrebbe avere effetti terapeutici per i pazienti affetti da Alzheimer, poiché sembra inibire BACE1, precursore dell'accumulo di proteine β -amiloidi (Chaubey et al., 2019). Infine, le PBP s hanno una spiccata attività antibiotica e antivirale e potrebbero essere supplementate nella dieta dell'uomo e animali come modulatori del microbioma intestinale (Pendyala et al., 2021; Qi et al., 2019).

1.3.3 Adattamento Cromatico Complementare (CCA)

La dinamicità dei PBSs e delle loro componenti non solo amplia lo spettro di radiazioni assorbite per il processo fotosintetico, ma consente di mantenere alta l'efficienza fotosintetica in tutti quei casi in cui alcune lunghezze d'onda non siano disponibili o siano preponderanti rispetto ad altre, come avviene a causa della stagionalità, della latitudine o della foto-competizione con altri organismi autotrofi. Tale caratteristica venne descritta per la prima volta nel 1902 da Gaidukov (Sanfilippo et al., 2019). Egli osservava che alcuni cianobatteri (*Oscillatoriales*) cambiavano colorazione in funzione delle lunghezze d'onda a cui venivano esposti: rossa se esposti a luce verde-gialla, blu-verde se esposti a luce rossa. Questo

meccanismo adattativo di risposta alle condizioni di luce venne appunto chiamato *Adattamento Cromatico Complementare* (CCA). Oggi sappiamo che non tutti i cianobatteri, nonostante capaci di esprimere almeno una delle PBP, mostrano tale responso adattativo. In generale, dunque, il fenomeno viene descritto come *Acclimatazione Cromatica* (*Chromatic Acclimation* - CA), declassando la CCA ad una casistica particolare, appartenente solo ad alcune specie. Esistono sei diversi tipi di CA. Tre di questi rispondono a lunghezze d'onda del verde e del rosso (CA1, CA2 e CA3), tre sono attive nel blu e nel rosso lontano (*far red*) (CA4, CA5 e CA6) (Sanfilippo et al., 2019). Questi ultimi, a differenza dei tre precedenti, non saranno trattati in questa sede.

1.3.3.1 CA di *tipo I* e di *tipo II*

L'acclimatazione cromatica di *tipo I* (CA1) è stata scoperta di recente in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Questo e tutti gli organismi che sfruttano questa tipologia di CA non sono capaci di esprimere la PE, per cui i PBSs sono composti esclusivamente da APC e PC (Kondo et al., 2005). Nella CA1, l'esposizione a luce rossa (RL) o verde (GL) attiva i fotorecettori CcaS. Questi, a sua volta, determinano l'espressione di *CpcG1* e *CpcL*, due proteine linker che ancorano i *rods* di PC, rispettivamente, al *core* di APC e al PSI (Watanabe et al., 2014). In esposizione a RL viene espresso *CpcG1* e l'APC, quest'ultima assente in GL, in cui la PC ed i *rods* sono direttamente ancorati al PSI grazie a *CpcL* (Deng et al., 2012).

Gli organismi capaci di CA di *tipo II* (CA2), tra cui *Nostoc punctiforme*, possiedono invece nei *rods* sia la PC che la PE (Hirose et al., 2010; Tandeau De Marsac, 1977). Mentre i livelli di PC restano costanti in entrambe le condizioni, in GL si ha una maggiore espressione di PE e un conseguente arricchimento di questa nei PBSs (Hirose et al., 2010). Ciò sarebbe dovuto al *sensing* della GL ad opera di *CcaS* e *CcaR* che a cascata permettono l'espressione di *CpcL*, *CpeR*, un linker della PE ai *rods*, e *CpeR1*, un attivatore dell'espressione della PE (Cobley et al., 2002; Seib et al., 2002; Watanabe et al., 2014).

1.3.3.2 CA di *tipo III*

Il CA di *tipo III* (CA3, anche noto semplicemente come CCA) è presente solo in alcuni organismi, tra cui *Tolypothrix* sp. PCC 7101 e *Synechococcus* ATCC 29403

(Montgomery, 2022). Nonostante si tratti della tipologia più complessa di CA, è quello maggiormente caratterizzato. Nel CCA si osserva una differente composizione in PE e PC nei PBSs in funzione della lunghezza d'onda, come nel CA2. Al contrario di quest'ultimo, però, in GL si ha una diminuita espressione di PC, a favore della PE, e viceversa in RL. E infatti questo meccanismo di risposta reversibile può essere facilmente osservato come un cambio di colore (e probabilmente anche della morfologia, lunghezza e numero di filamenti) delle cellule: rosso in GL, dovuto alla prevalenza di PE, e blu-verde in RL, dovuto alla prevalenza di PC (Figura 1.11) (Stomp et al., 2004).

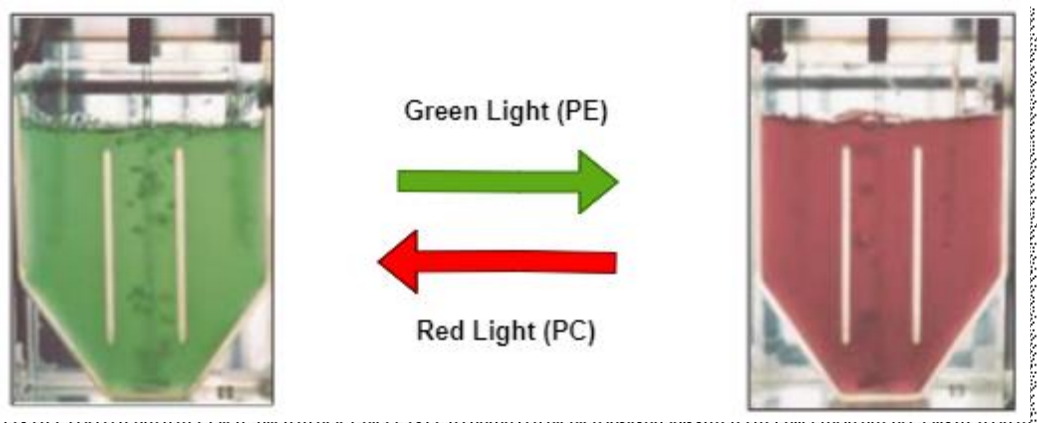


Figura 1.11 CCA osservato in *Tolypothrix* sp. in funzione dello shift di luce: in GL (dx) i rods sono arricchiti del pigmento rosso PE; in RL (sx) i rods sono arricchiti del pigmento blu-verde PC (Stomp et al., 2004).

A livello molecolare il CCA è regolato da una famiglia di fotorecettori, tra cui *RcaE*, *RcaF* e *RcaC*. In RL, *RcaE* mostra una spiccata attività chinasi: la fosforilazione ad opera di questo di *RcaF* ed *RcaC*, porta alla repressione dell'operone *cpeC*, all'interno del quale sono presenti geni codificanti le subunità della PE (*cpeBA*), l'ossidoriduttasi per la produzione di PEB (*pebAB*) e le proteine linker associate alla PE. Simultaneamente *RcaC* dirige l'attivazione dei geni codificanti la PC e il suo cromoforo presenti nell'operone *cpc2*. In GL, invece, prevale l'attività fosfatasi di *RcaE*. *RcaC* non è più capace di reprimere l'operone *cpeC* e di attivare l'operone *cpc2*. Contestualmente si ha un aumento dell'espressione di *CpeR*, attivatore trascrizionale dei geni *cpeBA* e *pebAB* e dunque un accumulo di PE nei PBSs (Figura 1.12) (Montgomery, 2022; Sanfilippo et al., 2019).

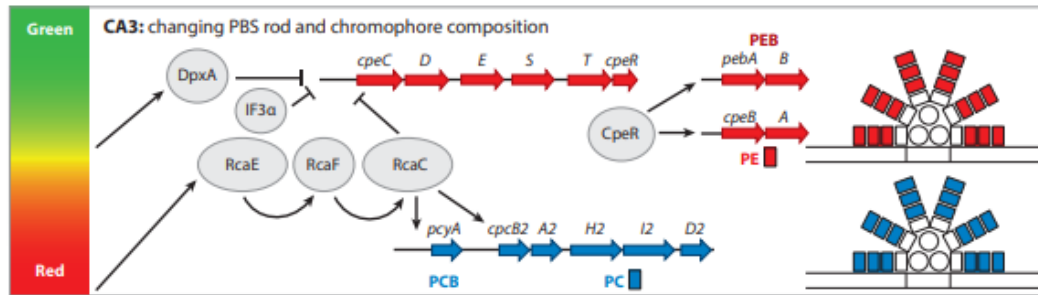


Figura 1.12 Espressione di differenti PBP in funzione della lunghezza d'onda di luce di esposizione per CCA di tipo 3 (Sanfilippo et al., 2019).

1.3.3.3 Potenzialità Biotecnologiche e Industriali del CCA

Il CCA si è evoluto per rispondere alle variazioni ambientali di luce. Negli ecosistemi acquatici e marini le lunghezze d'onda del PAR raggiungono differenti strati della colonna d'acqua (Hutchinson et al., 2007). La possibilità di modulare finemente la composizione dei PBSs permette ad alcuni cianobatteri, dunque, di occupare quelle nicchie irradiate prevalentemente da lunghezze d'onda non sfruttate (giallo-verde) e di superare così la foto-competizione, instaurando una coesistenza con altri organismi fotosintetici (Agostoni et al., 2016; Stomp et al., 2008). Questo fenomeno naturale può essere visto come una risorsa e un'opportunità dal punto di vista industriale e biotecnologico. Il CCA potrebbe infatti essere sfruttato come strategia per instaurare una coesistenza neutrale o benefica tra due specie foto-autotrofe. Tuttavia, nonostante siano molteplici gli studi volti alla caratterizzazione ecologica e molecolare del meccanismo del CCA, non ci sono esempi del suo utilizzo a scopi industriali e/o commerciali. Stomp et al. (2004) hanno testato in scala di laboratorio la parziale infondatezza dell'*esclusione competitiva*, meccanismo attraverso cui, in una data nicchia, i fotoni assorbiti da una specie non sono sfruttabili per la fotosintesi di altri organismi (Huisman et al., 1994). Essi hanno dimostrato che il cianobatterio *Tolypothrix* sp. è capace di sfruttare il CCA per coesistere in co-cultura con due ceppi diversi di *Synechococcus* BS4 e BS5, esponenti, rispettivamente, ficocianina e ficoeritrina, in luce bianca. Allo stesso modo anche BS4 e BS5 sono capaci di coesistere in co-cultura. Ciò è dovuto al *partizionamento* della luce disponibile tra le diverse specie nella stessa

coltura (Stomp et al., 2004). Ulteriori evidenze mostrano che il CCA sia effettivo nell'adattamento a lungo termine a certe condizioni luminose e sia suscettibile alle fluttuazioni luminose, tipiche della luce solare (Agostoni et al., 2016; Campbell, 1996). Quest'ultima evidenza ben si coniuga con la possibilità di sfruttare il CCA in PBR con illuminazione artificiale, dove l'intensità e la qualità della luce sono costanti nel tempo. La “*coesistenza non competitiva*” di due specie potrebbe migliorare parametri come la produttività e la resa, ma soprattutto, a parità di energia elettrica in input, fornire una maggiore conversione energetica.

1.4 Microalghe come biostimolanti agricoli

Secondo il report “*World Population Prospects*” delle Nazioni Unite, nel 2100 più di 10 miliardi di persone abiteranno il nostro pianeta (Gaigbe-Togbe et al., 2022). Per sfamare tutti sarà necessario un continuo incremento della produttività agricola. Le soluzioni attuate negli ultimi anni per raggiungere tale scopo non sono, tuttavia, sostenibili. La massiva deforestazione causa la perdita di 5 milioni di ettari di foreste all’anno e l’aumento di gas serra (GHGs) rilasciati in atmosfera (Kruid et al., 2021; Pendrill et al., 2019). Parallelamente, l’uso indiscriminato di fertilizzanti e pesticidi ha un pesante impatto sulla salute dell’ambiente e dell’uomo (Zhang et al., 2018). Secondo la FAO (*Food and Agriculture Organization*), nel 2022, la domanda globale di fertilizzanti chimici è di 200.000 tonnellate (FAO, 2019). Gli effetti di queste pratiche, tra cui il deterioramento degli ecosistemi e l’inasprimento della crisi climatica, possono tradursi, paradossalmente, in un drastico calo della produttività nel lungo termine. L’agricoltura del futuro si baserà, dunque, su un compromesso: l’incremento della resa dovrà esser conseguito nel rispetto dell’ambiente. Fra le tecnologie emergenti negli ultimi anni troviamo i *biostimolanti*, sostanze naturali che stimolano la crescita e la resistenza delle piante comunemente coltivate, in sostituzione dei convenzionali pesticidi e fertilizzanti. Di recente, le microalghe sono state proposte come una potenziale alternativa “*green*” e sostenibile. Esse sono, infatti, ricche di carboidrati, proteine, vitamine e altre sostanze nutrienti funzionali per l’agricoltura e l’orticoltura. L’estrazione di biostimolanti algali può essere intrapresa con un approccio di “*biorefinery*” per abbassare i costi di produzione.

1.4.1 Biostimolanti tradizionali

L’importanza acquisita dal settore dei biostimolanti nell’ultima decade può essere estrapolata da diversi dati: il mercato globale è stimato in 2,66 miliardi di euro nel 2022 e sono stati pubblicati più di 700 paper scientifici sull’argomento (Colla et al., 2020). A tale crescita di interesse, tuttavia, non corrispondono ancora quadri normativi e legislativi chiari. In Europa, prima l’EBIC (*European Biostimulants Industry Council*) e poi l’UE hanno fornito delle linee guida sommarie per la registrazione di prodotti ad uso biostimolante in agricoltura (Bell et al., 2022).

Precisi standard qualitativi e legislativi per la loro produzione e commercializzazione, pertanto, potrebbero dare una grossa spinta a questo settore. A questo si aggiunge la necessità di ulteriori studi e ricerche per avere dati rigorosi circa l'esatta modalità di azione delle diverse sostanze biostimolanti e il loro possibile impatto sull'agricoltura e sull'ambiente.

Sono definite “*biostimolanti*” quelle sostanze (organiche o inorganiche) applicate a bassa concentrazione o inoculi di microorganismi capaci di sostenere la crescita e migliorare la qualità delle piante ad uso agro-alimentare (du Jardin, 2015). Tale effetto è da ricondurre alle sostanze nutritive presenti: polisaccaridi, amminoacidi, vitamine, fitormoni, oligoelementi ecc. (Mutale-Joan et al., 2022). Rappresentano un trattamento agricolo a parte rispetto ai fertilizzanti o ai pesticidi convenzionali. Infatti, nessuna sostanza specifica viene fornita direttamente ed in concentrazione tale da esser considerata come nutriente (Drobek et al., 2019). I biostimolanti oggi commercializzati sono discriminabili in diverse categorie di seguito elencate (Bell et al., 2022; du Jardin, 2015; Ramawat et al., 2022):

- *sostanze umiche* (acido umico e fulvico – HA e FA), principalmente sostanze organiche, normalmente presenti nel suolo, derivanti da processi di decomposizione;
- *idrolisati proteici* (PHs), misture di peptidi bioattivi e amminoacidi liberi estratti da diversi organismi;
- *polisaccaridi*;
- *composti inorganici*, come i silicati;
- *microorganismi*, come funghi e batteri;
- *macro- e microalghe* e loro estratti.

Gli effetti benefici dimostrati in ambito agricolo dai biostimolanti sono numerosi. L'aumento della resa e il miglioramento della qualità osservati sono raggiunti mediante differenti meccanismi d'azione. Essi arricchiscono la rizosfera e la fillosfera di sostanze nutritive e ne facilitano l'uptake all'interno delle piante (Kapoor et al., 2021). Alcune molecole bioattive possono simulare l'attività di fitormoni come l'auxina, le gibberelline e le citochinine, determinando un potenziamento della divisione cellulare, della formazione radicale, della

germinazione dei semi e della fioritura, così come un ritardo nella senescenza e un maggior sviluppo vascolare. I biostimolanti promuovono, inoltre, maggiore resistenza a stress abiotici (salinità, allagamenti, siccità ecc.) (González-Pérez et al., 2022). Svolgerebbero inoltre un importante ruolo di *bio-controllo* dei fitopatogeni che impattano negativamente sulla produttività, attraverso meccanismi di esclusione competitiva o innescando risposte difensive nelle piante, come l'*induced systemic resistance* (ISR) (Pieterse et al., 2014). Al contrario dei comuni pesticidi e fertilizzanti, i biostimolanti preservano l'integrità degli ecosistemi: la mobilitazione di minerali e molecole organiche e la migliore aerazione e "water-holding capacity" del suolo hanno effetti benefici non solo per le piante ma anche per le comunità batteriche indigene (Mukherjee et al., 2020; Wang et al., 2016).

1.4.2 Microalghe come Biostimolanti

Le alghe verdi e i cianobatteri rappresentano, in diversi settori, l'alternativa più appetibile, in termini di sostenibilità, impatto ambientale e facilità di coltivazione. Se da un lato esse rappresentano una fonte di energia e chemicals carbon-neutra e carbon-negativa, contestualmente sono ricche di molecole nutritive e bioattive, utili in ambito agro-alimentare. In quest'ultimo caso, le microalghe accumulano grandi quantità di azoto e fosforo (e.g. da processi di *wastewater treatment*) e sintetizzano diverse biomolecole con attività fitostimolante.

1.4.2.1 Molecole Bioattive

I *polisaccaridi* sono tra le molecole maggiormente sintetizzate dalle microalghe (Pan et al., 2019). Esopolissaccaridi (EPS), carragenani e β -glucani agiscono principalmente stimolando la riduzione e lo scavenging di ROS che vengono accumulati dalle cellule vegetali in presenza di forti stress biotici e abiotici (Chanda et al., 2019). La stessa attività antiossidante e antimicrobica viene svolta da *clorofilla*, *carotenoidi* e numerose molecole *fenoliche* e *polifenoliche* di cui specie d'interesse industriale come *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella vulgaris* e *Botryococcus brownii* accumulano e rilasciano grosse quantità (Shebis et al., 2013). *Poliamine* e *betaine* (spermina, glicina-betaina ecc.), presenti in *A. platensis* e *A. nodosus*, sono protettive contro diversi stress abiotici, su tutti lo stress salino, prevenendo la perdita di acqua dalle cellule (Mógor et al., 2018). Dalle microalghe

possono essere estratti *idrolisati proteici* contenenti amminoacidi e proteine, che modulano il metabolismo primario del carbonio e dell'azoto, e peptidi bioattivi che hanno attività chelante di metalli pesanti tossici e fitormonale (Colla et al., 2017). Infine, le microalghe sintetizzano e secernono nell'ambiente fitormoni che stimolano la crescita, la fioritura e altri processi fisiologici. *Scenedesmus* sp. e *Arthrospira* sp. contengono alti livelli di etilene (Plaza et al., 2018). Auxina e suoi precursori, sono prodotti da cianobatteri (*Nostoc* spp. e *Anabaena* spp.) ed alghe verdi (*C. vulgaris*, *S. quadricauda*, *C. pyrenoidosa* ecc.) (Pan et al., 2019; Plaza et al., 2018). Numerose altre specie producono *gibberelline*, coinvolte nella germinazione dei semi, *citochinine*, che promuovono la divisione cellulare ed il differenziamento, *acido abscissico*, *jasmonato* e *acido salicilico*, fondamentali nella difesa da patogeni (Munaro et al., 2021).

1.4.2.2 Applicazioni delle microalghe come biostimolanti

La somministrazione di microalghe o consorzi alle piante può essere effettuata secondo due modalità. In taluni casi, la biomassa intera, secca o umida, può essere usata direttamente come inoculo. Alternativamente si procede ad una estrazione chimica (solventi, acidi/basi, detergenti ecc.), fisica (ultrasuoni, microonde ecc.) o enzimatica delle componenti nutritive intracellulari e alla loro purificazione prima della somministrazione (Vijay et al., 2018). Quest'ultima modalità richiede un maggior dispendio di risorse anche se permette l'estrazione di sostanze bioattive specifiche, evitando, ad esempio, problemi di tossicità (Kapoore et al., 2021; Ronga et al., 2019). La biomassa o i suoi estratti, in forma liquida o solida, possono essere somministrate nel suolo, nei semi, nelle foglie o nelle radici e con diverso *timing*, cioè nel corso dell'intera fase vegetativa oppure limitatamente alla fase di germinazione, fioritura o prima/dopo un evento causa di stress per la pianta (Drobek et al., 2019).

Oggi diverse compagnie producono e commercializzano biostimolanti e biofertilizzanti a base microalgale. L'azienda spagnola NeoAlgae produce una linea di biostimolanti commercialmente noti come Spiragro®. La compagnia AlgaEnergy produce biostimolanti e biopesticidi AgriAlgae®. Tuttavia, diverse specie continuano ad essere testate in laboratorio e sul campo per valutarne l'attività biostimolante. *Chlorella* spp. è una delle più sfruttate, poiché facile da coltivare e

ricca di macronutrienti e molecole bioattive (Ortiz-moreno et al., 2019). Estratti di *Chlorella ellipsoidea* e *C. sorokiniana* hanno, rispettivamente, favorito la crescita vegetativa fogliare e radicale in pomodoro (*Solanum lycopersicum*) e accelerato il tempo di germinazione in patata e riso (*Oryza sativa*) (Do et al., 2020; Mutale-joan et al., 2020). L'applicazione di *C. vulgaris* in differenti casi è risultata benefica per le proprietà del suolo, aumentando la concentrazione di nutrienti e fosforo (Agwa et al., 2017; Schreiber et al., 2018). La somministrazione di estratti di *Scenedesmus obliquus* in semi di fagiolo (*Vigna radiate*) e cetriolo (*Cucumis sativus*) ha mostrato un incremento importante dell'attività auxino- e citochinino-simile (Navarro-López et al., 2020). *Dunaliella salina* ha migliorato la percentuale di semi germinati in grano (*Triticum aestivum*) sottoposto a stress salino (Baouchi et al., 2016). Risultati simili sono stati ottenuti con *C. vulgaris* somministrata per via fogliare in guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) (Kusvuran et al., 2019). In alcuni casi si possono anche usare consorzi microalgali per aumentare l'effetto biostimolante. Supraja et al. (2020) hanno somministrato estratti di un consorzio di *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina* e *Synechocystis* a piante e semi di pomodoro, osservando un incremento nel peso di biomassa del 46% e una maggiore velocità di germinazione.

1.5 Scopo della tesi

Nel presente elaborato di tesi sperimentale viene valutata l'efficacia del meccanismo di Adattamento Cromatico Complementare (CCA) in un contesto di foto-competizione, messo a punto allo scopo di aumentare la produttività di biomassa e l'efficienza di conversione energetica di fotobioreattori in continuo con sistema di illuminazione artificiale. Ciò è stato fatto coltivando in consorzio il cianobatterio *Tolypothrix tenuis* (capace di iterare il CCA di tipo 3) e la microalga verde *Scenedesmus obliquus*, variando le condizioni di luce. Nello specifico, la concentrazione di biomassa e l'efficienza fotosintetica sono state misurate e confrontate utilizzando lampade LED e variando l'intensità (150 e $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e la lunghezza d'onda (Bianco, Arancione, Rosso e Lime) della luce incidente. La condizione con miglior efficienza di conversione è stata ottimizzata per la produttività variando il tempo di permanenza. La biomassa in uscita dal fotobioreattore, infine, è stata raccolta, caratterizzata (proteine, pigmenti, carboidrati ed esopolisaccaridi) e, in seguito, trattata per estrarre selettivamente le ficobiliproteine, pigmenti con diverse applicazioni industriali e di alto valore commerciale. Con un approccio di "biorefinery" la biomassa rimanente dal processo di estrazione è stata valorizzata testandone l'attività biostimolante sulla germinazione di semi di cetriolo (*Cucumis sativus*).

CAPITOLO 2 – Materiali e Metodi

2.1 Specie Coltivate e Condizioni di Crescita

Il cianobatterio *Tolypothrix tenuis* PCC 7101, capace di sfruttare il CCA di tipo 3, e la microalga verde *Scenedesmus obliquus* SAG 276-7, sono stati coltivati in monoculture (controllo) ed in consorzio (test) a diverse condizioni di luce e tempi di permanenza, in modo da valutare la produttività e l'efficienza fotosintetica quando le due specie si trovano in foto-competizione (Figura 2.1).

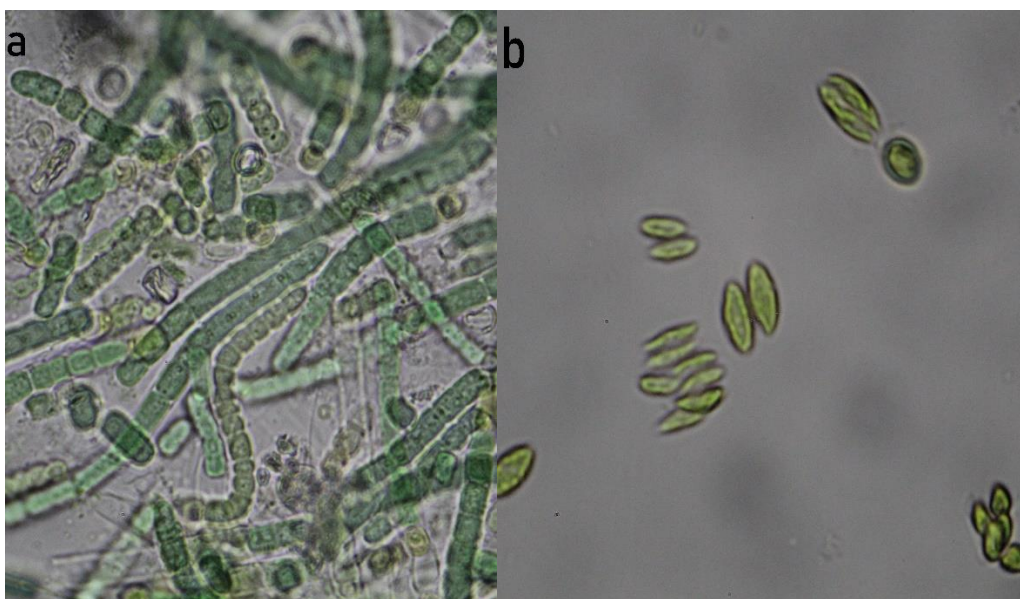


Figura 2.1. Immagine ottenuta al microscopio ottico (100x) delle due specie coltivate. **a)** *Tolypothrix tenuis* PCC 7101 e **b)** *Scenedesmus obliquus* SAG 276-7.

Le specie sono state coltivate in batch ed in continuo in fotobioreattori all'interno di un incubatore termostato a temperatura costante di 30°C e insufflate costantemente con aria e CO₂ (5% v/v), a pH compreso tra 7,5 – 8,5, misurato quotidianamente con il pH-metro Hanna (HI 9124). Il terreno di crescita utilizzato è il BG11 modificato rispetto alla composizione originale da Rippka et al. (1979), raddoppiando le concentrazioni (2X) negli esperimenti in continuo, per evitare l'interferenza della limitazione di nutrienti sui risultati, e sostituendo l'Hepes con bicarbonato di sodio (NaHCO₃) per tamponare il pH. La composizione del terreno utilizzato è mostrata nella Tabella 2.1. Il mescolamento è stato garantito dalla presenza di agitatori magnetici. L'intensità luminosa incidente e in uscita dal

fotobioreattore (misurata in $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) è stata monitorata durante tutto il corso degli esperimenti usando il fotoradiometro Delta OHM (HD 2102.1).

Tabella 2.1. Composizione del terreno BG11 modificato.

Componente	BG11 [mg L ⁻¹]
Na ₂ Mg EDTA	2
(NH ₄) ₅ [Fe(C ₆ H ₄ O ₇) ₂]	12
Acido Citrico · 6H ₂ O	12
CaCl ₂ · 6H ₂ O	72
MgSO ₄ · 7H ₂ O	15
K ₂ HPO ₄	6,1
H ₃ BO ₃	5,72
MnCl ₂ · 4H ₂ O	3,62
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,44
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,16
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,1
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,8
NaNO ₃	200
Na ₂ CO ₃	3000
NaHCO ₃	1,5

2.2 Sistema di Illuminazione

Per valutare l'effetto dell'intensità e della qualità della luce sulle variabili operative indagate e sulle dinamiche di competizione i PBRs sono stati illuminati con diversi LED (*Light Emitting Diodes*) in luce continua. Il LED bianco (energia del fotone, $E_p = 204,90 \text{ kJ mol}^{-1}$; efficienza di conversione, $\eta = 0,65$)(WL) è stato testato a due diverse intensità di illuminazione (*Photon Flux Density* – PFD), $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, in modo da selezionare quella con maggiore efficienza fotosintetica con cui proseguire gli esperimenti sfruttando i LED monocromatici.

Il LED rosso ($E_p = 185 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\eta = 0,78$;) (RL), il LED arancione ($E_p = 194,53 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\eta = 0,73$) (OL) e il LED lime ($E_p = 227,41 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\eta = 0,5$) (GL), sono stati

settaggi ad un PFD di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. In Figura 2.2 sono mostrati i LED e i corrispettivi spettri di emissione. Nella tabella 2.1 sono riassunte le specifiche di ogni lampada LED utilizzata (Tabella 2.1).

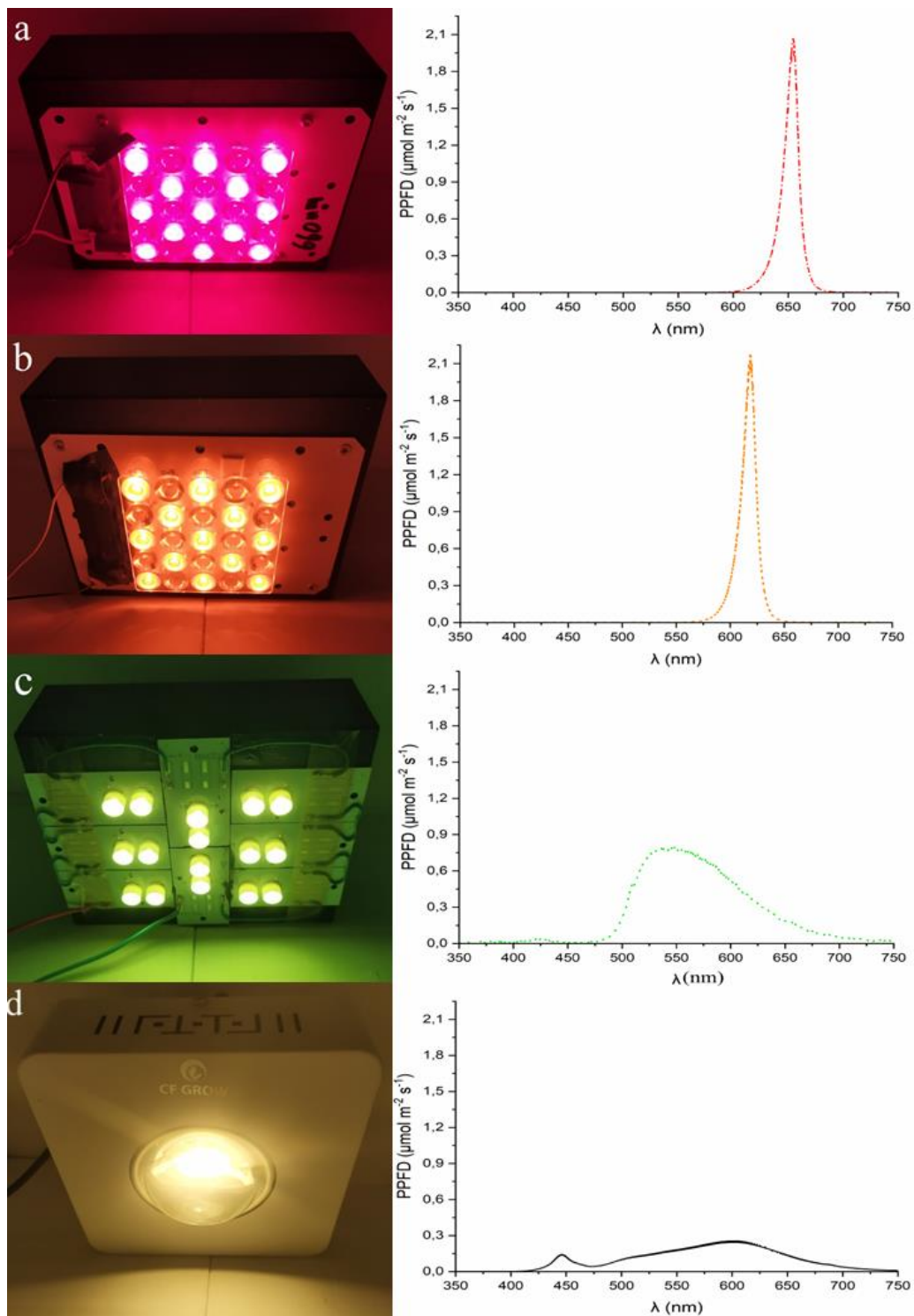


Figura 2.2. Lampade LED rossa (a), arancione (b), lime (c) e bianca (d) e corrispettivi spettri di emissione normalizzati.

Tabella 2.1 Specifiche delle lampade LED utilizzate per gli esperimenti.

LED	$\lambda_{EM\ MAX}$ (nm)	E_P (kJ mol ⁻¹)	η (%)
RL	665	185	78
OL	618	194,53	73
WL	/	204,9	65
GL	537	227,41	50

2.3 Sistemi di Coltivazione

In una fase preliminare, *T. tenuis* è stato coltivato in batch utilizzando diversi spettri di illuminazione; successivamente le due specie in consorzio e i rispettivi controlli sono stati coltivati in PBRs in continuo.

2.3.1 Esperimenti in Batch

T. tenuis è stato coltivato in modalità batch in bottiglie Quickfit® Drechsel, di volume di 200 mL e diametro di 5 cm, mescolate dal basso con agitatori magnetici e insufflate con aria e CO₂ (Figura 2.3). Lo scopo è quello di caratterizzarne la crescita in diverse condizioni di luce ed estrapolare dei dati preliminari sull'adattamento cromatico di questa specie in coltura. Sono stati svolti esperimenti di crescita utilizzando i diversi LED descritti al paragrafo 2.2 (Figura 2.2 a, b e d). Ciascun esperimento è stato eseguito in doppio biologico e ad un'intensità di luce incidente di 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Per ogni condizione, la coltivazione ha avuto una durata di 8 giorni, partendo da una concentrazione iniziale (C_0) con un OD₇₅₀ di 0,3.

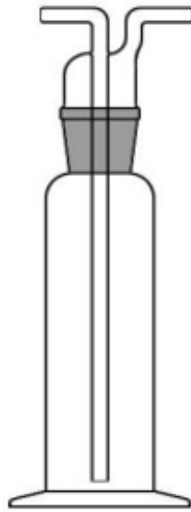


Figura 2.3 Rappresentazione di una bottiglia Quickfit® Drechsel;

Durante gli esperimenti sono state misurate quotidianamente la concentrazione di cellule e pigmenti (clorofilla, carotenoidi e ficobiliproteine).

2.3.1.1 Analisi Respirimetica

Data la scarsità di dati in letteratura, sono stati condotti degli esperimenti preliminari in batch per indagare la cinetica di crescita di *T. tenuis* in funzione di diverse condizioni di illuminazione. A tale scopo è stata svolta un'analisi respirometrica: il test si basa sulla misurazione della concentrazione di ossigeno disciolto durante i cicli luce-buio. Durante il periodo di luce si ha un incremento della concentrazione di ossigeno disciolto, dovuto all'attività fotosintetica del cianobatterio, durante il periodo di buio l'ossigeno viene consumato nel processo di respirazione cellulare. Durante il test possono essere variate la concentrazione di un nutriente o altre variabili operative target, monitorando così la produzione ed il consumo di ossigeno nelle condizioni testate.. In questo modo è possibile correlare il tasso di produzione di O₂ (Oxygen Production Rate – OPR) alla velocità di crescita delle cellule. Questa correlazione viene fatta sfruttando la cinetica di crescita di Monod, secondo cui la velocità di crescita della biomassa (r_x) dipende dalla concentrazione del nutriente i :

$$\frac{OPR}{c_x} (d^{-1}) = \mu_{MAX} \frac{c_i}{K_i + c_i} = r_x \quad (\text{Eq 2.1})$$

con C_i la concentrazione del nutriente limitante i , μ_{MAX} la massima velocità di crescita del microorganismo (d^{-1}), K_i la “*half-saturation constant*” ($mg L^{-1}$), che rappresenta la concentrazione del nutriente alla quale la velocità di crescita del microorganismo vale la metà della massima, e C_x che rappresenta la concentrazione di biomassa.

Per gli organismi foto-autotrofi, la luce rappresenta il principale nutriente. Quando l'intensità di luce incidente è troppo bassa, l'attività fotosintetica risulta rallentata (foto-limitazione) e viene rilasciato meno ossigeno. Man mano che l'intensità luminosa cresce l'attività fotosintetica raggiunge un plateau (foto-saturazione) oltre il quale la cellula viene danneggiata dall'accumulo di specie ROS (foto-inibizione) che influenzano negativamente l'attività fotosintetica (Vonshak et al., 2004). Questa risposta all'intensità d'illuminazione può essere descritta matematicamente attraverso la cinetica di Haldane, che tiene conto dell'inibizione generata dall'eccesso di substrato. Dunque, fatte queste considerazioni, è stata sfruttata la seguente equazione:

$$\frac{OPR}{C_x} (d^{-1}) = \mu_{MAX} \frac{I}{I + K_i \cdot \left(\frac{I}{I_{OPT}} - 1\right)^2} \quad (\text{Eq. 2.2})$$

Dove I rappresenta l'intensità di luce incidente ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) K_i rappresenta la costante di inibizione ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e I_{OPT} l'intensità di luce ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) a cui si ha il maggior tasso di crescita.

Per eseguire il test respirometrico è stato seguito il seguente protocollo: la biomassa in batch è stata prelevata al quarto giorno di coltura, in modo da avere cellule in attiva crescita (fase esponenziale §1.2.3.2) e acclimatate alla condizione di luce testata; si prepara una soluzione di 90 mL con una concentrazione finale di biomassa di $0,2 \text{ g L}^{-1}$ all'interno di una *flask* di dimensioni $4,2 \text{ cm} \times 4,2 \text{ cm} \times 8 \text{ cm}$; la biomassa nella *flask* viene costantemente mescolata dal basso con un agitatore magnetico e termostatata a temperatura costante di 30°C mentre viene illuminata da una lampada LED in una box isolata da fonti di luce esterne. La concentrazione di O_2 viene misurata nel tempo ($\Delta t = 15$ secondi) usando una sonda Delta OHM HD 2109.1. Sono state testate le seguenti condizioni di intensità luminosa: 75, 150, 300, 600 e $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Per ogni condizione, la variazione di concentrazione

di ossigeno nel tempo viene registrata almeno in quattro repliche grazie al software DeltaLog9, ottenendo un profilo a “dente di sega” con pendenze positive e negative, corrispondenti, rispettivamente, a condizioni di luce e di buio (Figura 2.3). Lo switch tra queste due viene effettuato tramite un controller connesso alla lampada LED. Quando la concentrazione di ossigeno disciolto è vicina a saturazione viene insufflato azoto (N_2) per *striappare* l’ossigeno.

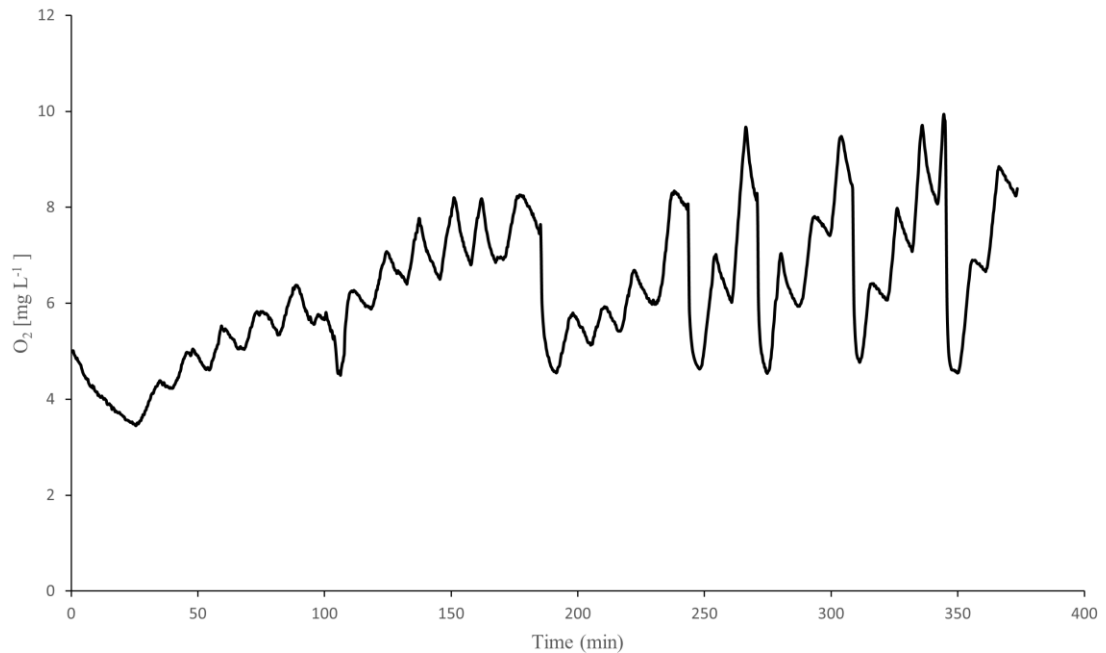


Figura 2.3 Output generato da un esperimento di respirometria con il tipico profilo a “dente di sega”.

Il coefficiente angolare di ogni retta con pendenza positiva rappresenta la velocità di produzione di ossigeno. Questa viene rapportata alla concentrazione di biomassa nota come mostrato nell’ Eq. 2.2 e i parametri cinetici vengono derivati attraverso l’uso del Solver di Excel.

2.3.2 Esperimenti in Continuo

Per gli esperimenti in continuo sono stati utilizzati fotobioreattori con pareti in policarbonato, per permettere il passaggio della luce incidente, con area superficiale di $0,006 \text{ m}^2$ (base = 6 cm; altezza = 10 cm), spessore di 3,5 cm ed un volume operativo di 0,2 L (Figura 2.3).

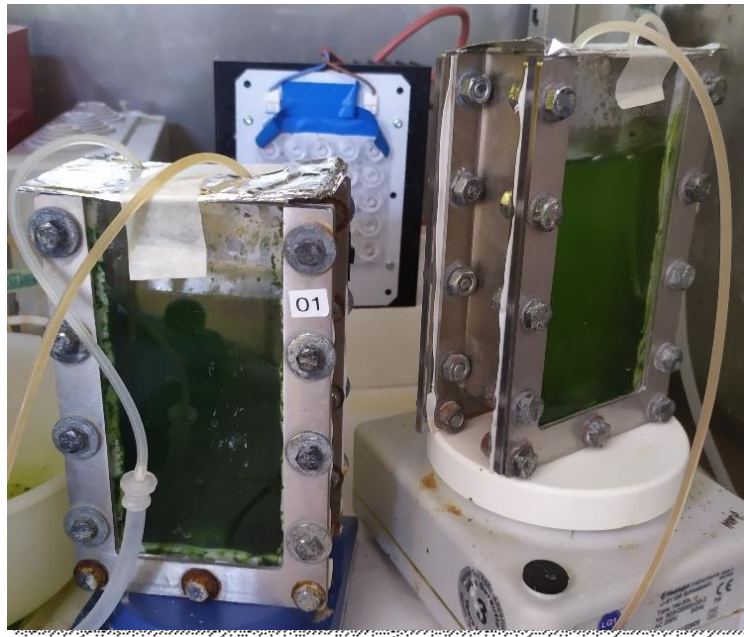


Figura 2.4 Immagine dei fotobioreattori utilizzati per gli esperimenti in continuo.

Questa configurazione è ottimale per ottenere un'illuminazione e un mescolamento omogenei e approssimare il sistema ad un CSTR (*Continuous Stirred Tank Reactor*). Il sistema viene portato a stato stazionario ($Q_e=Q_u$) mantenendo il volume costante nel tempo grazie alla presenza di un "troppo-pieno" (Q_u), per l'efflusso di biomassa e terreno esausto, raccolti in appositi contenitori, e all'ingresso di terreno fresco garantito da una pompa peristaltica e tubi di marprene® con diametro noto (Q_e). Questi vengono inseriti nel reattore senza contattare il liquido di coltura per evitare il fenomeno di "*clogging*" dovuto all'aggregazione delle cellule.

Negli esperimenti in continuo è stata valutata la produttività di biomassa e pigmenti e l'efficienza fotosintetica, andando a variare, rispettivamente, la qualità (λ) e la quantità (PFD - $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) di luce incidente fornita da lampade LED (§2.2), e il tempo di permanenza (τ , days) variando la portata volumetrica in ingresso (Q_e), a parità di volume operativo (V_R), secondo la seguente equazione:

$$\tau = \frac{V_R}{Q_e} \quad (\text{Eq. 2.3})$$

Per le diverse condizioni, dopo un periodo di tre giorni per l'acclimatazione, i campionamenti sono stati eseguiti ogni 24h per un periodo di tempo pari ad almeno

tre volte il tempo di permanenza, per garantire risultati riproducibili.

2.4 Monitoraggio della Crescita Cellulare

La crescita cellulare è stata monitorata e misurata quotidianamente attraverso la misura della densità ottica e del peso secco e attraverso la conta delle cellule.

2.4.1 Densità Ottica (OD)

Le misure di densità ottica (OD) sono state condotte utilizzando uno spettrofotometro a doppio raggio (Shimadzu UV-1900) e cuvette con cammino ottico (l) di 1 cm. La misura dell'assorbanza viene fatta impostando lo strumento a 750 nm per evitare l'interferenza dei pigmenti che assorbono a lunghezze d'onda più basse nel visibile. Lo strumento viene caricato con due cuvette, ciascuna contenente 2 mL di campione: il bianco, composto da terreno BG11 (descritto nella tabella 2.1) per sottrarre nelle misure di assorbanza il contributo delle sue componenti; il campione microalgale.

La misura viene fatta in doppio per ogni campione, mescolando poco prima per evitare la sedimentazione. Dai valori di assorbanza mediati si risale alla concentrazione cellulare, sfruttando la correlazione lineare tra le due variabili descritta dalla legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon_{\lambda} Cl \quad (\text{Eq. 2.4})$$

dove A rappresenta l'assorbanza misurata dallo strumento, ε_{λ} il coefficiente di estinzione molare ad una data lunghezza d'onda, C la concentrazione cellulare ed l il cammino ottico. Tale relazione è valida per valori di A compresi tra 0,1 e 1, poiché in tale range il coefficiente di estinzione è ritenuto costante.

2.4.2 Peso Secco

La concentrazione della biomassa è stata monitorata misurando il peso secco (DW), cioè la quantità di cellule nell'unità di volume. Sfruttando una pompa a vuoto, un volume noto di campione viene posizionato su un filtro di nitrocellulosa con pori di diametro di 0,45 μm , precedentemente seccato e pesato con una bilancia di precisione (Atilon Acculab Sartorius Group®). Azionando la pompa si filtra il

liquido lasciando la sola biomassa sul filtro. Questo viene messo a seccare in forno ventilato ad una temperatura di 110°C per 2 ore circa, prima di pesare nuovamente il filtro.

La concentrazione cellulare viene calcolata come segue:

$$DW(g L^{-1}) = \frac{\text{peso lordo} - \text{tara}}{\text{volume filtrato}} \quad (\text{Eq. 2.5})$$

2.3.3 Conta Cellulare

La conta delle cellule viene fatta al microscopio ottico, usando una Camera Burkler. Questa consiste in un vetrino su cui sono presenti due camerette di 10 μL di volume ciascuna coperte da un vetrino copri-oggetti bloccato ai lati, dove viene inserito il campione per capillarità. All'interno di ogni camera di capillarità è tracciata una griglia dove vengono contate le cellule. La griglia è formata da nove quadrati, delimitati da tre linee parallele, di lato 1 mm. Ognuno di questi, a sua volta, contiene 16 quadrati delimitati da due linee parallele, di lato 0,20 mm (Figura 2.4).

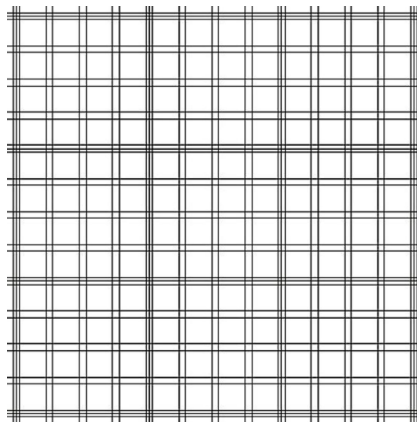


Figura 2.5 Griglia per la conta cellulare di una camera Bürker.

Il campione viene opportunamente diluito in soluzione isotonica e caricato con volume leggermente in eccesso (20 μL) all'interno delle camerette Bürker sfruttando il fenomeno di capillarità. Le cellule vengono contate in tre dei nove quadrati delimitati dalle tre linee parallele, scegliendoli in direzione obliqua, per coprire l'intero vetrino. Ognuno di questi ha una superficie di 1 mm^2 . Il vetrino copri-oggetti viene posizionato lasciando un film di liquido spesso 0,1 mm. Ogni quadrato in cui le cellule sono state contate ha un volume di 0,1 mm^3 (10^{-4} mL).

Il numero di cellule per unità di volume viene calcolato come segue:

$$Cells\ ml^{-1} = nr.\ cellule \cdot 10^4 \cdot d \quad (\text{Eq. 2.8})$$

dove d rappresenta il fattore di diluizione. Come numero di cellule contate ($nr.\ cellule$) si considera la media dei valori ottenuti per ognuna delle tre camere di capillarità.

2.4 Bilanci di Massa ed Energia

2.4.1 Produttività Volumetrica

Negli esperimenti in continuo è stata calcolata la produttività volumetrica ($P_{X,V}$), intesa come la concentrazione di biomassa prodotta per unità di volume nell'unità di tempo. Per un fotobioreattore approssimabile ad un CSTR (§2.3.2) la produttività volumetrica è costante nel tempo. Essa è descritta dall'equazione:

$$P_{X,V} (g\ L^{-1}d^{-1}) = \frac{C_X}{\tau} \quad (\text{Eq. 2.9})$$

dove $C_{X,U}$ rappresenta la concentrazione di biomassa in uscita dal fotobioreattore in condizione CSTR in stato stazionario e τ il tempo di permanenza.

2.4.2 Produttività Areale

È stata anche calcolata la produttività areale ($P_{X,A}$), variabile operativa che è sfruttata maggiormente in letteratura rispetto alla produttività volumetrica. Ciò permette di fare confronti più significativi e diretti. Essa è definita come segue:

$$P_{X,A} (g\ m^{-2}d^{-1}) = P_{X,V} \cdot W \quad (\text{Eq. 2.10})$$

Dove W è lo spessore del cammino ottico all'interno del fotobioreattore (3,5 cm §2.3.2).

2.4.3 Efficienza Fotosintetica ed Energetica

Per potere calcolare l'efficienza di conversione dell'energia in biomassa sono state usate tre equazioni. Utilizzando le misure di Back Irradiance (BI), cioè l'intensità di luce registrata nella parete posteriore del fotobioreattore, è stata calcolata l'efficienza fotosintetica relativa alla sola radiazione luminosa assorbita:

$$\eta_{BI}(\%) = \frac{C_X \cdot LHV \cdot Q_e}{(PFD - BI) \cdot E_P \cdot A_{PBR}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 2.11})$$

dove LHV è il “*Lower Heating Value*” specifico della biomassa microalgale (18,66 kJ/g) (Zaimes et al., 2013), Q_e è la portata volumetrica in ingresso, PFD (Photon Flux Density) l’intensità di luce incidente sul fotobioreattore, E_P l’energia media del fotone e A_{PBR} la superficie illuminata del fotobioreattore (0,006 m²).

Modificando l’Eq 2.11 e utilizzando l’intensità luminosa incidente totale viene calcolata l’efficienza di conversione in biomassa attraverso la seguente equazione:

$$\eta_{PAR}(\%) = \frac{C_X \cdot LHV \cdot Q_e}{PFD \cdot E_P \cdot A_{PBR}} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 2.12})$$

L’efficienza di conversione energetica globale per ogni condizione, infine, è stata calcolata moltiplicando l’efficienza fotosintetica totale e l’efficienza di conversione delle diverse lampade utilizzate secondo l’equazione:

$$\bar{\eta}_E(\%) = \eta_P \cdot \eta_{LED} \quad (\text{Eq. 2.13})$$

2.4.4 Costi Energetici

Conoscendo il costo dell’energia elettrica (€ kWh⁻¹) e le specifiche dei LED utilizzati, è stato possibile calcolare i costi energetici, riferiti alla sola illuminazione, per produrre un chilo di biomassa, secondo la seguente equazione:

$$\text{Costo di Illuminazione}(\text{€ } kg^{-1}) = \frac{E_P \cdot EC}{Y_{APP}} \quad (\text{Eq. 2.14})$$

con EC il prezzo dell’energia elettrica (€ kWh⁻¹) e Y_{APP} la resa di biomassa su luce (g mol_{ph}⁻¹). L’equazione è stata moltiplicata per il fattore di conversione 2,7e -7 per passare da J a Wh.

2.5 Misure Analitiche

Nel corso degli esperimenti sono state monitorate contenuto e produttività di pigmenti e ficobiliproteine. Vicino all’ottimo di produttività è stata svolta una caratterizzazione approfondita della biomassa, misurandone il contenuto di proteine, carboidrati ed esopolisaccaridi (EPS). Infine, l’attività biostimolante del consorzio su semi di cetriolo è stata testata misurando l’attività auxino-simile.

2.5.1 Proteine

Il contenuto di proteine totali nella biomassa è stato misurato seguendo due diversi protocolli: il metodo descritto da Ivleva e Golden (Ivleva et al., 2007) è stato usato per quantificare le proteine presenti nel cianobatterio *T. tenuis*, mentre un altro protocollo è stato usato per la quantificazione in *S. obliquus* (Meijer et al., 1998).

Nel primo caso, un campione di 2 mL di biomassa viene centrifugato a 13.500 rpm per 10 minuti. Una volta rimosso il surnatante, la biomassa viene risospesa in 2 mL di buffer PBS (*Phosphate Buffer Saline*) e si ripete la centrifuga. Dopo aver rimosso il surnatante, il pellet di cellule viene risospeso in 200 μ L di buffer PBS. I campioni vengono congelati a -80°C per almeno 48 ore. La biomassa viene poi sottoposta a shock termico a 37°C per rompere parzialmente le cellule. A questo punto i campioni sono tenuti in ghiaccio per evitare la degradazione delle proteine che si vuole quantificare. A tal proposito, per stabilizzare le proteine si aggiunge in soluzione fenilmetilsulfonyl fluoruro (PMSF, 10 mM), un inibitore di proteasi. Ai campioni viene aggiunto un buffer di lisi per estrarre e solubilizzare le proteine composto da: ditiotreitolo (DTT) un agente riducente; acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) un chelante; Triton X-100, una molecola detergente neutra che aiuta l'estrazione delle proteine di membrana. Si aggiungono biglie di vetro in quantità proporzionale alla concentrazione di biomassa nel pellet (DW). Per favorire la rottura delle cellule e la completa estrazione delle proteine, la soluzione viene miscelata al vortex alla massima velocità per 30 secondi per 10 volte. Una volta aggiunto il buffer PBS si centrifuga a 1500 rpm per un minuto. Si ottiene un pellet bianco ed un surnatante verde che rappresenta l'estratto cellulare. Questo viene, quindi, sottoposto a quantificazione delle proteine utilizzando il saggio BCA, descritto da Smith et al. (1985). A 50 μ L di surnatante si aggiunge 1 mL di reagente. La reazione che avviene è la seguente: proteine e peptidi riducono gli ioni rameici (Cu^{2+}) a rameosi (Cu^{+}) quando in ambiente basico; questi ultimi reagiscono con l'acido bicinconinico (BCA), formando un addotto di color porpora. Una volta aggiunto il reagente i campioni vengono mantenuti a 37°C per 30 minuti. Infine si misura l'assorbanza impostando lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 562 nm, alla quale l'addotto tra BCA e ioni rameosi ha il massimo di assorbimento. Dalla misura di assorbanza si risale alla concentrazione di proteine

usando la retta di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazione nota di albumina di siero bovina (BSA) (Figura 2.5):

$$BSA (\mu\text{g mL}^{-1}) = 1144,2 \cdot \text{abs} - 85,12 \quad R^2 = 0,998 \quad (\text{Eq. 2.15})$$

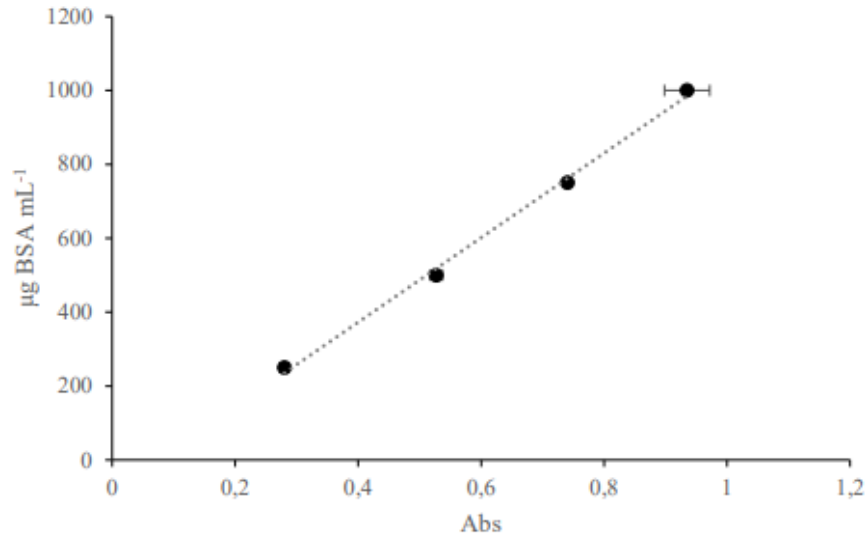


Figura 2.5 Retta di taratura per la quantificazione di proteine nel cianobatterio *T. tenuis*.

Per l'estrazione di proteine in alghe verdi 1 mL di campione viene centrifugato a 13.500 rpm per 10 minuti. Una volta rimosso il surnatante, il pellet di cellule rimanenti viene lasciato come tale o risospeso in 1 mL di buffer PBS e successivamente congelato a -80°C . Il campione a questo punto viene centrifugato e, rimosso il surnatante, risospeso in 1 mL di NaOH (1M). Seguono una fase di bollitura a 100°C per 30 minuti e una successiva di raffreddamento in ghiaccio. I campioni vengono centrifugati a 1,500 rpm per 1 minuto per far depositare il pellet. Il surnatante viene prelevato e quantificato allo stesso modo dei cianobatteri, usando il saggio BCA.

2.5.2 Carboidrati

Per la quantificazione di carboidrati liberi e in forma polimerica è stato usato il metodo dell'*antrone*, messo a punto da Dreywood (1946). Il reagente è costituito da antrone (2 gL^{-1}), acido solforico (H_2SO_4 , 71% v/v) e acqua deionizzata (29% v/v). L'acido solforico, ad alte temperature, idrolizza i polisaccaridi a monosaccaridi. Questi in seguito vanno incontro a deidratazione formando il 5-idrossimetil furfurale. Questa molecola reagisce con l'antranolo, la forma attiva

del reagente, dando vita ad un composto con un colore blu-verde, alla base del saggio colorimetrico, che ha un picco di assorbimento a 625 nm (Bailey, 1958).

L'analisi inizia prelevando 100 μL di campione e aggiungendovi 900 μL di reagente. La soluzione ottenuta viene mantenuta in un bagno termostato a 100°C per 10 minuti circa, in modo da attivare la reazione e formare il composto blu-verde. A questo punto i campioni vengono sottoposti ad una lettura spettrofotometrica a lunghezze d'onda di 625 nm. La concentrazione di carboidrati viene ottenuta attraverso la retta di taratura ottenuta con concentrazioni note di glucosio (Figura 2.6):

$$C_6H_{12}O_6(g\ L^{-1}) = 0,202 \cdot abs + 0,013 \quad R^2 = 0,997 \quad (\text{Eq. 2.16})$$

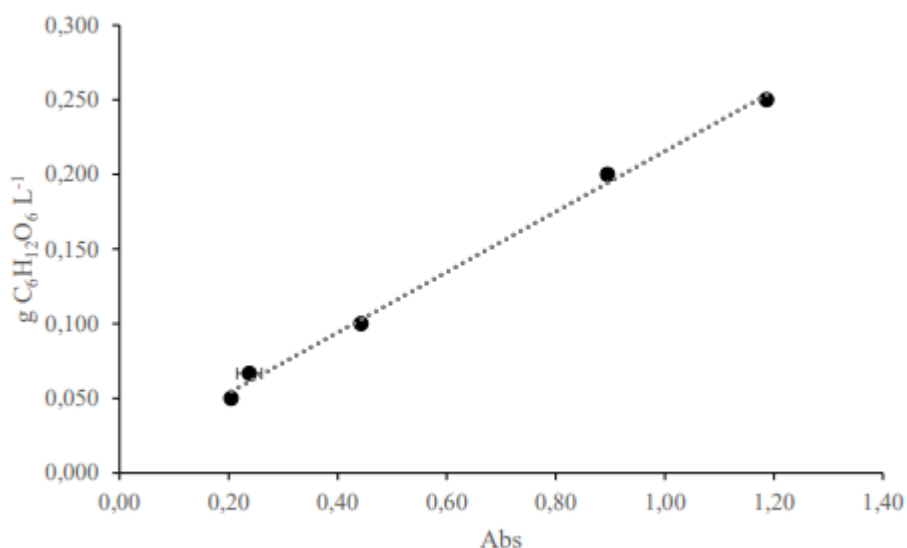


Figura 2.6 Retta di taratura per la quantificazione di carboidrati.

2.5.3 Esopolisaccaridi

Per la quantificazione degli esopolisaccaridi (EPS) è stato seguito il protocollo messo a punto da Dubois et al. (Dubois et al., 1951). Il reagente in questa reazione è composto da fenolo (5% v/v) e acido solforico – H_2SO_4 (95-98%). L'acido solforico ad alte temperature idrolizza i polisaccaridi formando monosaccaridi che, in seguito a deidratazione, forma il 5-idrossimetil furfurale. Questo intermedio reagisce con il fenolo formando un composto che assorbe a lunghezza d'onda di

488 nm.

Dopo aver prelevato 2 mL di campione, questi vengono centrifugati a 1.800 rpm per 25 minuti. Si ripongono 200 μ L del surnatante in una eppendorf e si aggiunge il reagente (200 μ L di fenolo e 1 mL di acido solforico). A questo punto si lascia a reagire per 10 minuti a temperatura ambiente e, dopo aver mescolato, si lascia in incubatore a 30°C per 15 minuti. La reazione crea una soluzione con un colore giallo-verde che viene letta allo spettrofotometro a 488 nm. Si risale alla concentrazione di EPS usando la retta di taratura ottenuta con concentrazioni note di glucosio (Figura 2.7):

$$C_6H_{12}O_6(g L^{-1}) = 125,87 \cdot abs + 9,9662 \quad R^2 = 0,9886 \quad (\text{Eq. 2.17})$$

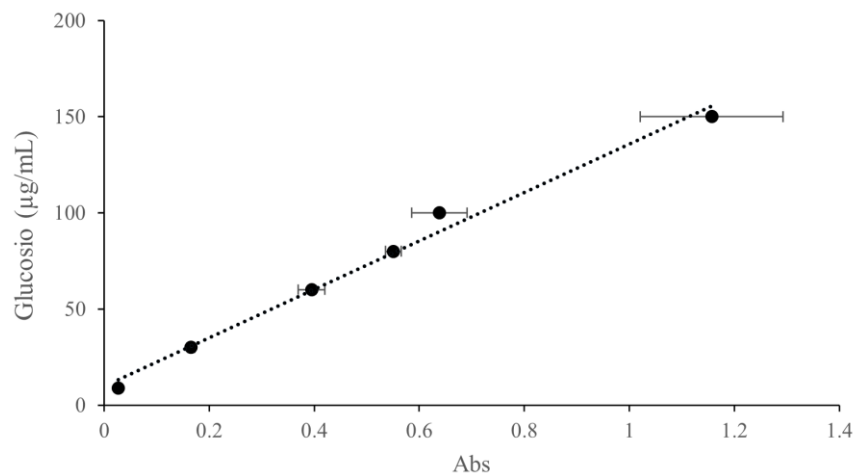


Figura 2.7 Retta di taratura per la quantificazione di esopolisaccaridi.

2.5.4 Clorofilla e Carotenoidi

Per l'estrazione di clorofilla a e carotenoidi dalla biomassa si usa il metodo sviluppato da Moran e colleghi (Moran et al., 1980). In questo protocollo si sfrutta l'*N*-Ndimetil-formammide (DMF), solvente che, lisando la parete e la membrana cellulare, solubilizza e stabilizza i pigmenti estratti. Si preleva 1 mL di campione e si centrifuga per 10 minuti a 13.500 rpm. Dopo aver rimosso il surnatante si risospinde il pellet in 1 mL di DMF sotto cappa chimica. La reazione di estrazione è molto veloce per cui bisogna operare in assenza di fonti luminose, per evitare la degradazione dei pigmenti fotosensibili. I campioni vengono quindi congelati al

buio a -18°C per almeno 24 ore. L'analisi viene effettuata, dopo aver scongelato i campioni e averli centrifugati per 10 minuti a 13.500 rpm. Vengono acquisiti gli spettri di assorbimento nel range 350-750 nm con uno spettrofotometro a doppio raggio (Shimadzu UV-1900) e cuvette in quarzo.

Per la quantificazione dei pigmenti si sfruttano le seguenti equazioni (Wellburn, 1994):

$$Chl - a (\mu g mL^{-1}) = (Abs_{664} - Abs_{750}) \cdot d \cdot \varepsilon_{chl-a} \cdot \left(\frac{V_{DMF}}{V_S}\right) \quad (\text{Eq. 2.18})$$

$$Car (\mu g mL^{-1}) = [(Abs_{461} - Abs_{750}) - (Abs_{664} - Abs_{750}) \cdot 0,04] \cdot \varepsilon_{car} \cdot \left(\frac{V_{DMF}}{V_S}\right)$$

(Eq. 2.19)

dove d rappresenta il fattore di diluizione e ε_{chl-a} e ε_{car} rappresentano i coefficienti di assorbimento dei due pigmenti e valgono, rispettivamente, 11,92 e 4. Come è possibile notare i valori di assorbanza letti vengono normalizzati a 750 nm per evitare interferenze dovute, ad esempio, a residui derivanti dall'estrazione.

2.5.5 Ficobiliproteine

Le ficobiliproteine vengono estratte tramite un metodo fisico che consiste nell'esercitare sulle cellule uno shock termico (Kannaujiya et al., 2017). Per l'estrazione, 5 mL di campione vengono centrifugati a 7,500 rpm per 8 minuti. Una volta rimosso il surnatante, il pellet di cellule viene risospeso in 1 mL di acqua deionizzata, in cui le ficobiliproteine sono solubili. I campioni vengono quindi congelati a -18°C per almeno 24 ore. Si eseguono tre cicli di congelamento e scongelamento al buio per rompere le pareti cellulari causando uno shock termico. Al terzo scongelamento i campioni vengono centrifugati a 5.000 rpm per 5 minuti. A questo punto il surnatante risulta di colore verde-blu o rosato, a seconda che vengano estratti ficocianina o ficoeritrina (Figura 2.8).



Figura 2.8 Estrazione delle ficobiliproteine dopo lo shock termico. Nell'immagine sono presenti campioni contenenti ficocianina (sx) e ficoeritrina (dx).

L'analisi viene fatta allo spettrofotometro acquisendo lo spettro di assorbimento nel range 350-750 nm. Per calcolare la concentrazione di PC, APC e PE si usano le seguenti equazioni (Bennett et al., 1973):

$$PC (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{(Abs_{615} - Abs_{750}) - 0,474 (Abs_{652} - Abs_{750})}{5,34} \quad (\text{Eq. 2.20})$$

$$APC (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{(Abs_{652} - Abs_{750}) - 0,208 (Abs_{615} - Abs_{750})}{5,09} \quad (\text{Eq. 2.21})$$

$$PE (\mu\text{g mL}^{-1}) = \frac{(Abs_{562} - Abs_{750}) - \varepsilon_{PC,562nm}(PC) - \varepsilon_{APC,562nm}(APC)}{\varepsilon_{PE,562nm}} \quad (\text{Eq. 2.22})$$

dove $\varepsilon_{PC,562nm}$, $\varepsilon_{APC,562nm}$ e $\varepsilon_{PE,562nm}$ rappresentano i coefficienti di estinzione ($\text{mL mg}^{-1} \text{cm}^{-1}$) alla lunghezza d'onda di 562 nm della PC (2,41), APC (0,849) e PE (9,62), rispettivamente.

2.6 Esperimenti di Biostimolazione

Nell'ottica di sfruttarla in un contesto di "biorefinery", la biomassa del consorzio in uscita dai fotobioreattori in continuo, previo trattamento per l'estrazione delle ficobiliproteine (§2.5.5), è stata testata per l'attività biostimolante in semi di cetriolo (*Cucumis sativus*). Gli esperimenti sono stati condotti usando differenti

concentrazioni di biomassa (Test 1-3) e un controllo negativo (Ctrl -), rappresentato da acqua deionizzata. Sono state eseguite sei repliche per ogni condizione. Nella tabella sottostante sono schematizzate le condizioni testate (Tabella 2.2).

Tabella 2.2 Riassunto delle condizioni testate per la biostimolazione.

Condizione	g L ⁻¹
Ctrl [-] (H ₂ O)	/
Test 1	0,5
Test 2	0,8
Test 3	1,5

2.6.1 Prove di Germinazione

Per potere proseguire negli esperimenti di biostimolazione è stato necessario svolgere dei test preliminari di fitotossicità. I semi sono stati fatti germinare usando biomassa algale a concentrazione nota di biomassa e un controllo negativo con acqua deionizzata. Ogni condizione è stata replicata dieci volte. In particolare, i semi sono stati sterilizzati immergendoli in una soluzione diluita di ipoclorito di sodio (0,1%) per 15 minuti. Successivamente sono stati trasferiti in acqua deionizzata per 10 minuti. Dopo tre lavaggi i semi sono stati disposti in piastre Petri, su carta filtro imbibita con 10 mL di acqua deionizzata e della soluzione da testare e fatti germinare in incubatore termostato a 26°C, per 5 giorni al buio (Figura 2.9).



Figura 2.9 Fase di germinazione dei semi di *C. sativus*.

Dopo 5 giorni i semi germinati sono stati contati e confrontati per le due condizioni.

2.6.2 Attività auxino-simile

L'attività auxino-simile è stata testata usando il protocollo descritto da Stirk e colleghi (Stirk et al., 2002). Dopo la sterilizzazione (§2.6.1) i semi sono stati disposti in piastre Petri, su carta filtro imbibita di acqua deionizzata e fatti germinare in incubatore termostato a 26°C, per 5 giorni al buio. Dopo 5 giorni i cotiledoni sono stati separati dai germogli all'altezza dell'ipocotile e immersi in acqua deionizzata per evitare la loro disidratazione. Sono state preparate piastre Petri con carta filtro imbibita con 5 mL della soluzione da testare. Una volta separati, sono stati disposti 10 cotiledoni per piastra. Questi sono stati posti in incubatore termostato a 26°C per 5 giorni al buio. Infine, il numero di nuove radici è stato contato.

2.7 Analisi Statistica

I risultati sperimentali sono stati sottoposti ad analisi statistica per valutare la significatività delle differenze ottenute. A tal scopo è stato svolto il test Anova-one way con un livello di confidenza del 95%. In particolare, tale analisi è stata condotta sulla concentrazione cellulare, sul contenuto di pigmenti, sull'efficienza fotosintetica e sulla produttività. Per quanto riguarda le misure analitiche, l'analisi ha riguardato la produzione di pigmenti e ficobiliproteine tra le diverse condizioni testate in continuo. Lo stesso test è stato iterato per valutare la significatività negli esperimenti di attività auxino-simile. Infine, ai fini di esposizione grafica, è stato effettuato il *grouping* applicando il test di Tukey, con un livello di confidenza del 95%.

CAPITOLO 3 – Esperimenti in batch e in continuo

3.1 Esperimenti preliminari in batch con *T. tenuis*

In una fase preliminare sono stati svolti degli esperimenti in batch con il cianobatterio *T. tenuis* con lo scopo di ottenere informazioni sulla sua crescita quando viene coltivato a diverse lunghezze d'onda. La crescita è stata pertanto monitorata misurando la concentrazione di biomassa nel tempo e si è ricavato il tasso di crescita. Sono stati usati tre LED differenti: bianco (“*White Light*”, WL), arancione ($\lambda_{MAX} = 618 \text{ nm}$) (“*Orange Light*”, OL) e rosso ($\lambda_{MAX} = 665 \text{ nm}$) (“*Red Light*”, RL). L' intensità luminosa incidente è di $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Dalla concentrazione di ficobiliproteine (PBPs) è stata studiata la composizione nei ficobilisomi (PBSs) in modo da avere dei dati preliminari sul CCA di tipo 3 in questa specie. Le cinetiche di crescita e i relativi parametri sono stati ricavati attraverso esperimenti respirometrici variando l'intensità di luce incidente.

3.1.1 Effetto della lunghezza d'onda sulla crescita di *T. tenuis*

Nella figura 3.1 è rappresentato il confronto tra curve di crescita di *T. tenuis* nel tempo nelle tre condizioni di luce differenti (Figura 3.1).

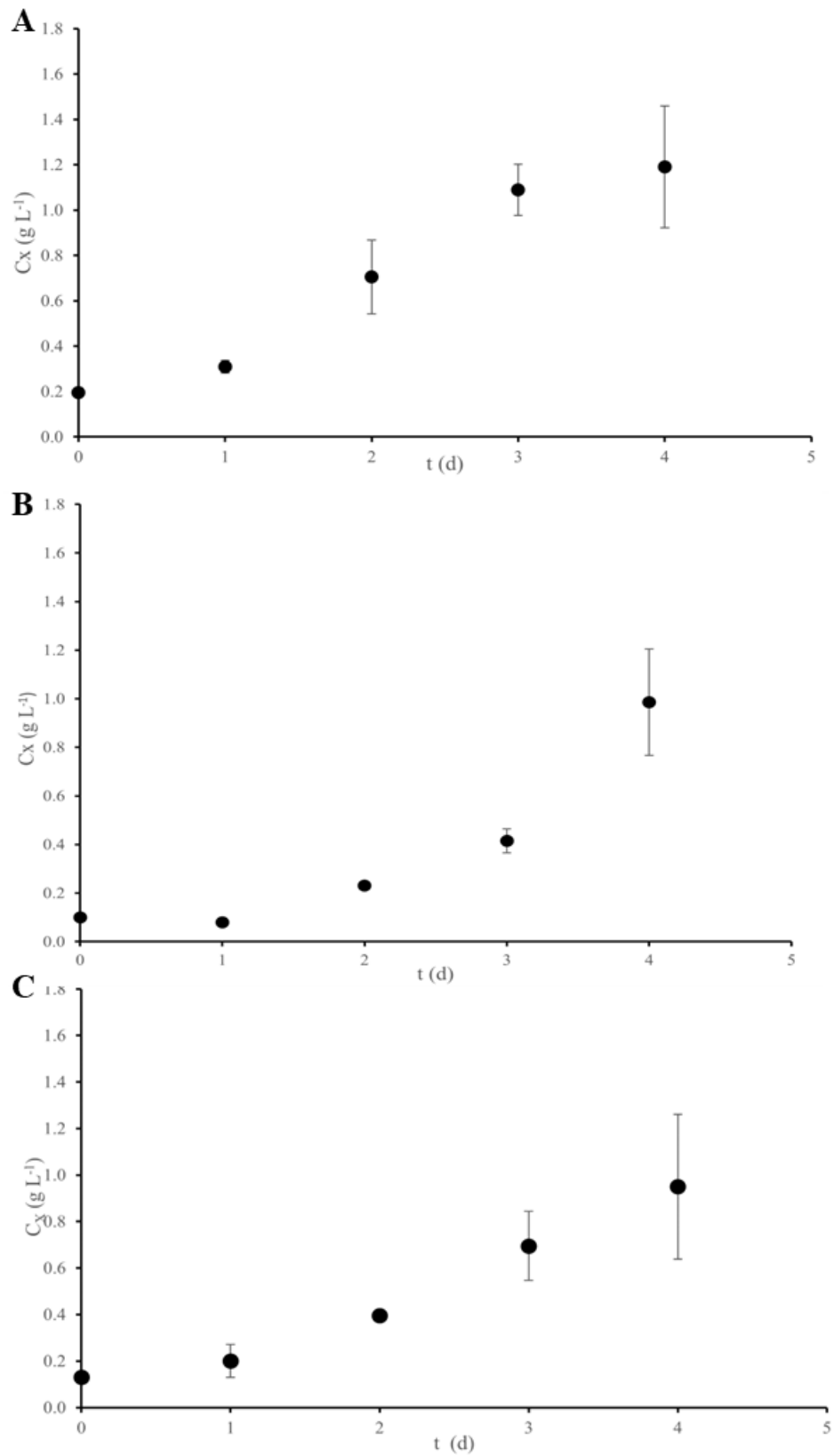


Figura 3.1 Concentrazione di biomassa C_x (g L^{-1}) in funzione del tempo t (d) di *T. tenuis* con LED bianco (A), arancione (B) e rosso (C)

Nella tabella 3.1 sono, invece, riportati i valori di velocità massima di crescita (μ_{MAX} , d^{-1}) per le stesse condizioni.

Tabella 3.1 Valori di velocità massima di crescita calcolati nelle diverse condizioni.

LED	μ_{MAX} (d^{-1})
WL	$0,63 \pm 0,09$
OL	$0,47 \pm 0,03$
RL	$0,65 \pm 0,05$

Ad una intensità di luce di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ la velocità massima di crescita del cianobatterio *T. tenuis* risulta maggiore in RL ($\mu_{MAX} = 0,65 \pm 0,05 d^{-1}$), mentre per OL e WL i valori calcolati sono rispettivamente $0,47 \pm 0,03 d^{-1}$ e $0,63 \pm 0,09 d^{-1}$. Nelle condizioni RL e WL non si nota una significativa differenza. Nonostante non siano presenti in letteratura esperimenti svolti con LED monocromatici per questo cianobatterio, in precedenza Patricia Gisela Silva et al. (2013) hanno testato con risultati simili la crescita di questo cianobatterio in luce bianca. Nessuna differenza è visibile in fase lag, poiché questa termina, in tutti i casi esaminati, dopo 1 giorno di coltivazione. Negli esperimenti di crescita non è stato tenuto conto della fase stazionaria di crescita ($t = 6$ e 7 d), data la grande variabilità nelle misure, causata da evidenti fenomeni di aggregazione. La migliore crescita in WL e RL è probabilmente da attribuire, nel primo caso, alla presenza di un ampio range di lunghezze d'onda, nel secondo caso alla maggior presenza di frequenze che stimolano la fotosintesi, come visto in altri studi (Masojídek et al., 2013; Satthong et al., 2019). Spiegare la crescita in OL, invece, non è semplice, data l'assenza di dati in letteratura sulla specie e sulla condizione in esame. Si può, però, supporre che la risposta a OL sia specie-specifica. Infatti, in diversi studi *Arthrospira platensis* è cresciuta in maniera più performante in OL (Chini Zittelli et al., 2022; Milia et al., 2022).

3.1.2 Concentrazione di ficobiliproteine e studio del CCA di tipo 3 in *T. tenuis*

In figura 3.2 è illustrata la concentrazione (mg mL^{-1}) di ficocianina (PC), ficoeritrina (PE) e alloficocianina (APC) registrata in funzione del tempo nelle tre condizioni di luce testate (Figura 3.2).

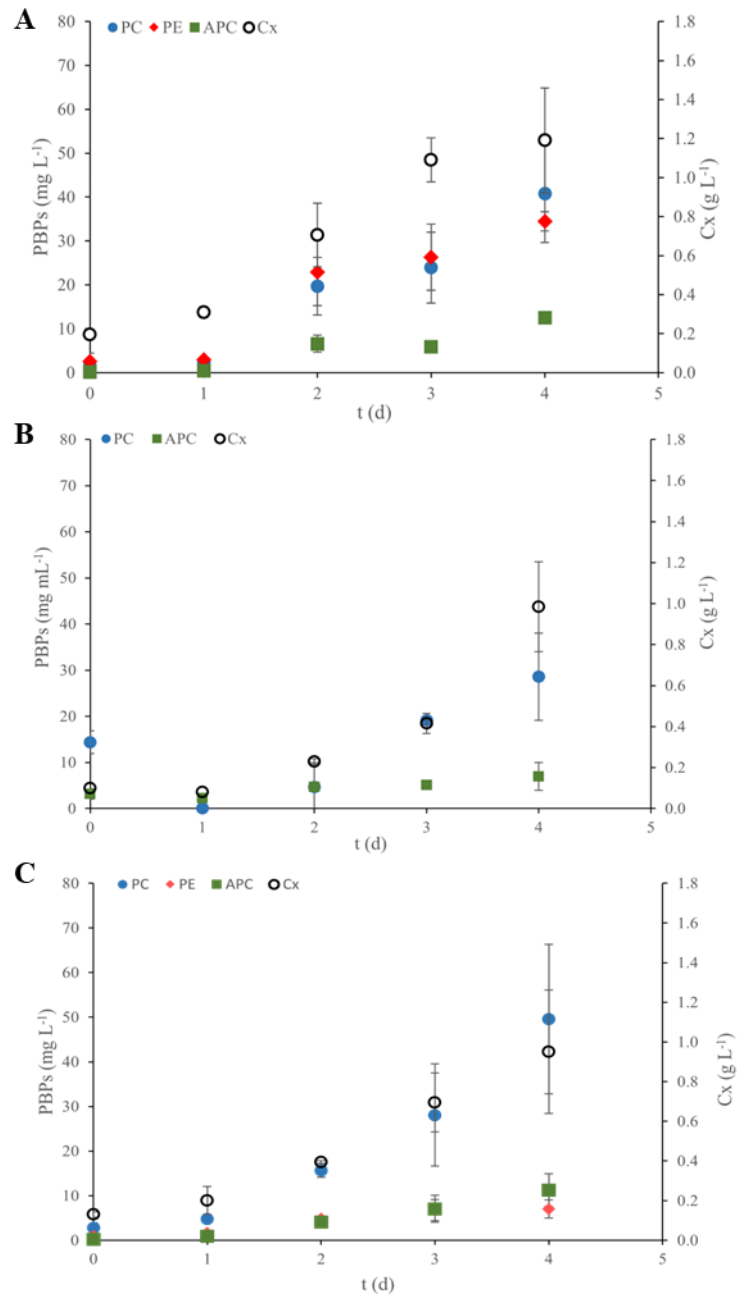


Figura 3.2 Concentrazione di PBP (mg mL^{-1}) in WL (A), OL (B) e RL (C). I cerchi vuoti rappresentano la concentrazione di biomassa nel tempo nella relativa condizione.

In tutte le condizioni testate si ha un incremento della concentrazione di PBPs nel tempo, con una fase esponenziale che va da $t=2$ d a $t=4$ d e una fase lag nei primi due giorni ($t=0$ d e 1 d), similmente a quanto ottenuto nelle curve di crescita (Figura 3.1). Guardando, invece, la composizione dei PBPs si osserva che quando irradiato da luce bianca e rossa il cianobatterio sfrutta il meccanismo di adattamento cromatico complementare (CCA di tipo 3). Lo spettro della lampada LED bianca (si veda Figura 2.2, d) copre un ampio range del PAR, con un'alta rappresentazione (55% del totale) di fotoni a lunghezze d'onda comprese tra 550 e 650 nm. Queste sono quelle che, nel meccanismo di CCA di tipo 3, innescano l'espressione di ficoeritrina (Sanfilippo et al., 2019). In RL l'espressione di PE è minore rispetto a WL, nonostante lo spettro di emissione del LED in questione escluda quasi totalmente lo spettro di assorbimento del pigmento. La sua espressione, tuttavia, potrebbe derivare dalla bassa energia dei fotoni in RL, condizione percepita come di foto-limitazione. Una simile risposta è stata descritta anche altrove in letteratura (Latsos et al., 2021; Xie et al., 2021). Usando OL, invece, non viene rilevata la presenza di questo pigmento, in favore della sola PC. Nonostante i fotoni in questa condizione siano poco energetici e il cianobatterio sperimenti una condizione di foto-limitazione come in RL, il risultato ottenuto sembra suggerire che possa esservi un'aumentata espressione di PC. Infatti, lo spettro della lampada OL e lo spettro di assorbimento della PC si sovrappongono perfettamente. Seppur in letteratura siano assenti informazioni su specie capaci di fare il CCA di tipo 3 coltivati in OL, in alcuni studi, l'esposizione del cianobatterio *A. platensis* a luce arancione ha comportato una maggiore espressione della PC rispetto ai controlli (Chini Zittelli et al., 2022; Milia et al., 2022).

3.1.3 Effetto della lunghezza d'onda sulla cinetica di crescita di *T. tenuis*

Per ottenere i parametri relativi alla cinetica di crescita a diversa lunghezza d'onda sono stati eseguiti dei test respirometrici variando per ogni esperimento l'intensità luminosa (si veda par. 2.3.1.1). Nella figura 3.3 sono riportati gli andamenti che descrivono la velocità di produzione di ossigeno (OPR, d^{-1}) in funzione dell'intensità luminosa. Questa può essere correlata alla crescita della biomassa tramite un termine di resa di biomassa su ossigeno. Il fine è quello di descrivere

quantitativamente la crescita di biomassa irradiata con diversi spettri di luce, verificando quale sia l'intensità di luce ottimale.

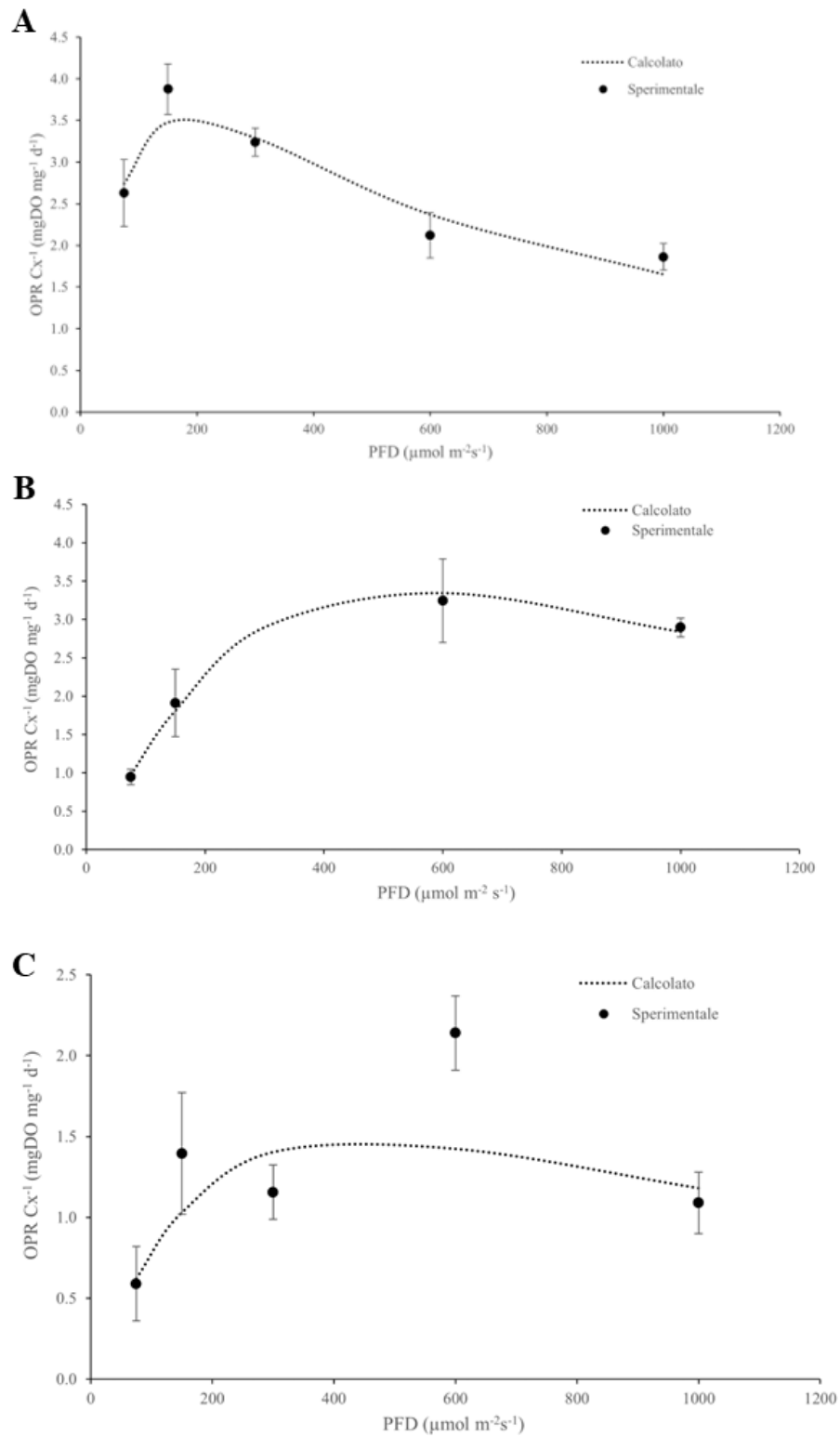


Figura 3.3 Cinetiche di crescita di *T. tenuis* ottenute mediante analisi respirometrica con LED bianco (A) arancione (B) e rosso (C).

Nella tabella 3.2 sono elencati i parametri dei modelli cinetici derivati dagli esperimenti di respirometria.

Tabella 3.2 Parametri cinetici derivati dagli esperimenti di respirometria.

Luce LED	K_I ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	I_{OPT} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
WL	60,18	187,00
OL	247,39	536,38
RL	147,92	435,03

Le curve ottenute sono approssimabili ad un modello di crescita con inibizione data da alte concentrazioni di un nutriente, descritto dal modello cinetico di Haldane (Eq. 2.2). Esse, infatti, riflettono il tipico comportamento degli organismi fotosintetici in risposta all'incremento dell'intensità luminosa, mostrando a valori di intensità elevata ($600 - 1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) un decremento del tasso di crescita. Tale risultato è dovuto ai fenomeni di foto-inibizione che si innescano e influenzano negativamente l'attività fotosintetica del cianobatterio (Vonshak et al., 2004). Dai parametri cinetici derivati attraverso gli esperimenti di respirometria si possono fare alcune considerazioni. In OL, ad esempio, *T. tenuis* aveva la più bassa velocità di crescita nella fase sperimentale. Tale risultato può essere dovuto alla alta I_{OPT} di crescita ($536 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), più elevata rispetto a quella usata negli esperimenti precedenti. Anche in RL l'intensità ottimale è alta ($435,03 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), ma la K_I è paragonabile all'intensità di luce usata negli esperimenti batch, dove il cianobatterio aveva la maggiore velocità di crescita. I parametri in WL sono anch'essi concordi con quanto ottenuto in precedenza e con quanto atteso: infatti, l'intensità ottimale di crescita ($187 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) è vicina a quella usata in batch, dove la velocità di crescita era alta. In un altro lavoro su *T. tenuis* l' I_{OPT} calcolata in luce bianca era pari a $107 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Ukai et al., 1958). Questi risultati suggeriscono, dunque, che in WL il cianobatterio cresca bene in condizioni di poca luce, presumibilmente a causa della presenza di lunghezze d'onda molto energetiche che causano un rallentamento della fotosintesi ad alte intensità. In RL e OL sono presenti fotoni meno energetici, per cui le intensità ottimali di crescita sono spostate a valori molto maggiori.

3.1.4 Considerazioni sulla caratterizzazione della crescita di *T. tenuis*

T. tenuis PCC 7101 è un cianobatterio filamentoso di interesse industriale e biotecnologico. Studiato da più di 60 anni per la capacità di adattare la propria crescita a condizioni di scarsa illuminazione o di competizione nel fitoplankton, nelle ultime decadi è stato coltivato in sistemi aperti e chiusi a differenti scopi. Sintetizza una buona quantità di EPS (fino a 7,4 mg L⁻¹) i quali sono stati utilizzati in diversi casi per migliorare le proprietà del suolo e la crescita di piante di mais (De Caire et al., 2000; de Cano et al., 2002; Nicolaus et al., 1999). Estratti cellulari di questo microorganismo sono stati sfruttati come biofertilizzanti per migliorare la produttività del riso (Storni de Cano et al., 2003). Si presenta, inoltre, come un buon candidato per la bioremediation e per il WWT. Ci sono, infatti, evidenze sulla sua capacità di crescere in assenza o scarsità di nutrienti, ad esempio di fosfato inorganico, o in reflui industriali (J. I. N. Kumar et al., 2008). Inoltre tollera bene la presenza di metalli pesanti (Cd, Ni e Hg), con alti tassi di rimozione (fino al 90%) (Inthorn et al., 1996; Nagase et al., 1997; Storni et al., 2007). Presenta anche un'ottima capacità di auto-flocculazione, fenomeno che permette di risparmiare tempo e costi del processo di *harvesting* nei sistemi aperti e chiusi (P G Silva et al., 2007). Nonostante queste qualità, in letteratura non sono presenti esempi dello sfruttamento del meccanismo di CCA di tipo 3 a scopi industriali, al fine di costruire processi più produttivi e con costi ridotti. A tal proposito, negli esperimenti in batch eseguiti è stato visto che *T. tenuis* è capace di crescere agevolmente in PBRs illuminati con luce LED. Inoltre, è stata osservata una peculiare capacità di adattarsi alle condizioni di foto-limitazione attraverso il meccanismo di CCA di tipo 3.

3.2 Esperimenti in continuo

Dopo aver studiato in via preliminare la crescita di *T. tenuis* in batch, sono stati eseguiti degli esperimenti in PBRs in continuo (si veda par. 2.3.2). Al fine di valutare la possibilità di sfruttare il meccanismo del CCA di tipo 3 per aumentare l'efficienza di conversione energetica in PBRs illuminati con LED, il cianobatterio e la microalga verde *S. obliquus* sono stati coltivati in consorzio e in monocultura come condizioni di controllo. Per ogni condizione sono stati misurati la concentrazione (C_X) e la produttività di biomassa ($P_{X,V}$) e l'efficienza fotosintetica (η_{BI}) a stato stazionario. Variando dapprima l'intensità luminosa (PFD), è stato anche studiato l'effetto dello spettro luminoso usando diverse lampade LED e mantenendo l'intensità costante. Infine è stato misurato l'effetto del tempo di permanenza sulle stesse variabili. Per meglio comprendere i dati di crescita ottenuti, nei prossimi paragrafi questi saranno discussi in relazione al fenomeno di adattamento cromatico in *T. tenuis* e nel consorzio. Nello specifico verrà introdotto il rapporto tra la ficoeritrina (PE) e la ficocianina (PC) prodotte dalla biomassa (PE:PC). Questo valore, infatti, consente di valutare la composizione dei PBSs in diverse condizioni di luce e, quindi, di ottenere informazioni sull'adattamento cromatico. Per una trattazione più estesa sulla ficobiliproteine e sui pigmenti, si rimanda ai paragrafi 3.2.2.3 e 3.2.2.4.

3.2.1 Effetto dell'intensità luminosa

Per monitorare l'effetto dell'intensità luminosa il consorzio microalgale e i rispettivi controlli sono stati coltivati in continuo a $\tau=0,85$ d, a cui è stato già misurato il massimo di produttività per *S. obliquus* (Borella et al., 2021), sfruttando il LED bianco a due intensità luminose per ricreare due condizioni di illuminazione: una limitante a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e una a saturazione a $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

3.2.1.1 Concentrazione e produttività volumetrica di biomassa

Nella figura 3.4 è riportata la concentrazione di biomassa (g L^{-1}) a stato stazionario nel consorzio e nei rispettivi controlli.

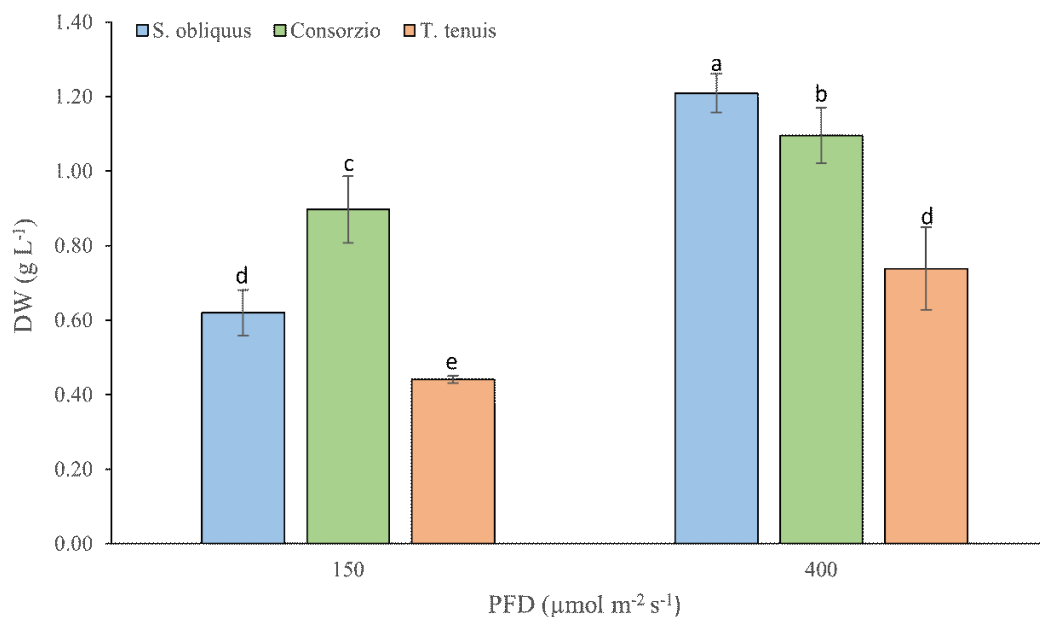


Figura 3.4 Concentrazione di biomassa (g L⁻¹) nel consorzio e nei controlli a 150 e 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. *le lettere condivise indicano l'assenza di una differenza significativa, ($p < 0,05$).

In generale, aumentando l'intensità di luce incidente si assiste ad un incremento della concentrazione di biomassa, in accordo con quanto osservato precedentemente. La concentrazione di *S. obliquus* aumenta di quasi il doppio tra la condizione a bassa intensità ($0,62 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}$) e quella ad alta intensità ($1,21 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$). Quella di *T. tenuis* va da $0,44 \pm 0,01$ a $0,74 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$ ad alta intensità, mentre per il consorzio si misura un incremento minore, da $0,90 \pm 0,09$ a $1,10 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$. Questo andamento è tipicamente osservato quando si passa da condizioni di luce bassa a intensità più elevate e non inibenti (Vonshak et al., 2004), dato dal maggior numero di fotoni incidenti a cui è esposta la biomassa ad alte intensità luminose. Ciò ha come effetto la stimolazione dell'attività fotosintetica e, fintanto che non intervengono fenomeni di foto-saturazione e foto-inibizione, l'aumento della densità cellulare. Tuttavia, la risposta al variare dell'intensità è diversa per le due specie in esame. In *S. obliquus*, infatti, l'incremento in concentrazione misurato è più elevato, come precedentemente osservato da Sforza et al. (2014) con *S. obliquus* in PBRs in continuo andando da 150 a 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Altri autori hanno osservato che nelle microalghe appartenenti al genere *Scenedesmus* spp. gli effetti dell'eccesso di luce bianca sull'attività dei PSI e II si osservano a PFD superiori a 540 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (S. P. Singh et al., 2015). In *T. tenuis* l'incremento in

concentrazione è del 68% nel passaggio da bassa ad alta intensità, suggerendo che in questa specie la risposta di foto-saturazione in luce bianca si inneschi a PFD più bassi. Negli esperimenti preliminari in batch, infatti, era stato osservato che in luce bianca, la I_{OPT} di crescita è pari a $187 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (si veda par. 3.1.3, tabella 3.2), più vicina alla condizione a bassa intensità. Anche le prestazioni del consorzio in alta luce, infatti, non sono migliorative rispetto alla monocultura di *S. obliquus*.

Dalle misure di concentrazione ottenute alle due intensità luminose è stata, inoltre, calcolata la produttività volumetrica ($P_{X,V}$) dato un tempo di permanenza $\tau=0,85$ d. Il trend di produttività alle due intensità riflette l'andamento della concentrazione di biomassa, considerata la dipendenza dalla concentrazione di biomassa (Eq 2.9) e a parità di tempo di permanenza. Per *S. obliquus* a bassa intensità la produttività è di $0,73 \pm 0,06 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$, ad alta intensità il doppio $1,42 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$. Un simile incremento è stato ottenuto in un lavoro di Sforza et al. (2014) con *S. obliquus*, in cui la produttività aumenta andando da 150 a $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. In *T. tenuis* la produttività va da $0,52 \pm 0,01$ a $0,87 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ ad alte intensità e per il consorzio da $1,00 \pm 0,04$ a $1,29 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$.

Per poter analizzare e discutere i risultati ottenuti per la co-coltura è necessario comprendere che tipologie di relazioni si possono avere tra due specie quando queste si trovano in co-coltura. Nelle relazioni competitive, generalmente, una specie prevale sull'altra, destabilizzandola; in questi casi è comune assistere ad un decremento della produttività. Se non vi è una netta prevalenza dell'una o dell'altra specie e se queste si supportano a vicenda in maniera sinergica nella crescita, si assiste ad un aumento della produttività, tipico dei casi di relazione cooperativa (Rashid et al., 2019). Nel consorzio tra le due specie l'incremento di concentrazione è del 34% nel passaggio da bassa ad alta intensità luminosa. Tuttavia, in condizioni limitanti la concentrazione di biomassa è significativamente più alta rispetto ai controlli ($0,90 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$). Questo risultato ci suggerisce in una prima analisi che le due specie coesistono aumentando la concentrazione totale. Osservazioni al microscopio ottico hanno confermato la presenza di entrambe le specie. La presenza di *T. tenuis* è stata ulteriormente validata grazie alla rilevazione, tramite analisi spettrofotometriche, delle PBPs, esclusive del cianobatterio. Tale coesistenza potrebbe essere il frutto di una sinergia o di un rapporto mutualistico tra le due

specie. L'ipotesi in questo caso è che il cianobatterio sfrutti l'adattamento cromatico e la maggiore espressione di PE per superare la competizione. Per testare questa ipotesi è stato, pertanto, calcolato e confrontato il rapporto PE:PC risultante nel consorzio e nel controllo a bassa intensità luminosa. Nel primo caso il rapporto vale $1,73(\pm 0,31)$ mentre nella monocultura è $1,33(\pm 0,75)$. L'espressione della PE in entrambi i casi è compatibile con lo spettro della lampada bianca usata, come spiegato nel paragrafo 3.2. L'aumentato rapporto PE:PC dalla monocultura al consorzio, ci suggerisce che il cianobatterio sia capace di instaurare una coesistenza con un'altra specie sfruttando il meccanismo di CCA di tipo 3, arricchendo di PE i propri PBSs. Tuttavia, non è ancora chiaro se il rapporto sia ascrivibile a sinergia o se si tratti di una coesistenza neutrale.

3.2.1.2 Efficienza fotosintetica

Grazie all'acquisizione di misure di "Back Irradiance" (BI) è stata calcolata la luce assorbita nello spessore del PBR e successivamente è stata ricavata l'efficienza fotosintetica sul PFD assorbito (η_{BI}) (Eq. 2.11) (Figura 3.5).

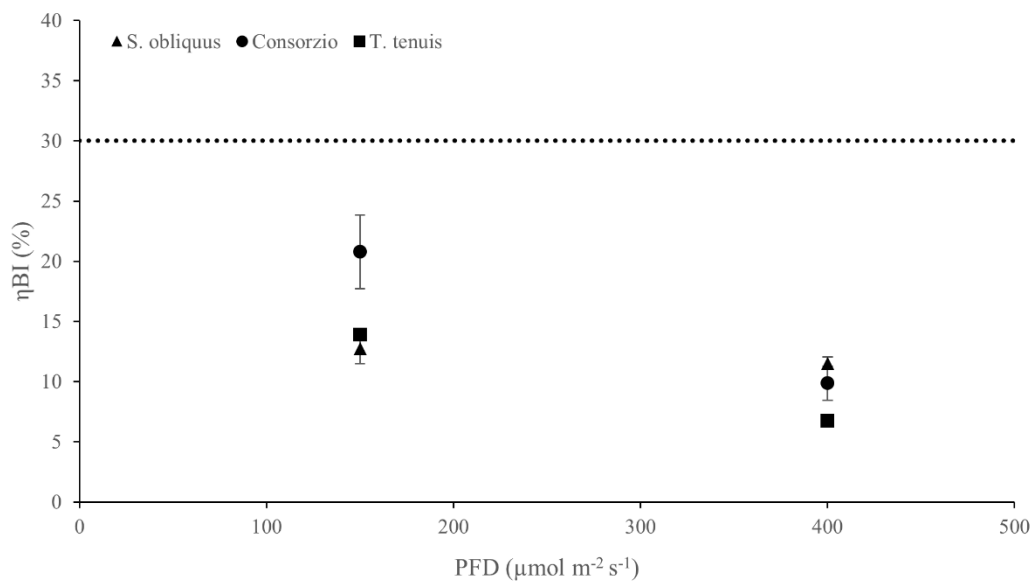


Figura 3.5 Efficienza fotosintetica (%) calcolata per il consorzio ed i controlli a $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La linea tratteggiata rappresenta il massimo teorico di efficienza fotosintetica (30% del PAR in luce rossa).

Come noto dalla letteratura, tipicamente l'efficienza fotosintetica decresce all'aumentare dell'intensità della luce incidente (Tredici, 2010). Nonostante il trend in discesa, l'efficienza fotosintetica calcolata in *S. obliquus* non è

significativamente differente ad alta e bassa intensità, rispettivamente $11,52 \pm 0,49$ % e $12,74 \pm 2,41$ %. Questi risultati ottenuti per la microalga verde seguono quanto suggerito nei precedenti paragrafi, e cioè che non esistono particolari effetti di fotosaturazione e foto-inibizione che limitano l'attività fotosintetica nelle condizioni testate per questa specie. *S. obliquus*, infatti, mostra migliori performance di crescita a luci generalmente più alte, con un massimo di efficienza tra 200 e 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Borella et al., 2021). Per il cianobatterio, invece, si assiste ad un dimezzamento dell'efficienza di conversione dell'energia quando coltivato in condizioni di saturazione (da $13,89 \pm 0,10$ % a $6,73 \pm 0,10$ %), in accordo con quanto evidenziato dagli esperimenti respirometrici. In ogni caso, anche ad alta luce è stato possibile raggiungere uno stato stazionario stabile nel tempo, che suggerisce una buona capacità di acclimatazione della specie.

Un ulteriore dato interessante è stato ottenuto nella co-coltura tra le due specie algali dove a 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ si è raggiunta un'efficienza fotosintetica di $20,78 \pm 3,08$ %. Questo valore di efficienza si avvicina al massimo teorico raggiungibile, che nei PBRs illuminati artificialmente corrisponde al 30% del PAR in luce rossa (Nwoba et al., 2019). Per spiegare un valore di efficienza così alto si può ipotizzare che il cianobatterio sfrutti l'adattamento cromatico come strategia per superare la foto-competizione. Analizzando, infatti, lo spettro di assorbimento delle ficobiline estratte in questa condizione (Figura 3.6) si nota il picco caratteristico della PE prevalere su quelli della PC e dell'APC, in accordo con quanto visto in batch e con quanto riportato in letteratura sull'adattamento cromatico in questa specie (Sanfilippo et al., 2019; Stomp et al., 2008). Il valore di efficienza dimezza a 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($9,87 \pm 0,38$ %) nel consorzio. Infatti, oltre a quello di foto-inibizione, bisogna considerare anche un altro fenomeno che in generale causa un decremento dell'efficienza in funzione del PFD. A basse intensità luminose, infatti, si ha una minor concentrazione di biomassa ed un diminuito *self-shading*, fenomeno per cui, ad alta densità, le cellule nella parte anteriore dello spessore del liquido operativo ostacolano il passaggio di luce alle zone posteriori (Tredici, 2010).

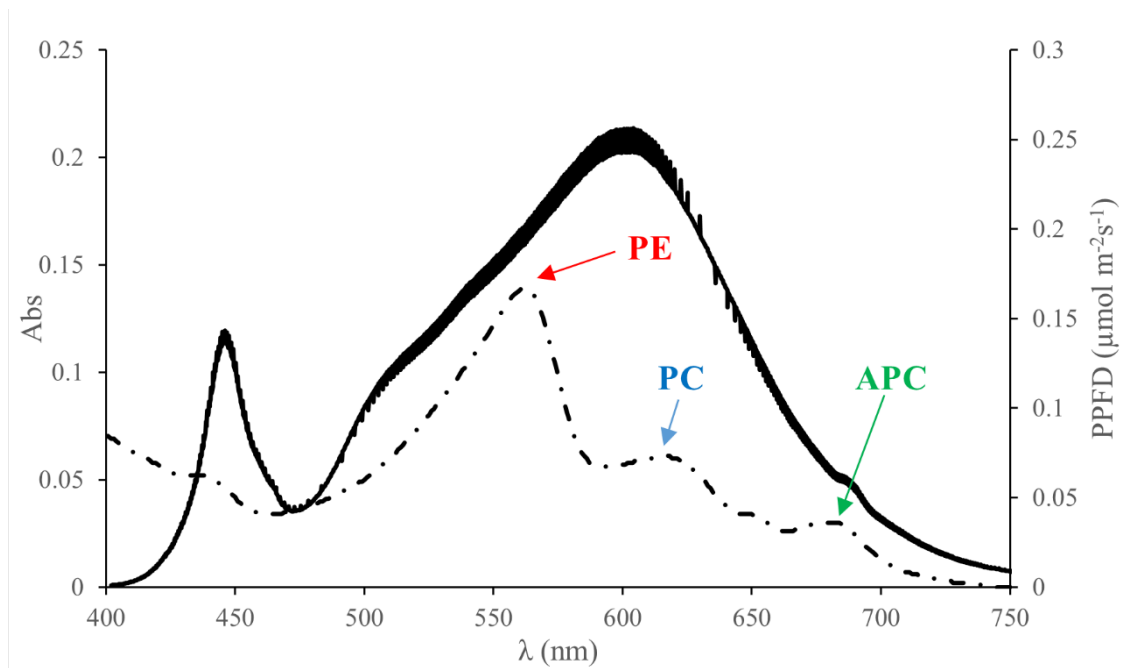


Figura 3.6 Spettro di assorbimento (linea tratteggiata) delle PBP registrato nel consorzio a bassa intensità luminosa e spettro del LED bianco (linea continua) .

3.2.1.3 Considerazioni riassuntive sull'effetto dell'intensità luminosa

Nella prospettiva di coltivare a scopi industriali un consorzio tra una microalga e un cianobatterio, l'effetto dell'intensità della luce incidente deve essere preso in considerazione. Dagli esperimenti condotti a due diverse intensità ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) usando un LED bianco sono emersi dei risultati interessanti. Per il consorzio è stata misurata una concentrazione maggiore di biomassa a bassa intensità, rispetto alle singole specie in monocultura. Tuttavia, è più appropriato considerare l'effetto di questa variabile operativa sulla produttività e sull'efficienza fotosintetica. Per la prima non vi è una variazione drastica tra bassa ed alta intensità, ad un τ di 0,85 d. Nel caso dell'efficienza fotosintetica essa raddoppia in condizioni di bassa luce nel consorzio, rispetto alle alte intensità. La foto-competezione tra le due specie è limitata dalla capacità del cianobatterio di sfruttare il CCA di tipo 3, dal momento che *S. obliquus* non è capace di assorbire le lunghezze d'onda nel range 600-680 nm, come osservato da Borella et al. (2022). A fronte di tali considerazioni, dunque, la scelta di sfruttare un PFD di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ risulta quella più adeguata agli scopi di questo progetto, poiché si ottiene una buona produttività volumetrica ($1,05 \text{ g L}^{-1}$) e un'alta efficienza fotosintetica ($\sim 20\%$).

3.2.2 Effetto dello spettro luminoso sulla crescita del consorzio

Le lunghezze d'onda del PAR stimolano nelle microalghe differenti processi chiave del loro metabolismo, dalla divisione cellulare all'accumulo di sostanze e metaboliti d'interesse. L'uso di LED monocromatici (RL, OL e GL, si veda par. 2.2 per le specifiche delle lampade) ha consentito di studiare l'effetto della modulazione della lunghezza d'onda su crescita, produttività ed efficienza fotosintetica nel consorzio. Per meglio comprendere i dati di crescita ottenuti, nei prossimi paragrafi questi saranno discussi in relazione al fenomeno di adattamento cromatico in *T. tenuis* e nel consorzio. Nello specifico verrà introdotto il rapporto tra la ficoeritrina (PE) e la ficocianina (PC) prodotte dalla biomassa (PE:PC). Questo valore, infatti, consente di valutare la composizione dei PBSs in diverse condizioni di luce e, quindi, di ottenere informazioni sull'adattamento cromatico. Per una trattazione più estesa sulla ficobiliproteine e sui pigmenti, si rimanda ai paragrafi 3.2.2.3 e 3.2.2.4.

3.2.2.1 Concentrazione e produttività volumetrica di biomassa

La figura 3.7 mostra la concentrazione di biomassa misurata nel consorzio e nei controlli quando vengono coltivati con luce incidente di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a cui si era ottenuta la maggiore efficienza fotosintetica in WL, e a diversa lunghezza d'onda (WL, OL, RL e GL) a stato stazionario e con τ di 0,85 d. I risultati ottenuti relativi alla WL sono stati commentati dettagliatamente nel paragrafo 3.2.1. In questa sede, tale condizione verrà trattata come condizione di controllo con cui fare confronti.

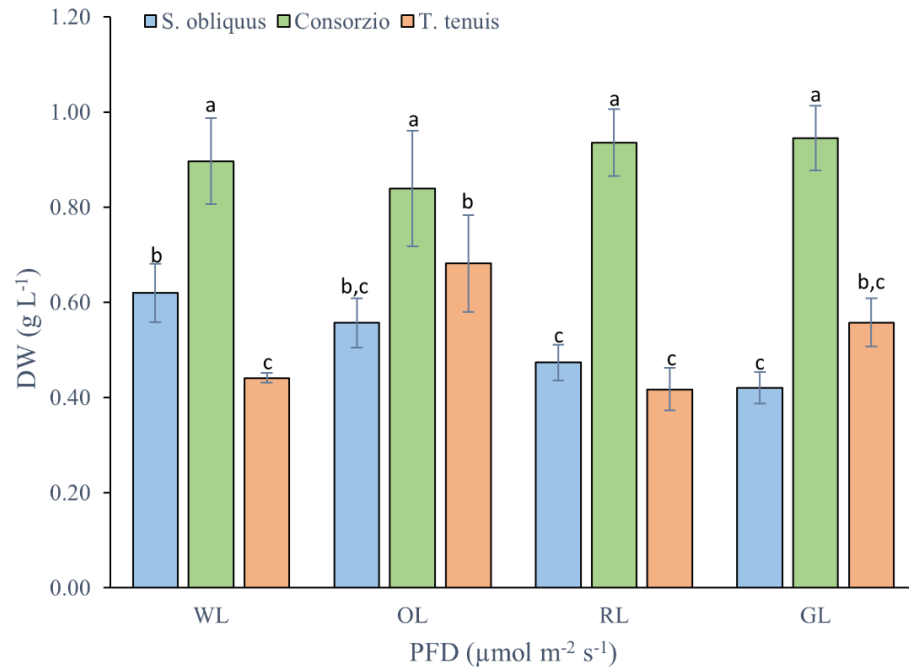


Figura 3.7 Concentrazione di biomassa (g L⁻¹) misurata a diverse lunghezze d'onda incidenti (λ). *le lettere condivise indicano l'assenza di una differenza significativa, (p<0,05).

Nella figura 3.8 sono illustrati i valori di produttività volumetrica (P_{X,V}) calcolati secondo l'Eq. 2.9 nelle diverse lunghezze d'onda (Figura 3.8).

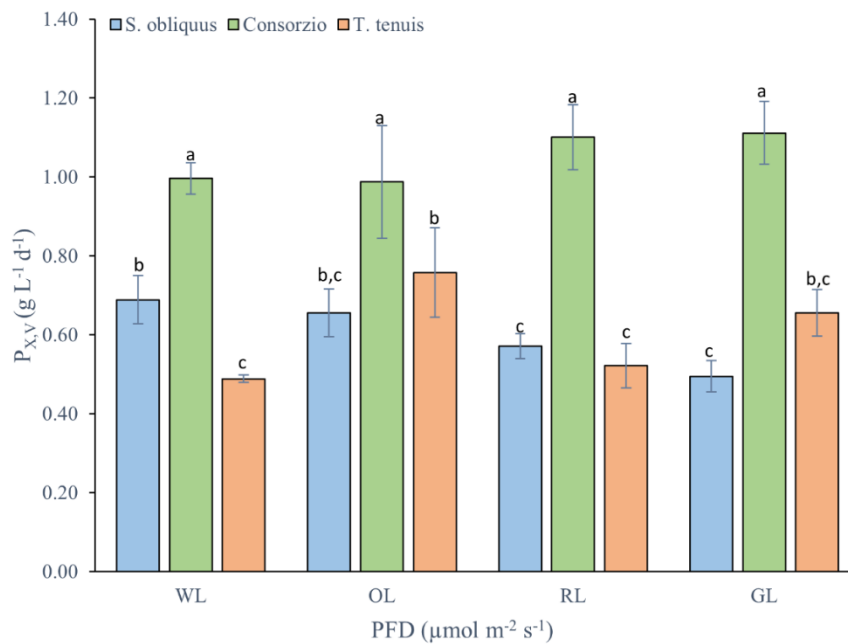


Figura 3.8 Produttività volumetrica (g L⁻¹d⁻¹) calcolata a diverse lunghezze d'onda incidenti.

Il consorzio presenta maggiore produttività rispetto ai controlli e senza significative differenze fra le condizioni testate. I risultati sono riassunti nella tabella 3.3

Tabella 3.3 Produttività volumetrica misurata nel consorzio usando diversi LED.

LED	Produttività (g L ⁻¹ d ⁻¹)
WL	1,00 ± 0,04 ^a
OL	0,99 ± 0,14 ^a
RL	1,10 ± 0,08 ^a
GL	1,11 ± 0,08 ^a

Il trend di produttività segue esattamente quello visto per la crescita di biomassa. Nel confronto tra diverse specie, il consorzio ha la produttività più alta in tutte le condizioni di luce testate (tra 1,00 e 1,11 g L⁻¹d⁻¹ in generale). Quanto trovato è paragonabile ai risultati ottenuti altrove con buona efficienza e produttività. Ad esempio, in *C. vulgaris*, Fu et al. (2019) in *flat plate* PBRs con spessore di 4 cm e in luce bianca hanno misurato una produttività pari a 1,4 g L d⁻¹.

3.2.2.1.1 Crescita in OL

Il LED arancione utilizzato (si veda par. §2.2) ha un picco di emissione alla lunghezza d'onda di 618 nm e gli esperimenti sono stati condotti a 150 μmol m⁻²s⁻¹. In queste condizioni, *S. obliquus* aveva a stazionario una concentrazione di 0,56 ± 0,05 g L⁻¹, *T. tenuis* di 0,68 ± 0,10 g L⁻¹ e il consorzio di 0,84 ± 0,12 g L⁻¹. Nel confronto tra le due monoculture risulta che la crescita del cianobatterio viene stimolata maggiormente rispetto alla microalga verde, anche se non marcatamente. Rispetto al LED di controllo (WL), in OL *T. tenuis* raggiunge concentrazioni significativamente superiori, mentre *S. obliquus* cresce senza evidenti differenze. In quest'ultimo caso è ragionevole ipotizzare che la biomassa sia sottoposta ad una intensità luminosa molto bassa rispetto all'optimum di crescita (foto-limitazione), vista anche la scarsa sovrapposizione fra lo spettro di OL e quello della clorofilla a (vedi par 2.2, Figura b). Nel caso del cianobatterio filamentoso, invece, la crescita in OL risulta stimolata non soltanto rispetto al controllo (WL), ma anche rispetto alle altre due condizioni testate (RL e GL). Nonostante non ci siano dati disponibili per questa specie coltivata a simili lunghezze d'onda in letteratura, pensiamo che

tale risultato sia attribuibile alla presenza della PC, per cui lunghezze d'onda di 620-630 nm risultano particolarmente efficaci. Questa assunzione si basa sul fatto che anche in altri studi, condotti in *A. platensis*, l'esposizione a OL risultava in un incremento della crescita e del contenuto di PC, rispetto ad altre lunghezze d'onda (Chini Zittelli et al., 2022; Santosh Kumar et al., 2021). Il contributo di assorbimento della PC potrebbe spiegare anche quanto ottenuto nella co-coltura, dove la concentrazione è significativamente più alta rispetto alle monoculture e simile al controllo in WL. La coesistenza con minima competizione tra le due specie nel consorzio sembra, in questo caso come in WL, essere favorita dal CCA di tipo 3. Calcolando il rapporto PE:PC si ottiene un valore di $0,39 \pm 0,04$. Questo è inferiore rispetto a quanto misurato in WL, probabilmente dovuto alla scarsità di lunghezze d'onda attive per la PE rispetto al WL e quindi ad una preponderante presenza della PC nei PBSs. Se, però, si confronta con la monocoltura e con gli esperimenti batch in OL, in cui la PE non veniva neppure espressa, si capisce come questo meccanismo sia importante per la co-esistenza tra i due microorganismi.

3.2.2.1.2 Crescita in RL

La luce rossa ha un effetto simile sulla crescita del cianobatterio ($0,42 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$) e della microalga ($0,47 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$). In consorzio la concentrazione misurata è di $0,94 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$, il doppio rispetto alle rispettive monoculture ma significativamente simile al controllo in WL. Lo spettro del LED utilizzato si sovrappone allo spettro di assorbimento della clorofilla a. In questa condizione, ci si aspetta, dunque, che i fotoni favoriscano l'attività fotosintetica in misura maggiore rispetto alle altre lunghezze d'onda, come emerso in differenti studi (Masojídek et al., 2013; Satthong et al., 2019). Allo stesso modo, c'è una sovrapposizione con lo spettro di assorbimento della PC. Come già osservato negli esperimenti preliminari e similmente a quanto detto nel paragrafo precedente, la coesistenza tra le due specie è favorita dal CCA di tipo 3. Infatti, nonostante nel consorzio si misuri un rapporto PE:PC di $0,35 \pm 0,02$, in media leggermente maggiore rispetto a quanto misurato nella monocoltura ($0,28 \pm 0,06$) (Figura 3.9), in questo caso la PE viene espressa da *T. tenuis* indipendentemente dalla presenza di un competitore in coltura. Questo risultato conferma quanto riportato in altri studi (Latsos et al., 2021; Xie et al., 2021) e cioè che, oltre la qualità della luce, anche la

sua intensità ed energia (OL ed RL hanno una bassa E_P) innescano l'espressione della PE, in modo da massimizzare l'assorbimento dei fotoni.

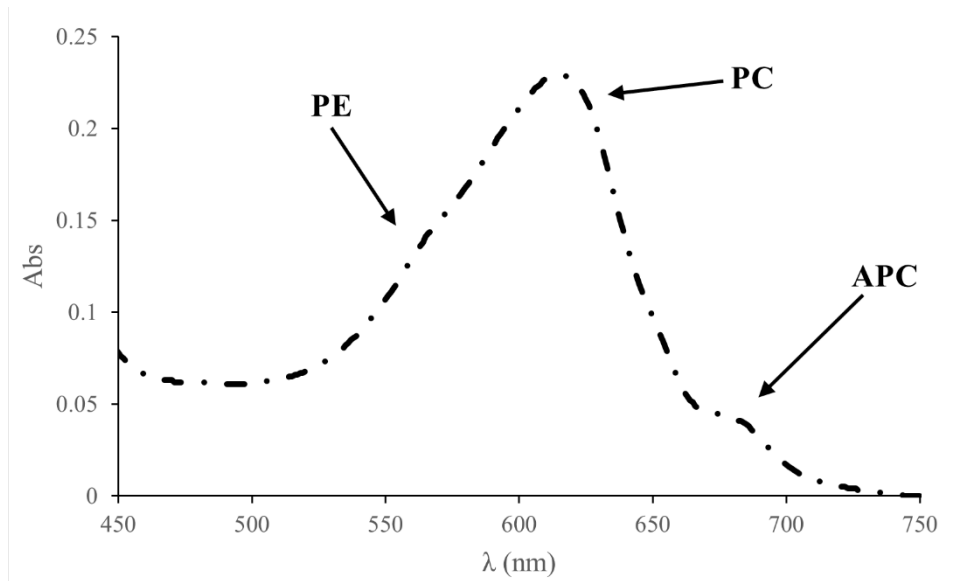


Figura 3.9 Spettro di assorbimento delle PBP registrato per il consorzio in RL. È possibile notare il contributo di assorbimento della PE come una “spalla” a minor lunghezza d’onda del ben più evidente picco appartenente alla PC.

3.2.2.1.3 Crescita in GL

La concentrazione di *S. obliquus* in GL è $0,42 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$. *T. tenuis* si attesta a concentrazioni più alte ($0,56 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$) mentre nel consorzio questa è circa il doppio ($0,95 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$). Il LED lime possiede lunghezze d’onda che nel PAR corrispondono al “Green Gap”, tipicamente non assorbite da clorofilla e carotenoidi (Koifman et al., 2021). In seno a ciò, la crescita risultante della microalga verde in questi esperimenti è ragionevolmente inferiore al controllo, poiché questa sfrutta principalmente la clorofilla a. Da un confronto con la letteratura si trova che la risposta delle alghe verdi a GL è variabile in base alla specie. Ad esempio, Sharmila e colleghi (Sharmila et al., 2018) hanno misurato nell’alga verde *Ankistrodesmus* sp. le prestazioni peggiori in GL nel confronto con luce blu, bianca e rossa. Risultato opposto nel caso di *C. vulgaris*, in cui la massima concentrazione di biomassa in batch è stata misurata in GL, rispetto a bianco e rosso. Nello stesso studio la massima velocità di crescita in GL era comparabile alle altre condizioni (Mohsenpour et al., 2013). Risposte simili alla luce verde sono state riscontrate in *Scenedesmus bijuga* e *Picochlorum* sp. (Mattos et al., 2015; Paper et al., 2022). È assodato, invece, che in GL *T. tenuis* sfrutti il CCA di tipo 3 (Ohki et al., 1991;

Stomp et al., 2004) . Questa risposta era attesa anche nel presente esperimento: il rapporto PE:PC vale $3,30 \pm 0,80$ e $5,40 \pm 0,68$, rispettivamente, nella monocultura e nel consorzio. Nonostante in entrambi i casi ci sia un adattamento innescato dalla lunghezza d'onda incidente, nel consorzio si ha un significativo arricchimento dei PBSs in PE, cosa che potrebbe essere determinata anche dall'adattamento alla coesistenza imposta con la microalga verde. L'aumentata espressione di PE nei cianobatteri capaci di produrla in GL è un risultato atteso e riscontrato in diversi casi. Bezy et al. (2011) hanno misurato in GL, in *Tolypothrix* sp., un aumento dei trascritti relativi alla sintesi di PE e del rispettivo cromoforo. *Pseudoanabaena* sp. produce più PE in GL a scapito della PC (Mishra et al., 2011). Stomp et al. (2004) hanno osservato qualitativamente lo "shift" di espressione di PBPs da PC a PE in *Tolypothrix* sp. quando questo veniva posto in competizione con cianobatteri non capaci di CCA di tipo 3, nonostante venissero coltivati in WL. Questo potrebbe spiegare l'aumento del contenuto di PE (~63%) nel consorzio rispetto alla monocultura.

3.2.2.2 Efficienza fotosintetica

Nella figura 3.10 è riportata l'efficienza fotosintetica (η_{BI}) calcolata in ciascuna condizione.

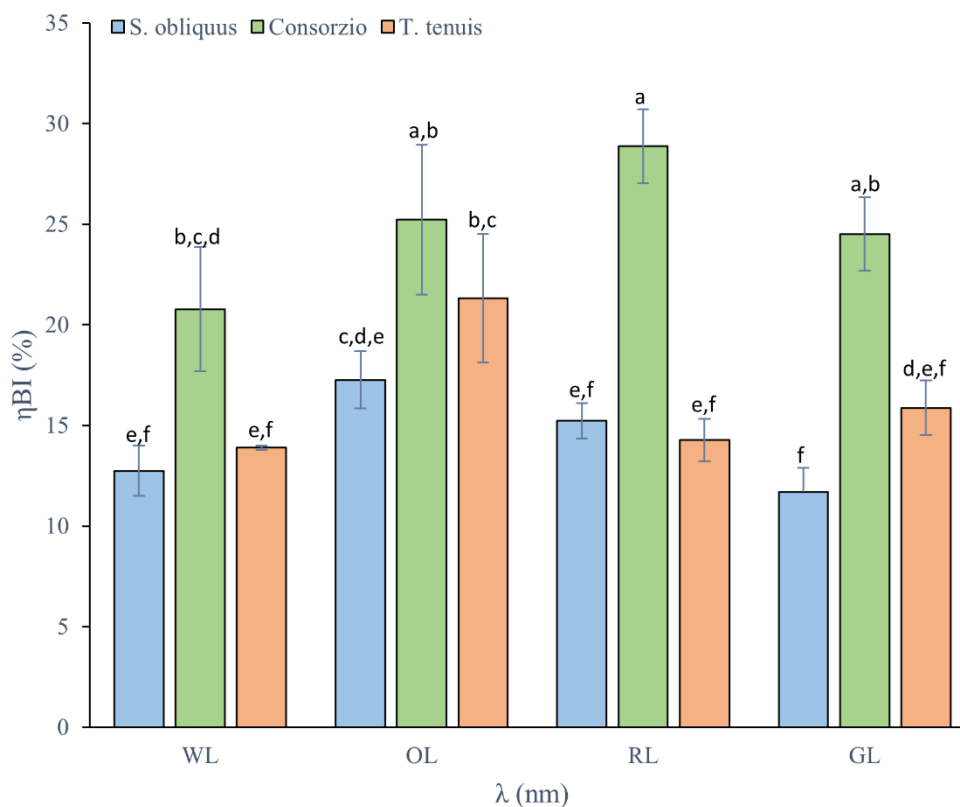


Figura 3.10 Efficienza fotosintetica (%) calcolata a diverse lunghezze d'onda incidenti.

Nella tabella sottostante sono riassunti i valori di efficienza fotosintetica calcolati in ogni condizione per il consorzio (tabella 3.4).

Tabella 3.4 Efficienza fotosintetica nel consorzio e nei controlli misurata usando diversi LED.

LED	η _{BI} (%)		
	<i>S. obliquus</i>	Consorzio	<i>T. tenuis</i>
WL	12,74 ± 1,25 ^{e,f}	20,78 ± 3,08 ^{b,c,d}	13,89 ± 0,10 ^{e,f}
OL	17,26 ± 1,43 ^{c,d,e}	25,21 ± 3,72 ^{a,b}	21,33 ± 3,19 ^{b,c}
RL	15,23 ± 0,89 ^{e,f}	28,88 ± 1,34 ^a	14,26 ± 1,06 ^{e,f}
GL	11,69 ± 1,19 ^f	24,51 ± 1,83 ^{a,b}	15,87 ± 1,35 ^{d,e,f}

Poiché nel consorzio non vi sono differenze significative nella concentrazione di biomassa, i diversi valori di efficienza calcolati in ciascuna condizione sono strettamente influenzati dalle specifiche delle lampade LED utilizzate. In WL abbiamo il valore più basso (~20%) mentre nelle condizioni monocromatiche (OL,

RL e GL) l'efficienza aumenta. Dall'equazione 2.11 notiamo che l' η_{BI} dipende dall'energia del fotone (E_p). Nei risultati ottenuti troviamo un trend atteso: infatti all'aumentare dell' E_p (WL>GL>OL>RL) diminuisce l'efficienza misurata. Dal punto di vista biologico i risultati possono essere interpretati in funzione della lunghezza d'onda fornita. In WL l'assorbimento di fotoni è il più basso, principalmente a causa della presenza di lunghezze d'onda nel verde (“*Green Gap*”) e nel blu, assorbite in maniera meno efficiente dai pigmenti. I fotoni in luce rossa, invece, hanno una energia più bassa e ciò generalmente causa un incremento dell'efficienza fotosintetica, come visto in RL. Nel caso di OL, GL ed RL si può suggerire, inoltre, un ruolo preponderante delle PBPs: la PE avrebbe un ruolo preponderante in GL, la PC in OL e RL. Nonostante in GL *S. obliquus* avesse la più bassa efficienza fotosintetica ($11,69 \pm 1,19\%$), quella misurata nel consorzio nella stessa condizione è risultata in linea con le altre. L'efficienza più alta, vicina a quella massima teorica nel PAR (30%, calcolato in luce rossa), è stata registrata in RL, dove è plausibile immaginare di scomporre il risultato come somma di più contributi: 1) stimolazione dell'attività fotosintetica per entrambe le specie; 2) arricchimento di PC nei PBSs di *T. tenuis*; 3) innesco del meccanismo di CCA3 tramite espressione della PE in *T. tenuis*.

3.2.2.3 Contenuto di pigmenti

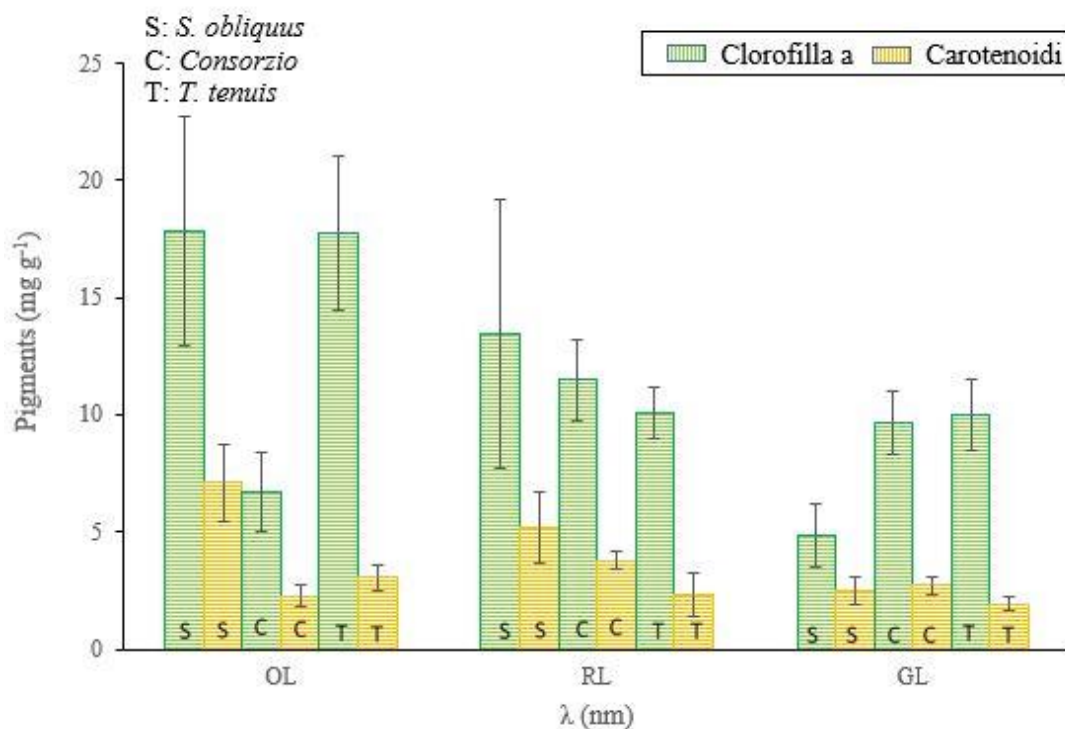


Figura 3.11 Contenuto di pigmenti (clorofilla a e carotenoidi) nella biomassa (mg g⁻¹) nelle diverse condizioni di lunghezza d'onda.

Il contenuto di clorofilla a e carotenoidi è stato analizzato per ogni specie nelle tre condizioni rappresentate in Figura 3.11. Nel confronto tra OL ed RL in *S. obliquus* non si ha una differenza significativa nel contenuto di clorofilla a, dove rispettivamente abbiamo $17,82 \pm 4,89 \text{ mg g}^{-1}$ e $13,44 \pm 5,75 \text{ mg g}^{-1}$. In GL, invece, il contenuto di pigmenti scende drasticamente a $4,87 \pm 1,36 \text{ mg g}^{-1}$. Quantificando, pertanto, il rapporto Carotenoidi:Clorofilla a (Car:Chl) si ottiene un valore di $0,52 \pm 0,05$ (per confronto, in RL vale $0,37 \pm 0,02$ e in OL $0,40 \pm 0,01$), indice di un'inferiore quantità di clorofilla a, probabilmente dovuto alla scarsità di lunghezze d'onda assorbite da questo pigmento. Evidenze di ciò sono presenti in letteratura. Infatti, Markou et al. (2021) hanno coltivato *Auxenochlorella protothecoides* in GL e hanno misurato il più basso contenuto di clorofilla a rispetto a lunghezze d'onda del bianco, blu e rosso. Il maggior rapporto Car:Chl misurato in GL ($0,52 \pm 0,05$) può far supporre che la microalga produca meno clorofilla a e più carotenoidi. Questi potrebbero proteggere i fotosistemi dalla presenza di fotoni più energetici

rispetto alle condizioni OL e RL (e infatti Car:Chl diminuisce linearmente al diminuire dell' E_p). Il contenuto di clorofilla a in GL per il cianobatterio è leggermente maggiore rispetto alla microalga ($10,01 \pm 1,50 \text{ mg g}^{-1}$), e simile a quello dello stesso pigmento in RL. Si deduce che non ci sia molta differenza all'interno dell'apparato fotosintetico nello switch da RL a GL. Questo risultato era atteso poiché in uno studio condotto su *Tolypothrix* sp., Campbell (1996) ha osservato che, seppur attraverso due diverse complesse strategie, non vi è alcuna differenza misurabile nell'attività dei PSI e II in GL ed RL. Tale risposta si è evoluta per mantenere alta l'attività del macchinario fotosintetico indipendentemente dalle PBPes espresse. In OL si ha un aumento del contenuto di clorofilla a in *T. tenuis*, che risulta simile a quello della microalga ($17,74 \pm 3,28 \text{ mg g}^{-1}$). Tale condizione si conferma favorevole per la crescita del cianobatterio. Infatti, il rapporto Car:Chl è basso ($0,40 \pm 0,01$) ad indicare che non è presente stress ossidativo in questa condizione. In generale, comunque, il contenuto di carotenoidi nelle monoculture è piuttosto basso, facendo presupporre che non vi sia stress ossidativo nelle condizioni testate.

Nel caso del consorzio troviamo il maggior contenuto di clorofilla a in RL ($11,48 \pm 1,75 \text{ mg g}^{-1}$), seguito da GL ($9,63 \pm 1,36 \text{ mg g}^{-1}$) e OL ($6,70 \pm 1,69 \text{ mg g}^{-1}$). Risultando simile alla monocultura di *T. tenuis*, il contenuto di clorofilla a in GL suggerisce una sostanziale predominanza del cianobatterio rispetto alla microalga. *S. obliquus* potrebbe plausibilmente essere limitato nella crescita e contribuire dunque poco al totale. Una grossa differenza si nota invece tra RL e OL. In quest'ultima il contenuto di clorofilla a è quasi la metà rispetto a RL, cosa che può essere spiegata dalla differente capacità dei fotoni di stimolare la fotosintesi. In OL, tuttavia, c'è una vistosa differenza tra il consorzio e le monoculture. L'aumento di quasi tre volte per la clorofilla a nei controlli ci suggerisce che nel consorzio è plausibile ci sia una maggiore efficacia nello sfruttare l'adattamento cromatico complementare.

3.2.2.4 Contenuto di ficobiliproteine

Nella figura 3.12 è illustrato il contenuto di PBPes misurato per *T. tenuis* in monocultura (A) e per il consorzio (B) alle lunghezze d'onda testate. Nella tabella 3.5 sono, invece, elencati i rapporti PE:PC misurati nella monocultura e nel

consorzio. I risultati in OL nella monocoltura (Figura 3.12, A) confermano quanto visto negli esperimenti preliminari. In tale condizione i PBS di *T. tenuis* sono composti da sola APC e PC, probabilmente a causa della buona sovrapposizione tra lo spettro della lampada e lo spettro di assorbimento della PC. In generale in questa condizione si ha la maggiore espressione di PC ($61,55 \pm 9,67 \text{ mg g}^{-1}$) e APC ($23,68 \pm 4,71 \text{ mg g}^{-1}$). Il CCA di tipo 3 diventa evidente nel momento in cui si ha una espressione della PE, a scapito della PC, nei PBSs. Non esistono, tuttavia, dati in letteratura circa la modulazione di questo meccanismo in esposizione a luce arancione. In diversi studi è stato osservato che in *A. platensis* si assiste ad un aumento del contenuto di PC in OL (Markou et al., 2021; Milia et al., 2022). Tuttavia questa specie non è capace di esprimere PE e di fare CCA di tipo 3. Il risultato ottenuto in questo caso è, dunque, piuttosto interessante, poiché suggerisce che, nonostante la capacità di sfruttare il CCA di tipo 3 e nonostante la bassa energia dei fotoni lo consenta in via teorica, *T. tenuis* non attui la stessa strategia rispetto alle altre condizioni, preferendo aumentare il contenuto di PC. Infatti in RL, GL e WL la PE è stata espressa e se ne è potuto calcolare il rapporto rispetto alla PC. Nonostante il contenuto di PE sia minore in GL rispetto a WL, l'adattamento cromatico viene innescato, come prevedibile, con maggior evidenza nella prima. In GL il rapporto PE:PC ($3,30 \pm 0,08$) è più del doppio che in WL ($1,33 \pm 0,07$). Questo poiché in WL sono presenti, seppur in minor quantità, delle lunghezze d'onda in cui assorbe la PC, la quale è espressa, infatti, in quantità quasi 5 volte maggiori ($23,92 \pm 4,60 \text{ mg g}^{-1}$) rispetto a GL ($5,85 \pm 1,68 \text{ mg g}^{-1}$). Anche in RL il cianobatterio sfrutta il CCA di tipo 3 anche se il rapporto PE:PC è più basso ($0,28 \pm 0,06$). Ojit et al. (2015) hanno misurato un rapporto simile (0,35) in *Anabaena circinalis* coltivata con RL. I risultati ottenuti in RL, GL e WL concordano con quanto descritto altrove (Kehoe et al., 2006; Ojit et al., 2015; Stomp et al., 2004).

Tabella 3.5 Rapporto PE:PC misurato nella monocoltura e nel consorzio nelle diverse condizioni di lunghezza d'onda.

LED	Rapporto PE:PC	
	<i>Tolypothrix tenuis</i>	Consorzio
WL	1,33 ± 0,07	1,77 ± 0,17
OL	/	0,39 ± 0,04
RL	0,28 ± 0,06	0,35 ± 0,02
GL	3,30 ± 0,08	5,40 ± 0,68

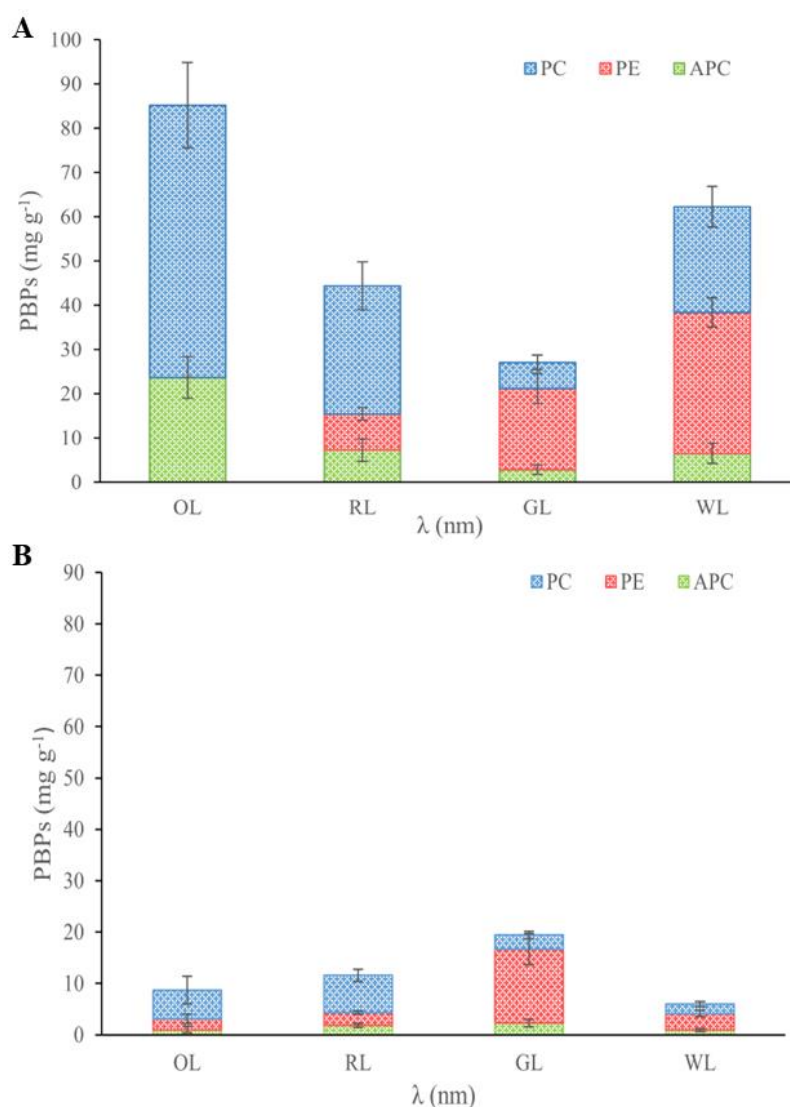


Figura 3.12 Quantità di PBP (PC, PE e APC) accumulati da *T. tenuis* in monocoltura (A) e in consorzio (rispetto al totale di biomassa) (B) nelle diverse condizioni di lunghezza d'onda.

La composizione dei PBPs di *T. tenuis* nel consorzio (Figura 3.12, B) è invece leggermente differente. In GL si ha un maggiore arricchimento di PE nei PBSs rispetto alla monocultura (PE:PC=5,40 ± 0,68) e questo potrebbe presumibilmente essere dovuto alla competizione con la microalga verde. Un più contenuto aumento della quantità di PE espressa rispetto a *T. tenuis* si ritrova in WL (1,77 ± 0,17) e RL (0,35 ± 0,07). Una differenza che salta all'occhio è l'espressione di PE in OL: questa nella monocultura e anche negli esperimenti in batch non risultava espressa dal cianobatterio a tale lunghezza d'onda. Nel consorzio invece viene espressa con una dinamica del tutto simile a RL, con un PE:PC di 0,39 ± 0,04. Dunque, l'aumentata espressione di PE in tutte le condizioni rispetto alle monoculture suggerisce che la foto-competizione con la microalga verde (oltre alla lunghezza d'onda incidente) è alla base del “boost” del meccanismo di CCA di tipo 3. Confrontando i grafici (A) e (B) della figura 3.12, si nota però che il contenuto totale di PBPs differisce notevolmente tra il consorzio e la monocultura. In quest'ultimo, infatti, il contenuto misurato di PBPs totali è superiore al consorzio in OL (85,24 contro 8,73 mg g⁻¹) in RL (44,36 contro 11,56 mg g⁻¹) e in WL (62,28 contro 5,97 mg g⁻¹). In GL si misura una differenza meno marcata (27,04 ± 6,20 contro 19,42 ± 4,49). Supponendo che in GL ci sia un sostanziale predominio del cianobatterio rispetto alla microalga, questi risultati suggeriscono che nelle diverse condizioni esista una specifica dinamica di foto-competizione tra *T. tenuis* e *S. obliquus*.

3.2.2.5 Dinamica tra le specie all'interno del consorzio

Per tentare di separare il contributo alla concentrazione totale (C_X) nel consorzio dato da *T. tenuis* e *S. obliquus* ci si è basati sulla struttura macromolecolare del PBS. Infatti, esaminando la coltura al microscopio, si è notato come le caratteristiche morfologiche di *S. obliquus* variassero negli esperimenti a diverse luci, rendendo impossibile l'ottenimento di una retta di correlazione conta-peso secco attendibile. D'altra parte, l'allofococianina (APC) è un componente strutturale dei PBSs e serve per l'ancoraggio dei *rods* al PSII (Dagnino-Leone, 2022). La dinamica dei PBSs nelle diverse condizioni di qualità e intensità luminosa sembra riguardare maggiormente la lunghezza dei *rods* e il loro arricchimento in PE e PC piuttosto che il numero di PBSs nei centri di reazione (Chenu et al., 2017; V. Kumar et al., 2019), per cui è ragionevole pensare che non ci sia una enorme differenza in termini

di quantità di PBSs dalla monocultura al consorzio. Questa ipotesi è avvalorata dal fatto che in GL, dove si presume ci sia una predominanza del cianobatterio, la quantità di APC estratta è praticamente uguale tra il consorzio e il controllo. Dunque, rapportando per ogni lunghezza d'onda l'espressione dell'APC misurata in consorzio a quella misurata in monocultura si ottiene in che percentuale, rispetto a *S. obliquus*, è presente *T. tenuis*. Da questa, essendo nota la concentrazione di biomassa totale nel consorzio, si possono ricavare le rispettive concentrazioni delle due specie (Figura 3.13).

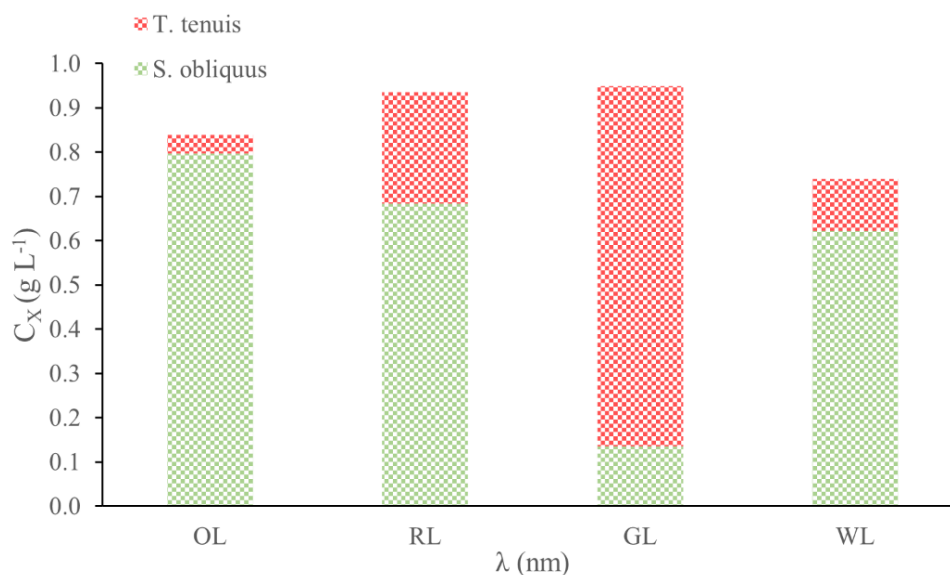


Figura 3.13 Contributo delle singole specie alla concentrazione totale misurata nel consorzio.

Come atteso, *T. tenuis* è predominante in GL (86%), mentre la presenza più bassa si registra in OL (5%). Infatti, nella monocultura *T. tenuis* ha dimostrato di riuscire a crescere agevolmente, come osservato anche nel contenuto di pigmenti e PBPs. In consorzio, questo stesso comportamento non si osserva. È probabile, infatti, come appare dalla monocultura, che in questa condizione *T. tenuis* riesca a sfruttare principalmente la PC. Tuttavia, nel momento in cui si instaura la competizione con la microalga, sembra che il solo contributo della PC non sia sufficiente al normale accrescimento, cosa che riesce bene in tutti gli altri casi in cui una certa quantità di PE viene espressa. Ed infatti in WL la percentuale sale al 16% e in RL al 27%. Da queste dinamiche appare chiaro come non ci sia una particolare predominanza (ad

eccezione di GL) nelle diverse condizioni da parte di *T. tenuis*, mentre la microalga verde sarebbe presente in maggiori concentrazioni nel consorzio rispetto ai relativi controlli. Per indagare su quest'ultimo aspetto sarebbe necessario uno studio più approfondito delle dinamiche di foto-competizione e una quantificazione più accurata delle due specie.

3.2.2.6 Considerazioni riassuntive sull'effetto della lunghezza d'onda

L'uso di LED monocromatici permette, rispetto al LED bianco policromatico, di ottimizzare la produttività volumetrica e l'efficienza fotosintetica, fondamentali per l'applicazione industriale di una coltura. Negli esperimenti è stato anche dimostrato che è possibile sfruttare i LED monocromatici per coltivare in co-coltura due differenti specie microalgali, guadagnando rispetto alle monoculture, oggi ancora sfruttate per la maggiore in ambito di ricerca e industriale. Nello specifico, il consorzio tra *S. obliquus* e *T. tenuis* raggiunge alte densità cellulari in tutte le condizioni testate, con significativa differenza rispetto ai controlli. Come nel caso dell'intensità luminosa, l'ottimizzazione del processo di coltura in continuo, per gli scopi del presente elaborato, richiede la valutazione della produttività volumetrica e dell'efficienza fotosintetica. L'illuminazione con luce rossa fornisce la maggiore efficienza fotosintetica ($28,88 \pm 1,34$ %) a fronte di una alta produttività volumetrica ($1,10 \pm 0,08$ g L⁻¹d⁻¹). Nell'ottica di applicazione industriale del consorzio microalgale il LED rosso potrebbe potenzialmente diminuire i costi di illuminazione e aumentare la produttività generale del processo.

3.2.3 Effetto del tempo di permanenza

Applicando le condizioni luminose di intensità e lunghezza d'onda con maggior efficienza fotosintetica per il consorzio (RL, $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), la crescita di quest'ultimo è stata monitorata variando il tempo di permanenza (0,6, 0,85, 1,4 e 2,0 d) allo scopo di trovare un optimum di produttività ed efficienza fotosintetica.

3.2.3.1 Concentrazione e produttività volumetrica di biomassa

La Figura 3.14 illustra l'andamento della concentrazione di biomassa (C_X) e la relativa produttività volumetrica ($P_{X,V}$) in funzione del tempo di permanenza.

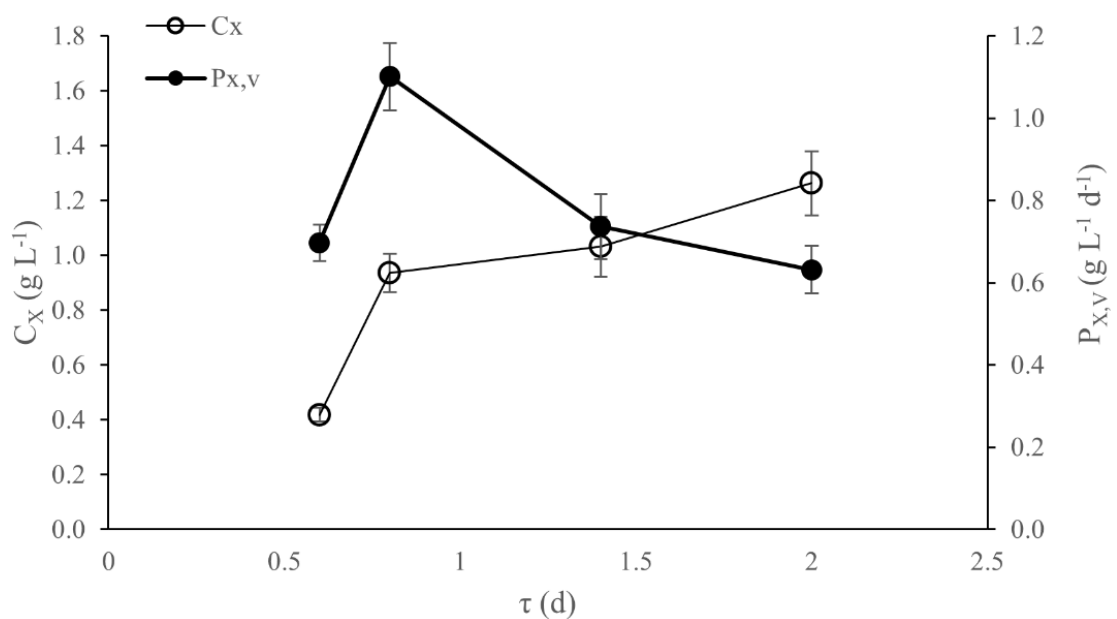


Figura 3.14 Concentrazione di biomassa (C_X) e produttività volumetrica ($P_{X,V}$) in funzione del tempo di permanenza nel consorzio.

La concentrazione di biomassa aumenta all'aumentare del tempo di permanenza. Questo poiché aumentare il tempo di permanenza vuol dire, a parità di volume del PBR, abbassare la portata in ingresso (Q_e , L d⁻¹) e quindi aumentare il tempo impiegato per rinnovare l'intero volume operativo del PBR (vedi Eq. 2.3). La variazione della concentrazione, dunque, dipende dalla velocità di divisione cellulare delle specie coltivate e, a tempi di permanenza sufficientemente alti, le cellule si dividono ad un tasso superiore rispetto a quello con cui sono rimosse dal PBR. Analizzando i dati più nello specifico, la massima differenza si ha tra $\tau=0,6$ d e $\tau=0,85$ d, in cui la concentrazione misurata raddoppia da $0,42 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ a $0,94 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$. A τ più alti, invece, si registra un incremento di concentrazione più

contenuto, cioè $1,03 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$ ($\tau=1,4 \text{ d}$) e $1,26 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$ ($\tau=2,0 \text{ d}$). Nel caso di tempo di permanenza più basso (0,6 d) si osserva una drastica diminuzione della concentrazione nel consorzio, a parità di tutte le altre condizioni. È plausibile supporre che, in questa condizione, si sia verificato il “*wash-out*” di una delle due specie costituenti la co-coltura. Per testare questa ipotesi, è stata quantificata la produzione di PBPs, prodotte dal solo cianobatterio nella co-coltura. Nell’analisi spettrofotometrica condotta non è stata rilevata la presenza dei pigmenti e ciò avvalorava l’ipotesi che *T. tenuis* non sia in grado di replicarsi altrettanto velocemente a tali tempi di permanenza e che subisca il fenomeno di “*wash-out*”. Per tempi di permanenza più alti l’incremento di concentrazione segue un trend differente. Rispetto a τ di 0,85 d si ha un aumento del 9,5% (1,4 d) e del 34% (2,0 d). All’aumentare della densità delle cellule all’interno del PBR si verificano fenomeni di *self-shading*. La luce incidente non è più omogeneamente disponibile in tutto il volume operativo e la crescita della biomassa risulta presumibilmente limitata da questo fenomeno.

I fenomeni di *self-shading* hanno un effetto molto visibile sulla produttività volumetrica calcolata. Infatti a tempi di permanenza molto alti, si assiste ad un calo di questa. I valori calcolati a $\tau=1,4 \text{ d}$ ($0,73 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e $2,0 \text{ d}$ ($0,63 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) sono simili a quelli calcolati a τ più basso ($0,70 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). L’optimum di produttività di biomassa, invece, si stabilisce a $\tau=0,85 \text{ d}$ ($1,10 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Un trend simile è stato già osservato in diversi studi (Lee et al., 2013; Solmaz et al., 2020).

3.2.3.2 Efficienza fotosintetica

La figura 3.15 mostra i valori di efficienza fotosintetica η_{BI} calcolati al variare del tempo di permanenza, a parità di condizioni di illuminazione.

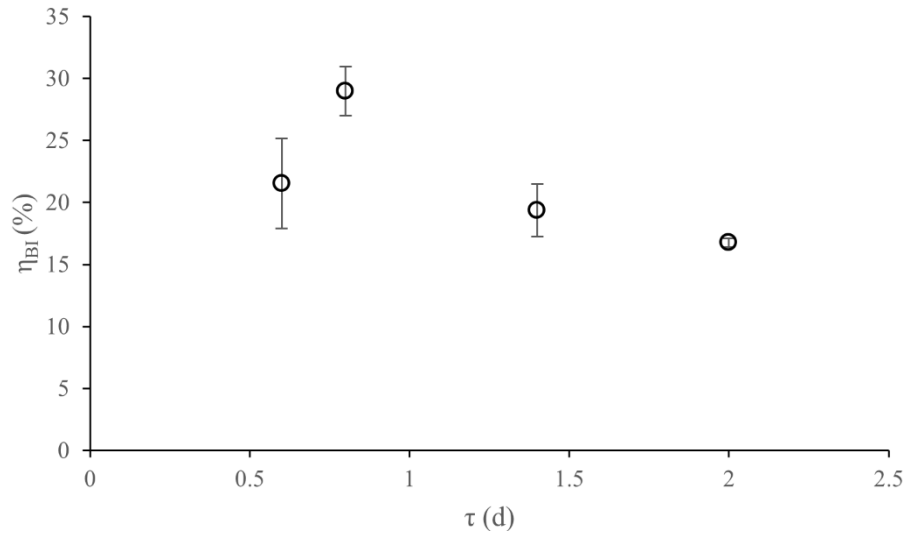


Figura 3.15 Efficienza fotosintetica (η_{BI}) in funzione del tempo di permanenza nel consorzio.

L'andamento dell'efficienza fotosintetica è confrontabile alla produttività volumetrica (vedi Figura 3.14). Anche in questo caso si assiste ad un massimo a τ di 0,85 d ($28,88 \pm 1,34$ %). Il minimo si registra a τ di 2,0 d con il $16,76 \pm 0,35$ % mentre a τ 0,6 d e 1,4 d abbiamo valori intermedi, ma comunque molto elevati e pari, rispettivamente, a $21,52 \pm 3,63$ e $19,38 \pm 2,12$ %. Le variabili che, in questo caso, influenzano maggiormente η sono la portata in ingresso (Q_e) e la concentrazione di biomassa (C_x). Guardando l'Eq. 2.11, si vede che a parità di C_x si ha una influenza della portata in ingresso ed un sua diminuzione porta ad un decremento di η_{BI} . Tenendo in considerazione uno scarso aumento di concentrazione rispetto alla condizione con massima efficienza, la diminuzione dell'efficienza può essere ancora una volta spiegata dall'ineguale distribuzione dell'energia luminosa all'interno del PBR a causa della alta densità cellulare. Un risultato simile è stato ottenuto con *S. obliquus* da Sforza et al. (2014) andando da un τ di 2,33 d (a cui si registra il massimo di efficienza) ad uno di 3,0 d.

CAPITOLO 4 – Applicazioni della biomassa prodotta in ottica di “biorefinery” e valutazione dei costi di illuminazione

Una volta studiato l'effetto dell'intensità, della lunghezza d'onda e del tempo di permanenza sul consorzio microalga-cianobatterio sono state analizzate la produttività areale e l'efficienza di conversione energetica, in un'ottica di applicazione industriale. La scelta di utilizzare un sistema di illuminazione artificiale ha, infatti, un impatto sui costi energetici del processo, i quali sono stati calcolati mediante un'analisi preliminare dei costi di illuminazione nelle condizioni testate. Per giustificare questi costi è stato proposto un utilizzo della biomassa per la produzione di PBPs, ovvero composti di medio-alto valore, e la biomassa rimanente dal processo di estrazione di queste è stata ulteriormente valorizzata mediante un approccio di “*biorefinery*”. In tal senso, la biomassa microalgale è stata caratterizzata e ne è stata testata l'attività biostimolante su semi di cetriolo.

4.1 Produttività areale di biomassa

La produttività di biomassa è legata alla superficie del fotobioreattore irradiato, motivo per cui i fotobioreattori comunemente utilizzati su piccola-media scala richiedono una vasta area per poter essere esposti quanto più possibile alla luce. Dunque, al fine di confrontare quanto ottenuto con la letteratura, è stata calcolata la produttività areale di biomassa ($P_{X,A}$) definita dall'equazione 2.10. Nella figura 4.1 è illustrata la $P_{X,A}$ del consorzio e i relativi controlli alle diverse lunghezze d'onda (Figura 4.1).

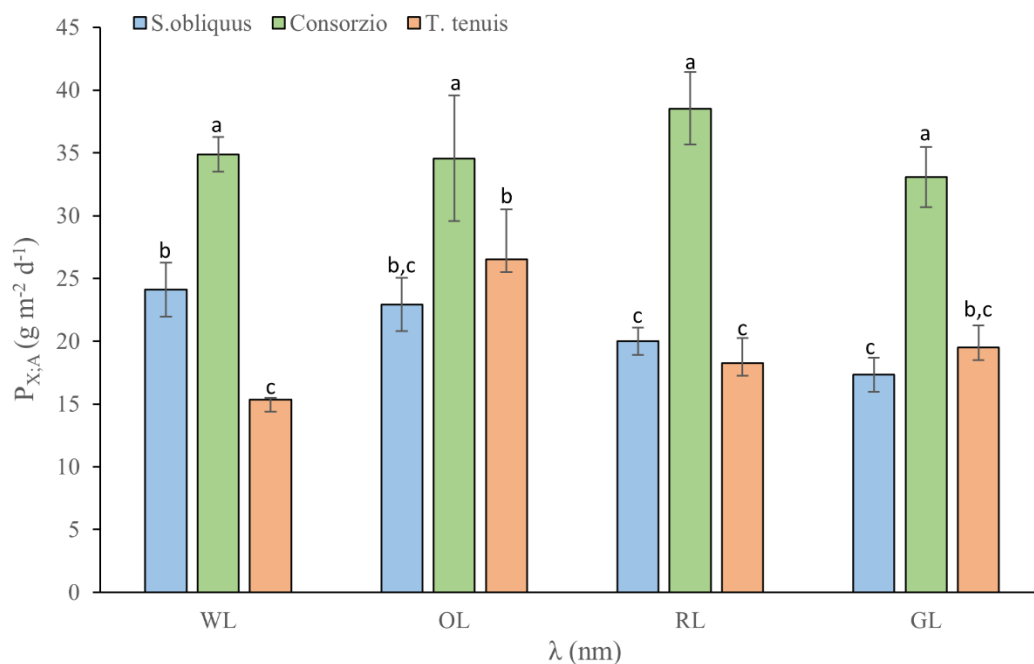


Figura 4.1 Produttività areale di biomassa ($\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$) nel consorzio e nelle monoculture a diverse lunghezze d'onda.

I valori di produttività areale più alta si ottengono nel caso del consorzio, nel range tra $33,08 \pm 2,38$ (GL) e $38,53 \pm 2,88$ $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$ (RL). Nelle monoculture i valori calcolati sono significativamente più bassi rispetto alla co-coltura, con il massimo raggiunto da *S. obliquus* in WL e da *T. tenuis* in OL (rispettivamente $24,11 \pm 2,14$ $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$ e $26,52 \pm 3,97$ $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$).

Il massimo teorico di produttività areale raggiungibile in PBRs può essere calcolato pari a $52,5$ $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$, mentre in sistemi aperti questo valore diminuisce a 25 $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$ (Clippinger et al., 2019; Tredici, 2010). Se si guardano invece i valori attuali di produttività areale questa è compresa tra 25 e $45,5$ $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$ per PBRs chiusi. Per un *Flat Plate* PBR vale in media 27 $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$ e nei sistemi aperti circa 13 $\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$ (Clippinger et al., 2019). I valori ottenuti nel caso del consorzio, dunque, risultano generalmente maggiori rispetto a quanto riportato in letteratura e rispetto a diverse configurazioni (tabella 4.1). Quanto ottenuto ribadisce l'importanza di ottimizzare le variabili operative, in particolare la lunghezza d'onda d'illuminazione, ma evidenzia anche come la sinergia fra le due popolazioni presenti sia fondamentale per aumentare la produttività delle specie in esame. E infatti l'effetto di questa interazione sulla produttività è stato già osservato in consorzi microalgali. Ad

esempio Rashid et al. (2019) hanno dimostrato che la co-coltura tra *Chlorella* sp. ed *Ettlia* sp. ha produttività maggiori rispetto alle relative monoculture.

Tabella 4.1 Produttività areale massima riportata in letteratura per diversi sistemi di coltura (Borella et al., 2022; Clippinger et al., 2019).

Massima $P_{X,A}$ ($\text{g m}^{-2}\text{d}^{-1}$)					
Consorzio	Open Pond	Horizontal PBR	Helical Tubular PBR	Flat Panel PBR	Internally Illuminated PBR
38,5	19,0	24,1	38,5	39,2	40,0

4.2 Efficienza di conversione energetica

La figura 4.2 descrive l'efficienza di conversione energetica (η_E , %) calcolata secondo l'equazione 2.13 nel consorzio e nei relativi controlli. Nella tabella 4.2 sono sintetizzati i valori per la stessa variabile relativi al solo consorzio.

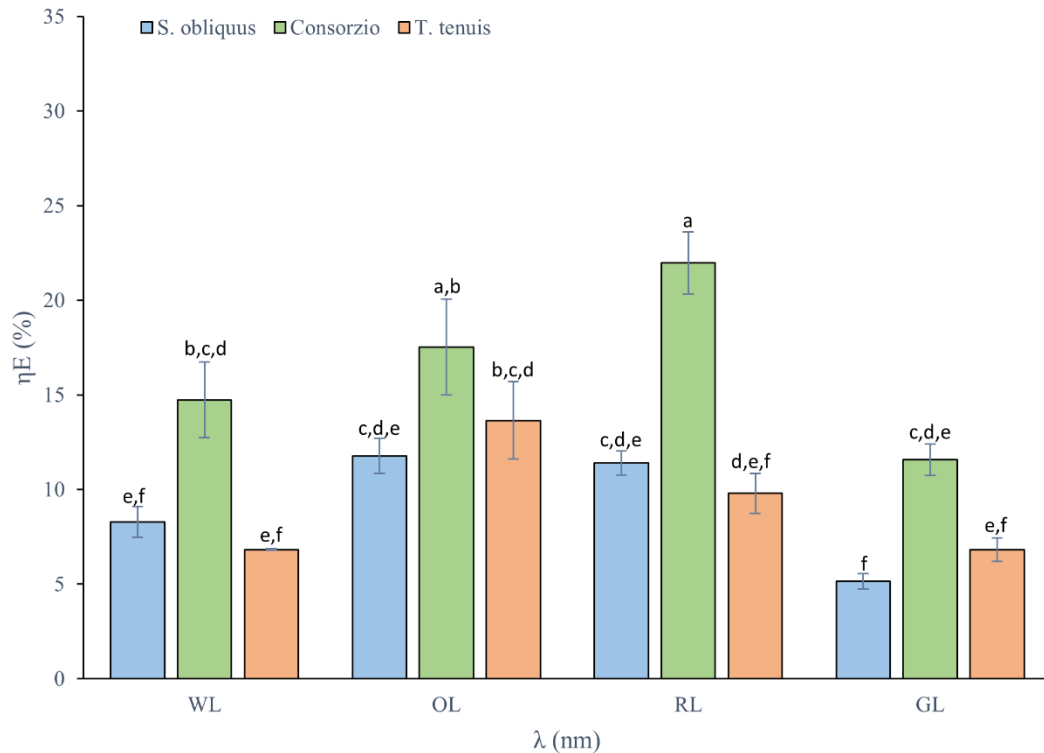


Figura 4.2 Efficienza di conversione energetica globale calcolata nel consorzio e nei controlli a diverse lunghezze d'onda.

Tabella 4.2 Efficienza di conversione energetica globale calcolata per il consorzio a diversa lunghezza d'onda.

LED	η_E (%)
WL	$14,74 \pm 2,00$
OL	$17,53 \pm 2,54$
RL	$21,96 \pm 1,64$
GL	$11,57 \pm 0,83$

Utilizzando l'Eq. 2.13 è possibile stimare l'efficienza totale di conversione di energia elettrica in luce e di luce in biomassa (Figura 5.2 e Tabella 5.2) tenendo conto dell'efficienza di ciascun sistema di illuminazione utilizzato (η_{LED} , si veda par. 2.2). Questa è maggiore in RL (~22%), mentre in OL e WL si abbassa, rispettivamente, al 17% e 14%. Infatti, il LED rosso ($\eta_{LED} = 0,78$) è quello che

attualmente è caratterizzato dall'efficienza più elevata. In GL l' η_E è dell'11% circa, ed infatti il LED lime è caratterizzato da una bassa efficienza (0,50). Dal punto di vista tecnologico ciò implica che è necessario l'uso di lampade a spettro ottimizzato e ad elevata efficienza per massimizzare l'efficienza di foto-conversione del processo. Raramente questo parametro viene tenuto in considerazione in studi di letteratura (Dutta Gupta, 2017), essendo emerso come tema recente nell'ambito della ricerca sulle microalghe. Tradizionalmente, infatti, l'illuminazione dei PBRs viene fatta con lampade LED policromatiche o lampade a fluorescenza (FL) che non hanno una buona efficienza di conversione, influenzando negativamente la resa di biomassa e, dunque, i costi d'illuminazione. I risultati ottenuti in questi esperimenti dimostrano che l'uso di LED monocromatici ha un notevole impatto sull'efficienza di conversione energetica del processo e quindi sulla resa e sulla produttività di biomassa.

4.3 Costi per l'illuminazione del PBR

La capacità di convertire quanta più energia elettrica in input in biomassa (η_E) ha un impatto sui costi di illuminazione che è stato calcolato per unità di biomassa (€ kg⁻¹) tenendo conto del costo dell'energia elettrica (€ kWh⁻¹) ad uso industriale nel secondo semestre del 2021 in Italia, pari a 0,18 € kWh⁻¹ (Eurostat, 2022). Questa scelta è stata fatta per evitare sovrastime dovute all'attuale situazione energetica contingente. I risultati ottenuti da questa analisi sono mostrati nella Figura 4.3.

Si nota come il costo d'illuminazione oscilla tra 4,59 e 8,27 € kg⁻¹ nel caso dei controlli. Nel consorzio, invece, il costo si è sempre mantenuto sotto i 4 € kg⁻¹. Di particolare rilievo è il fatto che la condizione RL risulta incidere per 3 € kg⁻¹, dimostrandosi senz'altro vantaggiosa da un punto di vista economico. In relazione al più diffuso LED bianco, il costo di illuminazione diminuisce del 23%. Questo risultato potrebbe avere forti implicazioni per l'utilizzo della biomassa per la produzione di prodotti a medio valore. Ciò è dovuto all'alta efficienza di conversione del LED rosso e all'alta concentrazione di biomassa in questa condizione rispetto alle altre condizioni. Come osservato da Anderson et al. (2003) a parità di costo dell'elettricità, un LED monocromatico richiede soltanto il 18% dei costi sostenuti con una lampada fluorescente, oggi ancora ampiamente sfruttata.

Ad oggi, il costo medio per la produzione di biomassa in PBRs illuminati con LED tradizionali va da 31 a 49 € kg⁻¹ (Fu et al., 2019; Kothari et al., 2017). Si deduce, quindi, che usando LED più efficienti come in questo caso, il costo totale di produzione della biomassa subirebbe, a parità di altri costi, un notevole calo.

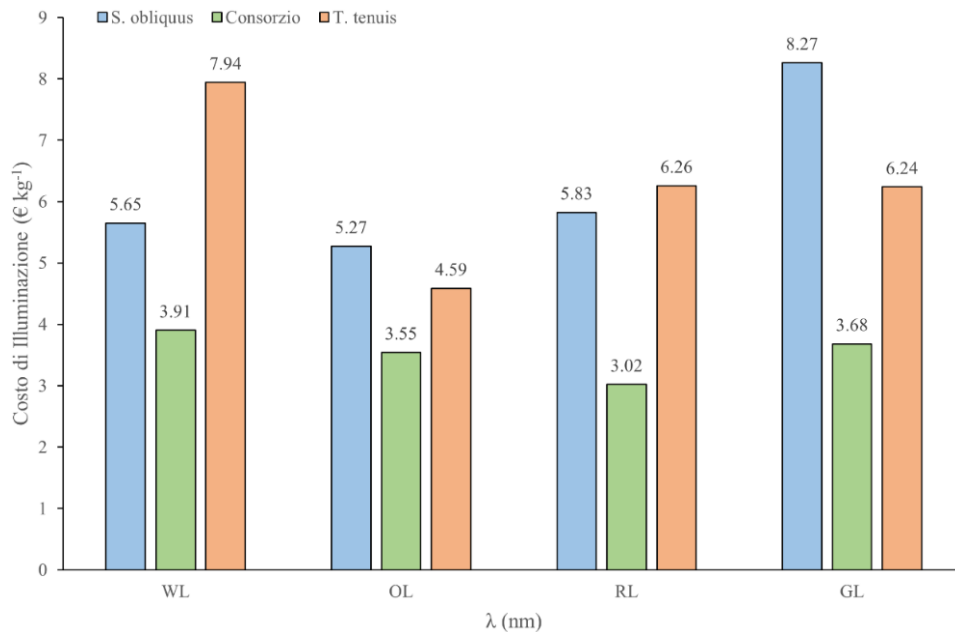


Figura 4.3 Costi di illuminazione calcolati per il consorzio e le monoculture a differenti lunghezze d'onda (prezzo dell'energia elettrica ad uso industriale nel secondo semestre del 2021 in Italia).

4.4 Applicazioni del consorzio in ottica di biorefinery

In questa sezione vengono valutate le diverse possibilità applicative del consorzio tra *T. tenuis* e *S. obliquus*. Infatti, l'uso di illuminazione artificiale ha un contributo importante nella voce dei costi di produzione rispetto ai sistemi chiusi o aperti che sfruttano illuminazione naturale. Per potere, dunque, rendere remunerativo il processo e coprire il costo aggiuntivo dell'energia, è necessario massimizzare il valore della biomassa, differenziando e moltiplicando le potenziali applicazioni della biomassa coltivata (*biorefinery*).

4.4.1 Produttività di PBP

Nella tabella 4.3 è riportato il valore di produttività volumetrica di ficobiliproteine

misurato nel consorzio alle diverse lunghezze d'onda.

Tabella 4.3 Produttività volumetrica di PBPs misurate nel consorzio a diversa lunghezza d'onda.

LED	Produttività PBPs (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
WL	5,28 ± 1,39
OL	8,61 ± 4,17
RL	13,14 ± 1,90
GL	21,57 ± 4,01

Le PBPs vengono impiegate in differenti ambiti, dalla nutraceutica alla cosmetica, e hanno un valore commerciale che, in dipendenza dalla purezza con la quale vengono estratte, oscilla tra 130 e 15,000 USD per grammo (Pagels et al., 2019).

I valori più bassi di produttività si ottengono in WL e OL (rispettivamente 5,28 ± 1,39 mg L⁻¹d⁻¹ e 8,61 mg L⁻¹d⁻¹). In RL si registra un valore intermedio (13,14 ± 1,90 mg L⁻¹d⁻¹) mentre il massimo si trova in GL (21,57 ± 4,01 mg L⁻¹d⁻¹). Nonostante, come discusso al paragrafo 3.2.2.4, il contenuto di PBPs nel consorzio sia diverso e mediamente più basso rispetto al consorzio in monocultura, questi valori non sono molto distanti dalle produttività riportate attualmente in letteratura per alghe largamente utilizzate, come Spirulina. Infatti, per cianobatteri come *Anabaena* sp., in letteratura si trovano produttività attorno ad 8 mg L⁻¹d⁻¹, mentre per *A. platensis* illuminata con LED monocromatico rosso si possono trovare produttività di 20 mg L⁻¹d⁻¹ (H.-B. Chen et al., 2010; Cornet et al., 1992). Tuttavia, altri lavori dimostrano come per *A. platensis*, si possano raggiungere produttività più elevate, fino a 100 mg L⁻¹d⁻¹ (Querques et al., 2015), suggerendo un importante ruolo delle variabili operative. L'ottimizzazione della produttività di PBPs nel consorzio richiederebbe quindi ulteriori studi più approfonditi e soprattutto una sua caratterizzazione in termini di composizione e di proprietà dell'applicazione.

4.4.2 Utilizzo del consorzio come biostimolante

La biomassa microalgale residua dall'estrazione delle ficobiline potrebbe trovare applicazione come stimolante per la crescita e la produttività di piante di interesse agricolo. Per tale motivo ne è stata valutata l'attività biostimolante sulla fase di germinazione di semi di cetriolo (*Cucumis sativus*).

Prima di procedere ai test di biostimolazioni veri e propri, normalmente si conducono dei test di fitotossicità sui semi il cui scopo è quello di accertarsi che la biomassa non ne inibisca la germinazione. Nella tabella 4.4 è sintetizzato l'esito del suddetto test, condotto utilizzando la biomassa del consorzio a concentrazione nota (1,0 g L⁻¹) e il relativo controllo negativo con acqua deionizzata.

Tabella 4.4 Test di fitotossicità eseguito su semi di cetriolo usando la biomassa microalgale in uscita dal consorzio ed il controllo negativo. *le lettere in corsivo indicano la significatività statistica delle misure (p<0,05).

Condizione	Numero di semi germinati
Ctrl (-)	95 ^a
Test	95 ^a

Sia nel test che nel controllo negativo sono stati contati 95 semi germinati su 100, per cui si può concludere che non sia presente fitotossicità da parte della biomassa algale in fase di germinazione. I semi di *C. sativus* sono usati come bioindicatori a causa della loro suscettibilità ai parametri ambientali (Stefanski et al., 2020). Risultati simili sono già stati riportati da studi di letteratura per le microalghe in esame, quindi, il test effettuato mirava a verificare che non vi fossero effetti di inibizione dati dalla co-coltura. *T. tenuis* viene usato come biofertilizzante nelle risaie (Patricia Gisela Silva et al., 2013) e in diversi casi è stato testato come biostimolante senza particolari effetti di fitotossicità (P. K. Singh et al., 2022; Toribio et al., 2020). Similmente, anche *S. obliquus* è stato sfruttato con successo per la germinazione di diverse piante (Ferreira et al., 2021; Viegas et al., 2021)

In figura 4.4 sono riportati i risultati ottenuti nei test di attività auxino-simile su semi di *C. sativus*, usando tre differenti concentrazioni di biomassa ed un controllo negativo con acqua deionizzata (vedi paragrafo §2.6.2).

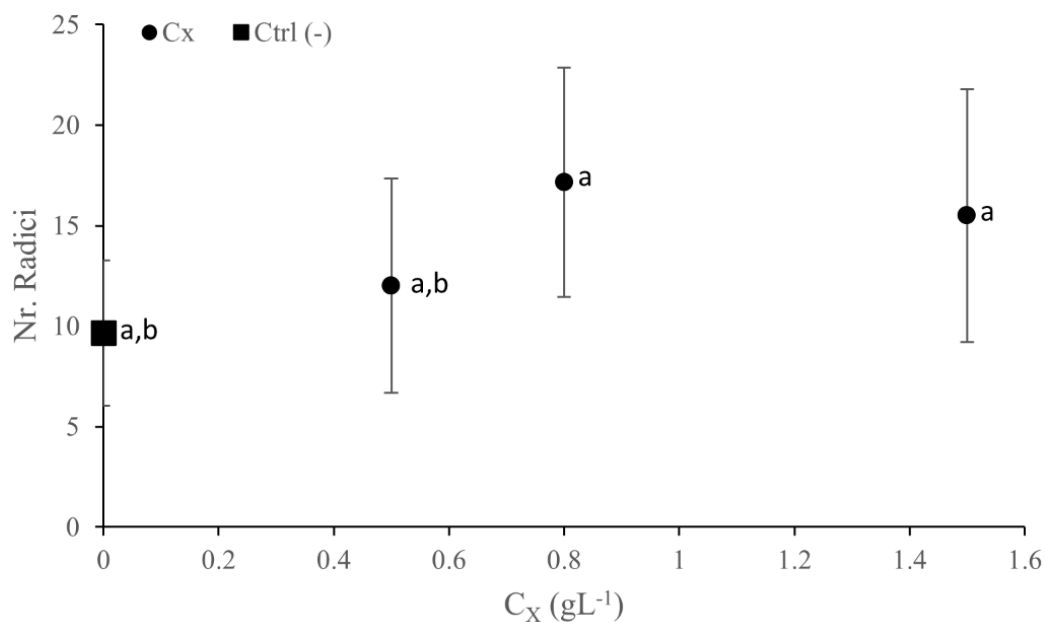


Figura 4.4 Attività auxino-simile misurata su semi di *C. sativus* usando un controllo negativo (0 g L⁻¹) e tre concentrazioni diverse di biomassa del consorzio (0,5, 0,8 e 1,5 g L⁻¹).

Nella tabella 4.5 sono sintetizzati i risultati ottenuti dalla misura dell'attività auxino-simile. Per i dettagli delle diverse condizioni si rimanda alla tabella 2.2.

Tabella 4.5 Sintesi dei risultati ottenuti nella misura dell'attività auxino-simile nelle diverse condizioni testate. *le lettere in corsivo indicano la significatività statistica delle misure ($p < 0,05$).

Condizione	Numero di nuove radici
Ctrl (-)	9,7 ± 3,6 ^{a,b}
Test 1	12,0 ± 5,3 ^{a,b}
Test 2	17,2 ± 5,7 ^a
Test 3	15,5 ± 6,3 ^a

L'attività auxino-simile misurata nelle quattro diverse condizioni non è significativamente diversa (tabella 4.5). Tuttavia, guardando il grafico in figura 4.4 si nota un trend molto simile alla tipica curva dose-risposta per l'auxina. Infatti, oltre una certa soglia di concentrazione di biomassa (in questo caso $0,8 \text{ g L}^{-1}$, Test 2), si osserva un progressivo decremento dell'attività auxino-simile.



Figura 4.5 Rappresentazione della fase di conta delle nuove radici in semi di *C. sativus*.

Già Stirk et al. (2002) avevano testato diversi ceppi microalgali, tra cui *Scenedesmus quadricauda*, trovando che questi esercitavano una significativa attività auxino-simile su semi di *C. sativus*. Ci sono evidenze del fatto che *T. tenuis* rilasci molecole stimolanti per la rigenerazione post-stress dei tessuti vegetali. Jaiswal et al. (2018) hanno infatti rilevato in questa specie buone concentrazioni di IAA (Acido Indol-Acetico), mentre in un altro studio è stata dimostrata la capacità di produrre sostanze che stimolano la rigenerazione del callo in riso (Storni de Cano et al., 2003). Per quanto riguarda *S. obliquus*, un lavoro condotto su semi di cetriolo ha dimostrato che la microalga è capace di incrementare la formazione di nuove radici quando le cellule sono somministrate intere (Navarro-López et al., 2020).

4.4.2.1 Composizione biochimica del consorzio utilizzato nelle prove di biostimolazione

Nella tabella 4.6 è illustrata la composizione biochimica della biomassa utilizzata nelle prove di biostimolazione. Esopolisaccaridi e carboidrati sono fra i composti

per i quali diverse evidenze in letteratura indicano che vi sia attività biostimolante (Brown et al., 2015; Patricia Gisela Silva et al., 2013). Anche le proteine sono probabilmente coinvolte nell'attività biostimolante, mentre per i pigmenti è riconosciuta attività antiossidante (Colla et al., 2017; Shebis et al., 2013).

Tabella 4.6 Composizione biochimica del consorzio in RL a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a τ di 1,4 d.

Componente	Contenuto
Esopolisaccaridi (EPS)	$47,2 \pm 2,4 \text{ mg L}^{-1}$
Carboidrati	$304,7 \pm 115,2 \text{ mg g}^{-1}$
Proteine	$209,1 \pm 88,2 \text{ mg g}^{-1}$
Pigmenti	$6,4 \pm 1,4 \text{ mg g}^{-1}$

E' stata misurata una concentrazione di esopolisaccaridi (EPS) pari a $47,2 \pm 2,4 \text{ mg L}^{-1}$. Da dati di letteratura è noto che *T. tenuis* (come in generale i cianobatteri) produca buone quantità di EPS, anche se in un range estremamente ampio, che va da $7,4$ a 340 mg L^{-1} (Bhatnagar et al., 2014; Nicolaus et al., 1999) presumibilmente in dipendenza dalle condizioni di crescita. Infatti, You et al. (2004) hanno osservato che a bassi PFD si ha un maggiore accumulo di EPS nei cianobatteri, mentre Han et al. (2015) hanno misurato variazioni in funzione della lunghezza d'onda, con un optimum in luce rossa. Nicolaus et al. (1999) hanno trovato che anche la composizione del terreno può favorire la produzione di EPS. *S. obliquus*, d'altro canto, è noto per la capacità di autoflocculazione, dovuta al rilascio di polisaccaridi all'esterno delle cellule. Córdoba-Castro et al. (2012) hanno ottenuto una concentrazione in *S. obliquus* di EPS che va da $8,8$ a $24,1 \text{ mg L}^{-1}$, con il minimo registrato a PFD relativamente alti ($\sim 150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). La quantità di EPS rilasciati da *Scenedesmus* spp. è anche dipendente dalla capacità di formare colonie. Nei nostri esperimenti, raramente abbiamo visto *S. obliquus* in forma coloniale. Dunque, è plausibile pensare che, data la precedente considerazione e il PFD utilizzato, il contributo della microalga sia minore rispetto al cianobatterio. I carboidrati rappresentano circa il 30% della biomassa totale. Questo valore è in

linea con quanto atteso, data l'assenza di stress nutritivi nelle condizioni in cui il consorzio è stato coltivato. Valori simili si ritrovano in letteratura (Ansari et al., 2019; Harun et al., 2010). Dato l'alto contenuto di carboidrati ci aspettavamo un valore più basso per le proteine. In effetti, il contenuto in proteine è più basso, circa il 21% della biomassa; tuttavia in questo caso la quantificazione è stata ostacolata dalla differenza strutturale fra alghe verdi e cianobatteri, ottenendo una elevata variabilità nei risultati dovuta a rese di estrazione più o meno buone con diversi protocolli.

Infine, negli organismi fotosintetici che compongono il fitoplankton i pigmenti rappresentano fino all'1-2% della biomassa (Qin et al., 2012). Questo risultato non è molto distante da quanto ottenuto nei nostri esperimenti, dove clorofilla a e carotenoidi rappresentano lo 0,6 % ($6,4 \pm 1,4 \text{ mg g}^{-1}$) del totale di biomassa. Similmente M. Chen et al. (2011) hanno misurato in *S. obliquus* un contenuto di 6 mg g^{-1} . In un altro lavoro hanno osservato che *T. tenuis* contiene, in batch, 9 mg g^{-1} di clorofilla a e $0,7 \text{ mg g}^{-1}$ di carotenoidi (Jaiswal, Koli, et al., 2018). Velu et al. (2015) hanno misurato una quantità di clorofilla simile in *T. tenuis* (9 mg g^{-1}).

CONCLUSIONI

Lo scopo del presente lavoro di tesi sperimentale è quello di verificare il possibile sfruttamento dell'adattamento cromatico complementare (CCA di tipo 3) di *Tolypothrix tenuis* per ottimizzare l'efficienza di conversione energetica in PBRs illuminati con luce LED, coltivandolo in consorzio con la microalga verde *Scenedesmus obliquus*. In una fase preliminare è stata studiata in batch la crescita del cianobatterio a diverse lunghezze d'onda (bianco, arancione e rosso) ad un'intensità di $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, osservando la massima velocità di crescita in luce rossa ($0,65 \pm 0,05 \text{ d}^{-1}$). All'intensità di luce usata il cianobatterio non mostra fenomeni di foto-saturazione e sfrutta l'espressione di PE per massimizzare la crescita. Successivamente il consorzio *T. tenuis* – *S. obliquus* è stato studiato in continuo, dapprima analizzando l'effetto di intensità di luce bassa a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ed alta $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Sono state misurate la concentrazione e la produttività volumetrica di biomassa e l'efficienza fotosintetica nel consorzio e nelle monoculture a stato stazionario. I valori più elevati di concentrazione ($1,10 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$) e di produttività ($1,29 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$) sono stati raggiunti a $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Tuttavia, l'efficienza fotosintetica è risultata maggiore a $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($13,89 \pm 0,10 \%$) confermando che quando si lavora con luce artificiale sia preferibile mantenere bassa l'intensità se si vuole aumentare la conversione energetica. A questa intensità è stato dunque misurato l'effetto della lunghezza d'onda (bianco, arancione, rosso e lime) sulla crescita in continuo, ottenendo risultati promettenti per un possibile scale-up industriale. Nel consorzio, infatti, è stata misurata una concentrazione e produttività di biomassa significativamente maggiore rispetto alle monoculture, evidenziando un effetto sinergico fra le due specie. L'efficienza fotosintetica è risultata anch'essa molto alta e vicina al massimo teorico (30% del PAR in luce rossa) utilizzando il LED rosso ($28,88 \pm 1,34 \%$) nella condizione migliore ($\tau = 0,85 \text{ d}$, $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ in luce rossa), suggerendo un ottimo utilizzo da parte del consorzio della luce incidente grazie al meccanismo di CCA. Questo risultato è dovuto al fatto che, mentre in monocultura non sono in grado di raggiungere il massimo teorico, le due specie in consorzio riescono a sfruttare lunghezze d'onda complementari, aumentando lo spettro di assorbimento. Il consorzio così ottimizzato è risultato interessante per un possibile sfruttamento

industriale raggiungendo una produttività areale di $38,5 \pm 2,88 \text{ g m}^{-2}\text{d}^{-1}$, comparabile a quella raggiunta attualmente in diversi PBRs illuminati artificialmente, ed arrivando a convertire in biomassa il $21,96 \pm 1,64 \%$ dell'energia elettrica fornita, percentuale superiore rispetto ai sistemi di illuminazione tradizionale. Infine, utilizzando un approccio di *biorefinery* è stata proposta una possibile applicazione della biomassa del consorzio per la produzione di PBPs, composti di grande interesse commerciale, e biostimolanti per l'agricoltura. La produttività di PBPs si attesta a valori compresi tra $13,14 \pm 1,90$ e $21,17 \pm 4,01 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$, paragonabili a quanto trovato in specie commercialmente note come *A. platensis*. La biomassa rimanente dopo estrazione delle PBPs ha mostrato una debole attività auxino-simile in semi di *C. sativus* trattati con concentrazioni di $0,8 \text{ g L}^{-1}$ ed 1.5 g L^{-1} di biomassa.

I risultati ottenuti in questo lavoro sperimentale mirano a proporre un utilizzo razionale delle risorse energetiche per la produzione di biomassa microalgale ed il suo impiego per la produzione di diversi prodotti, in un processo a zero scarto. I dati ottenuti suggeriscono che è possibile aumentare l'efficienza di conversione energetica in PBRs attraverso l'impiego di diverse strategie. L'adattamento cromatico di *T. tenuis* permette di instaurare una coesistenza sinergica con *S. obliquus* e ciò si riflette in un miglior sfruttamento del PAR incidente. Inoltre, l'uso di LED monocromatici permette contestualmente di massimizzare l'efficienza di conversione energetica, grazie alla alta efficienza e alla presenza di sole lunghezze d'onda assorbite dalle microalghe, riducendo i costi di illuminazione e in generale i costi di produzione della biomassa, aspetto che attualmente limita l'applicazione in larga scala dei PBRs. Si è dimostrato in via preliminare, inoltre, che per mitigare i costi d'illuminazione è possibile sfruttare un approccio di *biorefinery*, estraendo prodotti ad alto valore aggiunto e sfruttando la biomassa rimanente come biostimolante di interesse agricolo.

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Razek, M. A., Abozeid, A. M., Eltholth, M. M., Abouelenien, F. A., El-Midany, S. A., Moustafa, N. Y., & Mohamed, R. A. (2019). Bioremediation of a pesticide and selected heavy metals in wastewater from various sources using a consortium of microalgae and cyanobacteria. *Slovenian Veterinary Research*, *56*(May), 61–73. doi: 10.26873/SVR-744-2019
- Adir, N., Bar-Zvi, S., & Harris, D. (2020). The amazing phycobilisome. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1861*(4), 148047. doi: 10.1016/j.bbabi.2019.07.002
- Agostoni, M., Lucker, B. F., Smith, M. A. Y., Kanazawa, A., Blanchard, G. J., Kramer, D. M., & Montgomery, B. L. (2016). Competition-based phenotyping reveals a fitness cost for maintaining phycobilisomes under fluctuating light in the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. *Algal Research*, *15*, 110–119. doi: 10.1016/j.algal.2016.02.005
- Agwa, O., & Ogugbue, C. J. (2017). *Field Evidence of Chlorella vulgaris Potentials as a Biofertilizer for Hibiscus esculentus*. October 2018. doi: 10.3923/ijar.2017.181.189
- 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. doi: 10.1088/1757-899x/1142/1/012004
- Ailioaie, L. M., & Litscher, G. (2020). Molecular and cellular mechanisms of arthritis in children and adults: New perspectives on applied photobiomodulation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 18). doi: 10.3390/ijms21186565
- Allaf, M. M., & Peerhossaini, H. (2022). Cyanobacteria: Model Microorganisms and Beyond. *Microorganisms*, *10*(4). doi: 10.3390/microorganisms10040696

- Álvarez-González, A., Uggetti, E., Serrano, L., Gorchs, G., Ferrer, I., & Díez-Montero, R. (2022). Can microalgae grown in wastewater reduce the use of inorganic fertilizers? *Journal of Environmental Management*, 323(May), 116224. doi: 10.1016/j.jenvman.2022.116224
- Ansari, F. A., Ravindran, B., Gupta, S. K., Nasr, M., Rawat, I., & Bux, F. (2019). Techno-economic estimation of wastewater phycoremediation and environmental benefits using *Scenedesmus obliquus* microalgae. *Journal of Environmental Management*, 240(April), 293–302. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.03.123
- Ansari, F. A., Singh, P., Guldhe, A., & Bux, F. (2017). Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: Integrated biomass generation and nutrient remediation. *Algal Research*, 21, 169–177. doi: 10.1016/j.algal.2016.11.015
- Arsad, S., Lusiana, E., Risjani, Y., & Musa, M. (2022). *Microalgae diversity in several different sub-habitats*. *March*. doi: 10.22034/gjesm.2022.04.
- Aslam, A., Thomas-Hall, S. R., Mughal, T., Zaman, Q. uz, Ehsan, N., Javied, S., & Schenk, P. M. (2019). Heavy metal bioremediation of coal-fired flue gas using microalgae under different CO₂ concentrations. *Journal of Environmental Management*, 241(October 2018), 243–250. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.03.118
- Baidya, A., Akter, T., Islam, M. R., Shah, A. K. M. A., Hossain, M. A., Salam, M. A., & Paul, S. I. (2021). Effect of different wavelengths of LED light on the growth, chlorophyll, β -carotene content and proximate composition of *Chlorella ellipsoidea*. *Heliyon*, 7(12), e08525. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08525
- Baouchi, A. El, Bendaou, N., & Abdelaziz, S. (2016). *Halophilic microalgae Dunaliella salina extracts improve seed germination and seedling growth of Triticum aestivum L. under salt stress*. *November*. doi: 10.17660/ActaHortic.2016.1148.2
- Barros de Medeiros, V. P., da Costa, W. K. A., da Silva, R. T., Pimentel, T. C., &

- Magnani, M. (2022). Microalgae as source of functional ingredients in new-generation foods: challenges, technological effects, biological activity, and regulatory issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(18), 4929–4950. doi: 10.1080/10408398.2021.1879729
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2014). *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2018). Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? *Algal Research*, 31(February), 107–115. doi: 10.1016/j.algal.2018.02.001
- Bature, A., Melville, L., Rahman, K. M., & Aulak, P. (2022). Microalgae as feed ingredients and a potential source of competitive advantage in livestock production: A review. *Livestock Science*, 259(March 2021), 104907. doi: 10.1016/j.livsci.2022.104907
- Baudelet, P. H., Ricochon, G., Linder, M., & Muniglia, L. (2017). A new insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Research*, 25(April), 333–371. doi: 10.1016/j.algal.2017.04.008
- Bell, J. C., Bound, S. A., & Buntain, M. (2022). Biostimulants in Agricultural and Horticultural Production. In *Horticultural Reviews* (Vol. 49). doi: 10.1002/9781119851981.ch2
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*, 58(2), 419–435. doi: 10.1083/jcb.58.2.419
- Bergandi, L., Apprato, G., & Silvagno, F. (2022). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Combined Phycocyanin and Palmitoylethanolamide in Human Lung and Prostate Epithelial Cells. *Antioxidants*, 11(2). doi: 10.3390/antiox11020201
- Bezy, R. P., Wiltbank, L., & Kehoe, D. M. (2011). Light-dependent attenuation of phycoerythrin gene expression reveals convergent evolution of green light

sensing in cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(45), 18542–18547. doi: 10.1073/pnas.1107427108

Bhatnagar, M., Parwani, L., Sharma, V., Ganguly, J., & Bhatnagar, A. (2014). Exopolymers from *Tolypothrix tenuis* and three *Anabaena* sp. (Cyanobacteriaceae) as novel blood clotting agents for wound management. *Carbohydrate Polymers*, 99, 692–699. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.09.005

Borella, L., Sforza, E., & Bertucco, A. (2021). Effect of residence time in continuous photobioreactor on mass and energy balance of microalgal protein production. *New Biotechnology*, 64(June), 46–53. doi: 10.1016/j.nbt.2021.05.006

Borella, L., Sforza, E., & Bertucco, A. (2022). An internally LED illuminated photobioreactor to increase energy conversion efficiency: Design and operation. *Energy Conversion and Management*, 270(September), 116224. doi: 10.1016/j.enconman.2022.116224

Brindhadevi, K., Mathimani, T., Rene, E. R., Shanmugam, S., Chi, N. T. L., & Pugazhendhi, A. (2021). Impact of cultivation conditions on the biomass and lipid in microalgae with an emphasis on biodiesel. *Fuel*, 284(October 2020), 119058. doi: 10.1016/j.fuel.2020.119058

Brown, P., & Saa, S. (2015). *Biostimulants in agriculture*. 6(August), 27–29. doi: 10.1111/mec.12571

Burns Woodward, R., Ayer, W. A., Beaton, J. M., Bonnet, R., Bickelhaupt, F., Buchschacher, P., Closs, G. L., Dutler, H., Hannah, J., Hauck, F. P., Ito, S. H. Y., Langemann, A., Le Goff, E., Leimgruber, W., & Lwowsky, W. (1990). The total synthesis of Chlorophyll a. *Journal of the American Chemical Society*, 112(18), 7599–7659.

Campbell, D. (1996). *Complementary chromatic adaptation alters photosynthetic strategies in the cyanobacterium *Calothrix**. 1996, 1255–1263.

Carvalho, A. P., Silva, S. O., Baptista, J. M., & Malcata, F. X. (2011). Light

requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1275–1288. doi: 10.1007/s00253-010-3047-8

Catherine, Q., Susanna, W., Isidora, E. S., Mark, H., Aurélie, V., & Jean-François, H. (2013). A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria - Ecology, toxin production and risk management. *Water Research*, 47(15), 5464–5479. doi: 10.1016/j.watres.2013.06.042

Chanda, M.-J., Merghoub, N., & El Arroussi, H. (2019). Microalgae polysaccharides: the new sustainable bioactive products for the development of plant bio-stimulants? *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 35(11), 177. doi: 10.1007/s11274-019-2745-3

Chaubey, M. G., Patel, S. N., Rastogi, R. P., Srivastava, P. L., Singh, A. K., Madamwar, D., & Singh, N. K. (2019). Therapeutic potential of cyanobacterial pigment protein phycoerythrin: in silico and in vitro study of BACE1 interaction and in vivo A β reduction. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 368–378. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.006

Chen, H.-B., Wu, J.-Y., Wang, C.-F., Fu, C.-C., Shieh, C.-J., Chen, C.-I., Wang, C.-Y., & Liu, Y.-C. (2010). Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. *Biochemical Engineering Journal*, 53(1), 52–56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.09.004>

Chen, H., Qi, H., & Xiong, P. (2022). Phycobiliproteins—A Family of Algae-Derived Biliproteins: Productions, Characterization and Pharmaceutical Potentials. *Marine Drugs*, 20(7), 1–21. doi: 10.3390/md20070450

Chen, M., Li, J., Dai, X., Sun, Y., & Chen, F. (2011). Effect of phosphorus and temperature on chlorophyll a contents and cell sizes of *Scenedesmus obliquus* and *Microcystis aeruginosa*. *Limnology*, 12(2), 187–192. doi: 10.1007/s10201-010-0336-y

Chen, X., Li, Z., He, N., Zheng, Y., Li, H., Wang, H., Wang, Y., Lu, Y., Li, Q., &

- Peng, Y. (2018). Nitrogen and phosphorus removal from anaerobically digested wastewater by microalgae cultured in a novel membrane photobioreactor. *Biotechnology for Biofuels*, *11*(1), 1–11. doi: 10.1186/s13068-018-1190-0
- Chenu, A., Keren, N., Paltiel, Y., Nevo, R., Reich, Z., & Cao, J. (2017). Light Adaptation in Phycobilisome Antennas: Influence on the Rod Length and Structural Arrangement. *Journal of Physical Chemistry B*, *121*(39), 9196–9202. doi: 10.1021/acs.jpcc.7b07781
- Chini Zittelli, G., Mugnai, G., Milia, M., Cicchi, B., Silva Benavides, A. M., Angioni, A., Addis, P., & Torzillo, G. (2022). Effects of blue, orange and white lights on growth, chlorophyll fluorescence, and phycocyanin production of *Arthrospira platensis* cultures. *Algal Research*, *61*(November 2021), 102583. doi: 10.1016/j.algal.2021.102583
- Clippinger, J., & Davis, R. (2019). Techno-Economic Analysis for the Production of Algal Biomass via Closed Photobioreactors: Future Cost Potential Evaluated Across a Range of Cultivation System Designs. *National Renewable Energy Laboratory*, *September*, 42. Retrieved from <https://www.osti.gov/servlets/purl/1566806/>
- Cobley, J. G., Clark, A. C., Weerasurya, S., Queseda, F. A., Xiao, J. Y., Bandrapali, N., D'Silva, I., Thounaojam, M., Oda, J. F., Sumiyoshi, T., & Chu, M.-H. (2002). CpeR is an activator required for expression of the phycoerythrin operon (cpeBA) in the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* and is encoded in the phycoerythrin linker-polypeptide operon (cpeCDEST). *Molecular Microbiology*, *44*(6), 1517–1531. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02966.x
- Colla, G., Hoagland, L., Ruzzi, M., Cardarelli, M., Bonini, P., Canaguier, R., & Rouphael, Y. (2017). *Biostimulant Action of Protein Hydrolysates : Unraveling Their Effects on Plant Physiology and Microbiome*. *8*(December), 1–14. doi: 10.3389/fpls.2017.02202
- Colla, G., & Rouphael, Y. (2020). Microalgae: New Source of Plant Biostimulants.

Agronomy, 10(9), 1–4. doi: 10.3390/agronomy10091240

Conley, D. J., Paerl, H. W., Howarth, R. W., Boesch, D. F., Seitzinger, S. P., Havens, K. E., Lancelot, C., & Likens, G. E. (2009). Ecology - Controlling eutrophication: Nitrogen and phosphorus. *Science*, 323(5917), 1014–1015. doi: 10.1126/science.1167755

Córdoba-Castro, N. M., Montenegro-Jaramillo, A. M., Prieto, R. E., & González-Mariño, G. E. (2012). Analysis of the effect of the interactions among three processing variables for the production of exopolysaccharides in the microalgae *Scenedesmus obliquus* (UTEX 393). *Vitae*, 19(1), 60–69.

Cormaci, M., Furnari, G., & Alongi, G. (2014). Flora marina bentonica del Mediterraneo: Chlorophyta. *Bulletin of the Gioenian Academy of Natural Sciences*, 47, 11–436.

Cornet, J. F., Dussap, C. G., Cluzel, P., & Dubertret, G. (1992). A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(7), 826–834. doi: 10.1002/bit.260400710

Coward, T., Fuentes-Grünwald, C., Silkina, A., Oatley-Radcliffe, D. L., Llewellyn, G., & Lovitt, R. W. (2016). Utilising light-emitting diodes of specific narrow wavelengths for the optimization and co-production of multiple high-value compounds in *Porphyridium purpureum*. *Bioresource Technology*, 221, 607–615. doi: 10.1016/j.biortech.2016.09.093

D'Alessandro, E. B., & Antoniosi, N. R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 832–841. doi: 10.1016/j.rser.2015.12.162

Dagnino-Leone, J., Figueroa, C. P., Castañeda, M. L., Youlton, A. D., Vallejos-Almirall, A., Agurto-Muñoz, A., Pavón Pérez, J., & Agurto-Muñoz, C. (2022). Phycobiliproteins: Structural aspects, functional characteristics, and biotechnological perspectives. *Computational and Structural Biotechnology*

Journal, 20, 1506–1527. doi: 10.1016/j.csbj.2022.02.016

- Dange, P., Gawas, S., Pandit, S., Mekuto, L., Gupta, P. K., Shanmugam, P., Patil, R., & Banerjee, S. (2022). *Chapter 7 - Trends in photobioreactor technology for microalgal biomass production along with wastewater treatment: Bottlenecks and breakthroughs*. 135–154.
- Das, P. K., Rani, J., Rawat, S., & Kumar, S. (2022). *Microalgal Co-cultivation for Biofuel Production and Bioremediation : Current Status and Benefits*. 1–26.
- De Caire, G. Z., De Cano, M. S., Palma, R. M., & De Mulé, C. Z. (2000). Short communication: Changes in soil enzyme activities following additions of cyanobacterial biomass and exopolysaccharide. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(13), 1985–1987. doi: 10.1016/S0038-0717(00)00174-7
- de Cano, M. M. S., de Caire, G. Z., de Mulé, M. C. Z., & Palma, R. M. (2002). EFFECT OF TOLYPOTHRIX TENUIS AND MICROCHAETE TENERA ON BIOCHEMICAL SOIL PROPERTIES AND MAIZE GROWTH. *Journal of Plant Nutrition*, 25(11), 2421–2431. doi: 10.1081/PLN-120014704
- Deng, G., Liu, F., Liu, X., & Zhao, J. (2012). Significant energy transfer from CpcG2-phycolisomes to photosystem I in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 in the absence of ApcD-dependent state transitions. *FEBS Letters*, 586(16), 2342–2345. doi: 10.1016/j.febslet.2012.05.038
- Dineshkumar, R., Subramanian, J., Gopalsamy, J., Jayasingam, P., Arumugam, A., Kannadasan, S., & Sampathkumar, P. (2019). The Impact of Using Microalgae as Biofertilizer in Maize (*Zea mays* L.). *Waste and Biomass Valorization*, 10(5), 1101–1110. doi: 10.1007/s12649-017-0123-7
- Do, T. C. Van, Tran, D. T., Le, T. G., & Nguyen, Q. T. (2020). Characterization of Endogenous Auxins and Gibberellins Produced by *Chlorella sorokiniana* TH01 under Phototrophic and Mixotrophic Cultivation Modes toward Applications in Microalgal Biorefinery and Crop Research. *Journal of Chemistry*, 2020, 4910621. doi: 10.1155/2020/4910621

- Drobek, M., Fraç, M., & Cybulska, J. (2019). Plant Biostimulants: Importance of the Quality and Yield of Horticultural Crops and the Improvement of Plant Tolerance to Abiotic Stress—A Review. *Agronomy*, 9(6). doi: 10.3390/agronomy9060335
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1951). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 168(4265), 167. doi: 10.1038/168167a0
- Dutta Gupta, S. (2017). Light emitting diodes for agriculture: Smart lighting. In *Light Emitting Diodes for Agriculture: Smart Lighting* (Issue October). doi: 10.1007/978-981-10-5807-3
- Edge, R., Mcgarvey, D. J., & Truscott, T. G. (1997). The carotenoids as anti-oxidants - a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 41, 189–200.
- Eurostat. (2022). *No Title*. Statistics Explained. Retrieved from <https://ec.europa.eu/>
- Fais, G., Manca, A., Bolognesi, F., Borselli, M., Concas, A., Busutti, M., Broggi, G., Sanna, P., Castillo-Aleman, Y. M., Rivero-Jiménez, R. A., Bencomo-Hernandez, A. A., Ventura-Carmenate, Y., Altea, M., Pantaleo, A., Gabrielli, G., Biglioli, F., Cao, G., & Giannaccare, G. (2022). Wide Range Applications of Spirulina: From Earth to Space Missions. *Marine Drugs*, 20(5). doi: 10.3390/md20050299
- FAO. (2019). *World fertilizer trends and outlook to 2022*. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>
- Feed, F., & Materials, B. C. (2007). IEA Bioenergy 29th update. *Biomass and Bioenergy*, 31(8), I–VII. doi: 10.1016/s0961-9534(07)00106-7

- Ferreira, A., Melkonyan, L., Carapinha, S., Ribeiro, B., Figueiredo, D., Avetisova, G., & Gouveia, L. (2021). Biostimulant and biopesticide potential of microalgae growing in piggery wastewater. *Environmental Advances*, 4, 100062. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100062>
- Figuroa-Torres, G. M., Pittman, J. K., & Theodoropoulos, C. (2022). A highly productive mixotrophic fed-batch strategy for enhanced microalgal cultivation. *Sustainable Energy and Fuels*, 6(11), 2771–2782. doi: [10.1039/d2se00124a](https://doi.org/10.1039/d2se00124a)
- Fu, W., Gudmundsson, S., Wichuk, K., Palsson, S., Palsson, B. O., Salehi-Ashtiani, K., & Brynjólfsson, S. (2019). Sugar-stimulated CO₂ sequestration by the green microalga *Chlorella vulgaris*. *Science of the Total Environment*, 654, 275–283. doi: [10.1016/j.scitotenv.2018.11.120](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.120)
- Gaigbe-Togbe, V., Bassarsky, L., Gu, D., Spoorenberg, T., & Zeifman, L. (2022). *World Population Prospects 2022*. Retrieved from https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/wpp2022_summary_of_results.pdf
- Garcia-Pliego, E., Franco-Colin, M., Rojas-Franco, P., Blas-Valdivia, V., Serrano-Contreras, J. I., Pentón-Rol, G., & Cano-Europa, E. (2021). Phycocyanobilin is the molecule responsible for the nephroprotective action of phycocyanin in acute kidney injury caused by mercury. *Food Funct.*, 12(7), 2985–2994. doi: [10.1039/D0FO03294H](https://doi.org/10.1039/D0FO03294H)
- Gauthier, M. R., Senhorinho, G. N. A., & Scott, J. A. (2020). Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. *Algal Research*, 52(October), 102104. doi: [10.1016/j.algal.2020.102104](https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102104)
- Geider, R. J., & La Roche, J. (2002). Redfield revisited: Variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*, 37(1), 1–17. doi: [10.1017/S0967026201003456](https://doi.org/10.1017/S0967026201003456)
- Goldman, J. C., McCarthy, J. J., & Peavey, D. G. (1979). Growth rate influence on the chemical composition of phytoplankton in oceanic waters. *Nature*,

279(5710), 210–215. doi: 10.1038/279210a0

González-Pérez, B. K., Rivas-Castillo, A. M., Valdez-Calderón, A., & Gayosso-Morales, M. A. (2022). Microalgae as biostimulants: a new approach in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *38*(1), 1–12. doi: 10.1007/s11274-021-03192-2

Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G., & Collier, J. L. (1993). Environmental effects on the light-harvesting complex of cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, *175*(3), 575–582. doi: 10.1128/jb.175.3.575-582.1993

Guiry, M. D. (2012). How many species of algae are there? *Journal of Phycology*, *48*(5), 1057–1063. doi: 10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x

Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2022). *AlgaeBase*. World-Wide Electronic Publication.

Guo, W., Zeng, M., Zhu, S., Li, S., Qian, Y., & Wu, H. (2022). Phycocyanin ameliorates mouse colitis via phycocyanobilin-dependent antioxidant and anti-inflammatory protection of the intestinal epithelial barrier. *Food Funct.*, *13*(6), 3294–3307. doi: 10.1039/D1FO02970C

Habibi, G., & Sibi, G. (2019). Light Emitting Diode (LED) Illumination For Enhanced Growth And Cellular Composition In Three Microalgae. *Advances in Microbiology Research*, *3*(1), 1–6. doi: 10.24966/amr-694x/100007

Han, P., Shen, S., Wang, H.-Y., Sun, Y., Dai, Y., & Jia, S. (2015). Comparative metabolomic analysis of the effects of light quality on polysaccharide production of cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. *Algal Research*, *9*, 143–150. doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.02.019>

Harun, R., Danquah, M. K., & Forde, G. M. (2010). Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *85*(2), 199–203. doi: <https://doi.org/10.1002/jctb.2287>

- Hirose, Y., Narikawa, R., Katayama, M., & Ikeuchi, M. (2010). *Cyanobacteriochrome CcaS regulates phycoerythrin accumulation in Nostoc punctiforme*, a group II chromatic adapter. *PNAS*, 107(19). doi: 10.1073/pnas.1000177107
- Hopes, A., & Mock, T. (2015). *Evolution of Microalgae and Their Adaptations in Different Marine. October*. doi: 10.1002/9780470015902.a0023744
- Huisman, J., & Weissing, F. (1994). Light-Limited Growth and Competition for Light in Well-Mixed Aquatic Environments: An Elementary Model. *Ecological Society of America*, 75(2), 507–520.
- Hutchinson, G. E., Naturalist, T. A., & Jun, N. M. (2007). *The Paradox of the Plankton*. *PNAS*, 95(882), 137–145.
- Inthorn, D., Nagase, H., Isaji, Y., Hirata, K., & Miyamoto, K. (1996). Removal of cadmium from aqueous solution by the filamentous cyanobacterium *Tolypothrix tenuis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(6), 580–584. doi: 10.1016/S0922-338X(97)81256-1
- IPCC. (2022). *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability*. doi: 10.1017/9781009325844
- Ivleva, N. B., & Golden, S. S. (2007). Protein extraction, fractionation, and purification from cyanobacteria. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 362, 365–373. doi: 10.1007/978-1-59745-257-1_26
- Jaiswal, A., Das, K., Koli, D. K., & Pabbi, S. (2018). Characterization of cyanobacteria for IAA and siderophore production and their effect on rice seed germination. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 5(7), 212-222. Retrieved from <http://www.ijcmas.com>
- Jaiswal, A., Koli, D. K., Kumar, A., Kumar, S., & Sagar, S. (2018). Pigments analysis of cyanobacterial strains. ~ 1248 ~ *International Journal of Chemical Studies*, 6(2), 1248–1251. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/643a/d4902c154a345a95e766d71ccca490aa>

6645.pdf

- Jerney, J., & Spilling, K. (2018). *Large Scale Cultivation of Microalgae : Open and Closed Systems*. doi: 10.1007/7651
- Ji, H., Liu, G., Han, J., Zhu, F., Dong, X., & Li, B. (2020). C-phycoyanin inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in Caski cells. *Cancer Cell International*, 20(1), 1–11. doi: 10.1186/s12935-020-01384-8
- Jin, C., Yu, B., Qian, S., Liu, Q., & Zhou, X. (2021). Impact of combined monochromatic light on the biocomponent productivity of *Dunaliella salina*. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 13(2). doi: 10.1063/5.0041330
- Jin, J., Dupré, C., Legrand, J., & Grizeau, D. (2016). Extracellular hydrocarbon and intracellular lipid accumulation are related to nutrient-sufficient conditions in pH-controlled chemostat cultures of the microalga *Botryococcus braunii* SAG 30.81. *Algal Research*, 17, 244–252. doi: 10.1016/j.algal.2016.05.007
- Kandasamy, S., Zhang, B., He, Z., Bhuvanendran, N., El-seesy, A. I., Wang, Q., Narayanan, M., Thangavel, P., & Dar, M. A. (2022). Microalgae as a multipotential role in commercial applications : Current scenario and future perspectives. *Fuel*, 308(March 2021), 122053. doi: 10.1016/j.fuel.2021.122053
- Kannaujiya, V. K., Kumar, D., Singh, V., & Sinha, R. P. (2021). Advances in phycobiliproteins research: innovations and commercialization. In *Natural Bioactive Compounds*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-12-820655-3.00004-5
- Kannaujiya, V. K., Sundaram, S., & Sinha, R. P. (2017). Advances and Strategies of Purification Technology. In *Phycobiliproteins: Recent Developments and Future Applications* (pp. 99–120). Singapore: Springer Singapore. doi: 10.1007/978-981-10-6460-9_7
- Kapoor, S., Singh, M., Srivastava, A., Chavali, M., Chandrasekhar, K., & Verma, P. (2022). Extraction and characterization of microalgae-derived phenolics for

- pharmaceutical applications: A systematic review. *Journal of Basic Microbiology*, 62(9), 1044–1063. doi: 10.1002/jobm.202100458
- Kapooore, R. V., Wood, E. E., & Llewellyn, C. A. (2021). Algae biostimulants : A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. *Biotechnology Advances*, 49(October 2020), 107754. doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107754
- Kehoe, D. M., & Gutu, A. (2006). Responding to color: The regulation of complementary chromatic adaptation. *Annual Review of Plant Biology*, 57(February), 127–150. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105215
- Khan, S., Naushad, M., Iqbal, J., Bathula, C., & Sharma, G. (2022). Production and harvesting of microalgae and an efficient operational approach to biofuel production for a sustainable environment. *Fuel*, 311(September 2021), 122543. doi: 10.1016/j.fuel.2021.122543
- Kiang, N. Y., Siefert, J., & Blankenship, R. E. (2007). Review of Earth Organisms. *Astrobiology*, 7(1). doi: 10.1089/ast.2006.0105
- Koifman, O. I., Stuzhin, P. A., Travkin, V. V., & Pakhomov, G. L. (2021). Chlorophylls in thin-film photovoltaic cells, a critical review. *RSC Advances*, 11(25), 15131–15152. doi: 10.1039/d1ra01508g
- Kondo, K., Geng, X. X., Katayama, M., & Ikeuchi, M. (2005). Distinct roles of CpcG1 and CpcG2 in phycobilisome assembly in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynthesis Research*, 84(1–3), 269–273. doi: 10.1007/s11120-004-7762-9
- Kothari, R., Pandey, A., Ahmad, S., Kumar, A., Pathak, V. V., & Tyagi, V. V. (2017). Microalgal cultivation for value-added products: a critical environmental assessment. *3 Biotech*, 7(4), 1–15. doi: 10.1007/s13205-017-0812-8
- Kruid, S., Macedo, M. N., Gorelik, S. R., Walker, W., Moutinho, P., Brando, P. M., Castanho, A., Alencar, A., Baccini, A., & Coe, M. T. (2021). Beyond

Deforestation: Carbon Emissions From Land Grabbing and Forest Degradation in the Brazilian Amazon. *Frontiers in Forests and Global Change*, 4(July). doi: 10.3389/ffgc.2021.645282

Kumar, J. I. N., Kumar, R. N., & Bhatt, I. (2008). Metabolic response and nutrient removal by *tolypothrix tenuis* (kutz.) from fertilizer industrial effluent. *Journal of Industrial Pollution Control*, 24(1), 69–74.

Kumar, Santosh, Cheng, J., Kubar, A. A., Guo, W., Song, Y., Liu, S., Chen, S., & Tian, J. (2021). Bioresource Technology Orange light spectra filtered through transparent colored polyvinyl chloride sheet enhanced pigment content and growth of *Arthrospira* cells. *Bioresource Technology*, 319(August 2020), 124179. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124179

Kumar, Satish, Kumar, R., Kumari, A., & Panwar, A. (2022). Astaxanthin: A super antioxidant from microalgae and its therapeutic potential. *Journal of Basic Microbiology*, 62(9), 1064–1082. doi: 10.1002/jobm.202100391

Kumar, V., Maurya, P. K., Mondal, S., Sinha, R. P., & Singh, S. P. (2019). Chapter 6 - Photomorphogenesis in the Cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* Improves Photosynthetic Efficiency. In A. K. Mishra, D. N. Tiwari, & A. N. Rai (Eds.), *Cyanobacteria* (pp. 131–143). Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00006-4>

Kusvuran, A., & Can, A. G. (2019). *Effects of Microalga (Chlorella vulgaris Beijerinck) on Secondary Metabolites and Antioxidative Defense System Improve Plant Growth and Salt Tolerance in Guar [Cyamopsis tetragonoloba (L.) Taub.]*. doi: 10.18805/LR-492

Lafarga, Tomás, & Acién-Fernández, F. G. (2022). Microalgae for the Food Industry: From Biomass Production to the Development of Functional Foods. *Foods*, 11(5), 10–12.

Lafarga, Tomas, Fernández-Sevilla, J. M., González-López, C., & Acién-Fernández, F. G. (2020). Spirulina for the food and functional food industries. *Food Research International*, 137(May), 109356. doi:

10.1016/j.foodres.2020.109356

- Lamparter, T. (2004). Evolution of cyanobacterial and plant phytochromes. *FEBS Letters*, 573(1–3), 1–5. doi: 10.1016/j.febslet.2004.07.050
- Latsos, C., van Houcke, J., Blommaert, L., Verbeeke, G. P., Kromkamp, J., & Timmermans, K. R. (2021). Effect of light quality and quantity on productivity and phycoerythrin concentration in the cryptophyte *Rhodomonas* sp. *Journal of Applied Phycology*, 33(2), 729–741. doi: 10.1007/s10811-020-02338-3
- Lee, S.-H., Ahn, C.-Y., Jo, B.-H., Lee, S.-A., Park, J.-Y., An, K.-G., & Oh, H.-M. (2013). Increased microalgae growth and nutrient removal using balanced N:P ratio in wastewater. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(1), 92–98. doi: 10.4014/jmb.1210.10033
- Li, B., Gao, M.-H., Zhang, X.-C., & Chu, X.-M. (2006). Molecular immune mechanism of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 43(3), 155–164. doi: <https://doi.org/10.1042/BA20050142>
- Ligrone, R. (2019). Chapter 5 - The Great Oxygenation Event. In *Biological Innovation that Built the World* (pp. 129–152).
- Liotenberg, S., Campbell, D., Rippka, R., Houmard, J., & Tandeau De Marsac, N. (1996). Effect of the nitrogen source on phycobiliprotein synthesis and cell reserves in a chromatically adapting filamentous cyanobacterium. *Microbiology*, 142(3), 611–622. doi: 10.1099/13500872-142-3-611
- Liu, Yang, Lv, J., Feng, J., Liu, Q., Nan, F., & Xie, S. (2019). Treatment of real aquaculture wastewater from a fishery utilizing phytoremediation with microalgae. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 94(3), 900–910. doi: 10.1002/jctb.5837
- Liu, Yufeng, Xu, L., Cheng, N., Lin, L., & Zhang, C. (2000). Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells. *Journal of Applied Phycology*, 12(2), 125–130. doi:

10.1023/A:1008132210772

- Llamas, B., Suárez-Rodríguez, M. C., González-López, C. V., Mora, P., & Acién, F. G. (2021). Techno-economic analysis of microalgae related processes for CO₂ bio-fixation. *Algal Research*, 57(December 2020). doi: 10.1016/j.algal.2021.102339
- Lutzu, G. A., Ciurli, A., Chiellini, C., Di Caprio, F., Concas, A., & Dunford, N. T. (2021). Latest developments in wastewater treatment and biopolymer production by microalgae. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 104926. doi: 10.1016/j.jece.2020.104926
- Ma, J., Hu, J., Sha, X., Meng, D., & Yang, R. (2022). Phycobiliproteins, the pigment-protein complex form of natural food colorants and bioactive ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–19. doi: 10.1080/10408398.2022.2128714
- Malik, S., Kishore, S., Bora, J., Chaudhary, V., Kumari, A., Kumari, P., Kumar, L., & Bhardwaj, A. (2022). A Comprehensive Review on Microalgae-Based Biorefinery as Two-Way Source of Wastewater Treatment and Bioresource Recovery. *Clean - Soil, Air, Water*, 2200044, 1–14. doi: 10.1002/clen.202200044
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2021). Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition. *Biology*, 10(10), 1–24. doi: 10.3390/biology10101060
- Markou, G., Diamantis, A., Korozi, E., Tsagou, V., Kefalogianni, I., & Chatzipavlidis, I. (2021). Effects of monochromatic illumination with leds lights on the growth and photosynthetic performance of auxenochlorella protothecoides in photo-and mixotrophic conditions. *Plants*, 10(4). doi: 10.3390/plants10040799
- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in Microalgae. In *Handbook of Microalgal Culture* (pp. 21–36). John Wiley & Sons, Ltd. doi: <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch2>

- Mattos, E. R., Singh, M., Cabrera, M. L., & Das, K. C. (2015). Enhancement of biomass production in *Scenedesmus bijuga* high-density culture using weakly absorbed green light. *Biomass and Bioenergy*, *81*, 473–478. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.07.029>
- Meijer, E. A., & Wijffels, R. H. (1998). Development of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of microalgae. In *Biotechnology Techniques* (Vol. 12, Issue 5, pp. 353–358). doi: 10.1023/A:1008814128995
- Meriluoto, J., Spoof, L., & Codd, G. (n.d.). *Section II Cyanobacteria Ecology of Cyanobacteria*.
- Metting Jr, F. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology*, *17*(March), 477–489.
- Milia, M., Corrias, F., Addis, P., Zitelli, G. C., Cicchi, B., Torzillo, G., Andreotti, V., & Angioni, A. (2022). Influence of Different Light Sources on the Biochemical Composition of *Arthrospira* spp. Grown in Model Systems. *Foods*, *11*(3), 1–13. doi: 10.3390/foods11030399
- Mishra, S., Shrivastav, A., Maurya, R., Patidar, S., Haldar, S., & Mishra, S. (2011). Effect of light quality on the C-phycoerythrin production in marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. isolated from Gujarat coast, India. *Protein Expression and Purification*, *81*, 5–10. doi: 10.1016/j.pep.2011.08.011
- Mógor, Á. F., Ördög, V., Pace, G., Lima, P., Molnár, Z., & Mógor, G. (2018). *Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines*. 453–460. doi: 10.1007/s10811-017-1242-z
- Mohammed, K., Ahammad, S. Z., Sallis, P. J., & Mota, C. R. (2014). Energy-efficient stirred-tank photobioreactors for simultaneous carbon capture and municipal wastewater treatment. *Water Science and Technology*, *69*(10), 2106–2112. doi: 10.2166/wst.2014.123
- Mohsenpour, S. F., & Willoughby, N. (2013). Luminescent photobioreactor design

for improved algal growth and photosynthetic pigment production through spectral conversion of light. *Bioresource Technology*, 142, 147–153. doi: 10.1016/j.biortech.2013.05.024

Montgomery, B. L. (2022). Reflections on Cyanobacterial Chromatic Acclimation: Exploring the Molecular Bases of Organismal Acclimation and Motivation for Rethinking the Promotion of Equity in STEM. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 86(3). doi: 10.1128/mmbr.00106-21

Moran, R., & Porath, D. (1980). Chlorophyll Determination in Intact Tissues Using N,N-Dimethylformamide. *Plant Physiology*, 65(3), 478–479. doi: 10.1104/pp.65.3.478

Mukherjee, A., & Patel, J. S. (2020). Seaweed extract: biostimulator of plant defense and plant productivity. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17(1), 553–558. doi: 10.1007/s13762-019-02442-z

Munaro, D., Nunes, A., Schmitz, C., Coelho, D. S., Oliveira, E. R., Yunes, R. A., Moura, S., & Maraschin, M. (2021). *Metabolites produced by macro- and microalgae as plant biostimulants*. doi: 10.1016/B978-0-323-91095-8.00011-8

Mutale-joan, C., Redouane, B., Najib, E., Yassine, K., Lyamlouli, K., Laila, S., Zeroual, Y., & Hicham, E. A. (2020). *Screening of microalgae liquid extracts for their bio stimulant properties on plant growth , nutrient uptake and metabolite profile of Solanum lycopersicum L .* 1–12. doi: 10.1038/s41598-020-59840-4

Mutale-Joan, C., Sbabou, L., & Hicham, E. A. (2022). Microalgae and Cyanobacteria: How Exploiting These Microbial Resources Can Address the Underlying Challenges Related to Food Sources and Sustainable Agriculture: A Review. *Journal of Plant Growth Regulation*. doi: 10.1007/s00344-021-10534-9

Nagase, H., Inthorn, D., Isaji, Y., Oda, A., Hirata, K., & Miyamoto, K. (1997). Selective cadmium removal from hard water using NaOH-treated cells of the

cyanobacterium *Tolypothrix tenuis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(2), 151–154. doi: [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)82545-7](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)82545-7)

Narala, R. R., Garg, S., Sharma, K. K., Thomas-Hall, S. R., Deme, M., Li, Y., & Schenk, P. M. (2016). Comparison of microalgae cultivation in photobioreactor, open raceway pond, and a two-stage hybrid system. *Frontiers in Energy Research*, 4(AUG), 1–10. doi: 10.3389/fenrg.2016.00029

Navarro-López, E., Ruíz-Nieto, A., Ferreira, A., Ación, F. G., & Gouveia, L. (2020). Biostimulant Potential of *Scenedesmus obliquus* Grown in Brewery Wastewater. *Molecules*, 25(3). doi: 10.3390/molecules25030664

Nicolaus, B., Panico, A., Lama, L., Romano, I., Manca, M. C., De Giulio, A., & Gambacorta, A. (1999). Chemical composition and production of exopolysaccharides from representative members of heterocystous and non-heterocystous cyanobacteria. *Phytochemistry*, 52(4), 639–647. doi: 10.1016/S0031-9422(99)00202-2

Nwoba, E. G., Parlevliet, D. A., Laird, D. W., Alameh, K., & Moheimani, N. R. (2019). Light management technologies for increasing algal photobioreactor efficiency. *Algal Research*, 39(January), 101433. doi: 10.1016/j.algal.2019.101433

Ohki, K., & Fujita, Y. (1991). Complementary Chromatic Adaptation in the Cyanobacterium, *Tolypothrix tenuis*: Location of Phycoerythrin Newly Synthesized by Green Illumination. *Plant and Cell Physiology*, 32(4), 483–488. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078105

Ojit, S. K., Indrama, T., Gunapati, O., Avijeet, S. O., Subhalaxmi, S. A., Silvia, C., Indira, D. W., Romi, K., Thadoi, D. A., Tiwari, O. N., & Sharma, G. D. (2015). The response of phycobiliproteins to light qualities in *Anabaena circinalis*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 3(03), 1–6. doi: 10.7324/jabb.2015.3301

Ortiz-moreno, M. L., Sandoval, K., & Murillo, L. S. (2019). *Chlorella*, ¿ un

potencial biofertilizante ? Chlorella , a potential biofertilizer ? Chlorella , um potencial biofertilizante ? February 2020.

- Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjjoa, A., & Vasconcelos, V. (2019). Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 37(3), 422–443. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.010
- Pagels, F., Salvaterra, D., Amaro, H. M., & Guedes, A. C. (2020). Pigments from microalgae. In *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products: Fundamentals and Advances in Energy, Food, Feed, Fertilizer, and Bioactive Compounds*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-818536-0.00018-X
- Paliwal, C., Mitra, M., Bhayani, K., Bharadwaj, S. V. V., Ghosh, T., Dubey, S., & Mishra, S. (2017). Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. *Bioresource Technology*, 244, 1216–1226. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.058>
- Pan, S., Jeevanandam, J., & Danquah, M. K. (2019). Benefits of Algal Extracts in Sustainable Agriculture. In A. Hallmann & P. H. Rampelotto (Eds.), *Grand Challenges in Algae Biotechnology* (pp. 501–534). Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-030-25233-5_14
- Paper, M., Glemser, M., Haack, M., Lorenzen, J., Mehlmer, N., Fuchs, T., Schenk, G., Garbe, D., Weuster-Botz, D., Eisenreich, W., Lakatos, M., & Brück, T. B. (2022). Efficient Green Light Acclimation of the Green Algae *Picochlorum* sp. Triggering Geranylgeranylated Chlorophylls. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 885977. doi: 10.3389/fbioe.2022.885977
- Paul, S., Bera, S., Dasgupta, R., Mondal, S., & Roy, S. (2021). Review on the recent structural advances in open and closed systems for carbon capture through algae. *Energy Nexus*, 4(September), 100032. doi: 10.1016/j.nexus.2021.100032
- Pendrill, F., Persson, U. M., Godar, J., & Kastner, T. (2019). Deforestation displaced: Trade in forest-risk commodities and the prospects for a global

forest transition. *Environmental Research Letters*, 14(5). doi: 10.1088/1748-9326/ab0d41

Pendyala, B., Patras, A., & Dash, C. (2021). Phycobilins as Potent Food Bioactive Broad-Spectrum Inhibitors Against Proteases of SARS-CoV-2 and Other Coronaviruses: A Preliminary Study. *Frontiers in Microbiology*, 12(June), 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2021.645713

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. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111852>

Pieterse, M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Wees, S. C. M. Van, & Bakker, P. A. H. M. (2014). *Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes*. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340

Plaza, B. M., Gómez-serrano, C., Ación-fernández, F. G., & Jimenez-becker, S. (2018). *Effect of microalgae hydrolysate foliar application (Arthrospira platensis and Scenedesmus sp .) on Petunia x hybrida growth*.

Porto, B., F.C.V. Silva, T., Gonçalves, A. L., Esteves, A. F., de Souza, S. M. A. G. U., de Souza, A. A. U., Pires, J. C. M., & Vilar, V. J. P. (2022). Tubular photobioreactors illuminated with LEDs to boost microalgal biomass production. *Chemical Engineering Journal*, 435(September 2021). doi: 10.1016/j.cej.2022.134747

Prabakaran, G., Sampathkumar, P., Kavisri, M., & Moovendhan, M. (2020). Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 256–263. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.009

Priyadharsini, P., Nirmala, N., Dawn, S. S., Baskaran, A., SundarRajan, P., Gopinath, K. P., & Arun, J. (2022). Genetic improvement of microalgae for

- enhanced carbon dioxide sequestration and enriched biomass productivity: Review on CO₂ bio-fixation pathways modifications. *Algal Research*, 66(April), 102810. doi: 10.1016/j.algal.2022.102810
- Qi, H., Liu, Y., Qi, X., Liang, H., Chen, H., Jiang, P., & Wang, D. (2019). Dietary Recombinant Phycoerythrin Modulates the Gut Microbiota of H22 Tumor-Bearing Mice. *Marine Drugs*, 17(12). doi: 10.3390/md17120665
- Qin, H., Chen, L., Lu, N., Zhao, Y., & Yuan, X. (2012). Toxic effects of enrofloxacin on *Scenedesmus obliquus*. *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*, 6(1), 107–116. doi: 10.1007/s11783-011-0327-1
- Querques, N., Cesta, M., Santos, M., & Wai, Y. (2015). *Microalgal phycoerythrin productivity : strategies for phyco-valorization*. May. doi: 10.1002/jctb.4796
- Rahman, K. M. (2020). Food and High Value Products from Microalgae: Market Opportunities and Challenges. In *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products* (Issue July, pp. 3–27). doi: 10.1007/978-981-15-0169-2
- Ramawat, N., & Bhardwaj, V. (2022). *Biostimulants: Exploring Sources and Applications* (N. Ramawat & Vijay Bhardwaj (eds.); 1st ed.). Springer Singapore. doi: <https://doi.org/10.1007/978-981-16-7080-0>
- Ras, M., Steyer, J. P., & Bernard, O. (2013). Temperature effect on microalgae: A crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12(2), 153–164. doi: 10.1007/s11157-013-9310-6
- Rashid, N., Ryu, A. J., Jeong, K. J., Lee, B., & Chang, Y. K. (2019). Co-cultivation of two freshwater microalgae species to improve biomass productivity and biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 196(May), 640–648. doi: 10.1016/j.enconman.2019.05.106
- Rastogi, R. P. (2021). Ecophysiology and Biochemistry of Cyanobacteria. In *Ecophysiology and Biochemistry of Cyanobacteria*. doi: 10.1007/978-981-16-4873-1

- Reddy, C. M., Bhat, V. B., Kiranmai, G., Reddy, M. N., Reddanna, P., & Madyastha, K. M. (2000). Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(3), 599–603. doi: 10.1006/bbrc.2000.3725
- Redmond, S. (2017). *Gracilaria Culture Handbook for New England Gracilaria Culture Handbook for New England*. October 2012. Retrieved from <https://opencommons.uconn.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1072%5C&context=wracklines>
- Rehman, M., Kesharvani, S., Dwivedi, G., & Gidwani Suneja, K. (2022). Impact of cultivation conditions on microalgae biomass productivity and lipid content. *Materials Today: Proceedings*, 56, 282–290. doi: 10.1016/j.matpr.2022.01.152
- Richardson, T. L. (2022). The colorful world of cryptophyte phycobiliproteins. *Journal of Plankton Research*, 1–13. doi: 10.1093/plankt/fbac048
- Rippka, R., Deruelles, J., & Waterbury, J. B. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology*, 111(1), 1–61. doi: 10.1099/00221287-111-1-1
- Rock, C. L. (1997). *Carotenoids : Biology and Treatment*. 75(3), 185–197.
- Ronga, D., Biazzi, E., Parati, K., Carminati, D., Carminati, E., & Tava, A. (2019). Microalgal Biostimulants and Biofertilisers in Crop Productions. *Agronomy*, 9(4). doi: 10.3390/agronomy9040192
- Rumin, J., Nicolau, E., Gonçalves, R., Junior, D. O., Fuentes-grünewald, C., Flynn, K. J., & Picot, L. (2020). A Bibliometric Analysis of Microalgae Research in the World , Europe , and the European Atlantic Area. *Marine Drugs*, 18(2), 1–28.
- Samir, S., El-sheekh, M., Manni, A., Ruiz, A., Elsamahy, T., Sun, J., & Schagerl, M. (2022). *Microalgae-mediated wastewater treatment for biofuels*

production : A comprehensive review. 265(February). doi: 10.1016/j.micres.2022.127187

Sánchez-Baracaldo, P. (2015). Origin of marine planktonic cyanobacteria. *Scientific Reports*, 5, 14–17. doi: 10.1038/srep17418

Sanfilippo, J. E., Garczarek, L., Partensky, F., & Kehoe, D. M. (2019). Chromatic acclimation in cyanobacteria: A diverse and widespread process for optimizing photosynthesis. *Annual Review of Microbiology*, 73, 407–433. doi: 10.1146/annurev-micro-020518-115738

Santos, E., Albuquerque, A., Lisboa, I., Murray, P., & Ermis, H. (2022). Economic Assessment of Energy Consumption in Wastewater Treatment Plants: Applicability of Alternative Nature-Based Technologies in Portugal. *Water (Switzerland)*, 14(13). doi: 10.3390/w14132042

Sathong, S., Saego, K., Kitrunloadjanaporn, P., Nuttavut, N., Amornsamankul, S., & Triampo, W. (2019). Modeling the effects of light sources on the growth of algae. *Advances in Difference Equations*, 2019(1). doi: 10.1186/s13662-019-2112-6

Schirrmeister, B. E., Gugger, M., & Donoghue, P. C. J. (2015). Cyanobacteria and the Great Oxidation Event: evidence from genes and fossils. *Paleontology*, 58(5), 769–785. doi: 10.1111/pala.12178

Schreiber, C., Schiedung, H., Harrison, L., Briese, C., Ackermann, B., Kant, J., Schrey, S. D., Hofmann, D., Singh, D., Ebenhöf, O., Amelung, W., Schurr, U., Mettler-altmann, T., Huber, G., Jablonowski, N. D., & Nedbal, L. (2018). *Evaluating potential of green alga Chlorella vulgaris to accumulate phosphorus and to fertilize nutrient-poor soil substrates for crop plants.* 2827–2836.

Schulze, P. S. C., Barreira, L. A., Pereira, H. G. C., Perales, J. A., & Varela, J. C. S. (2014). Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. *Trends in Biotechnology*, 32(8), 422–430. doi: 10.1016/j.tibtech.2014.06.001

- Seib, L. O., & Kehoe, D. M. (2002). *A Turquoise Mutant Genetically Separates Expression of Genes Encoding Phycoerythrin and Its Associated Linker Peptides*. *184*(4), 962–970. doi: 10.1128/JB.184.4.962
- Sforza, E., Gris, B., De Farias Silva, C. E., Morosinotto, T., & Bertucco, A. (2014). Effects of light on cultivation of *scenedesmus obliquus* in batch and continuous flat plate photobioreactor. *Chemical Engineering Transactions*, *38*(June), 211–216. doi: 10.3303/CET1438036
- Shaikh, R., Rizvi, A., Pandit, S., Desai, N., & Patil, R. (2022). Microalgae: Classification, bioactives, medicinal properties, industrial applications, and future prospectives. *An Integration of Phycoremediation Processes in Wastewater Treatment*, 451–486. doi: 10.1016/B978-0-12-823499-0.00004-3
- Sharmila, D., Suresh, A., Indhumathi, J., Gowtham, K., & Velmurugan, N. (2018). Impact of various color filtered LED lights on microalgae growth, pigments and lipid production. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, *6*(6), 1–7. Retrieved from www.biosciencejournals.com
- Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-tahan, Y., Dubinsky, Z., & Yehoshua, Y. (2013). *Natural Antioxidants : Function and Sources*. *2013*(June), 643–649.
- Shen, Y., Yuan, W., Pei, Z. J., Wu, Q., & Mao, E. (2009). *Microalgae mass production methods*. *52*(4), 1275–1287.
- Silva, P G, & Silva, H. J. (2007). Effect of mineral nutrients on cell growth and self-flocculation of *Tolypothrix tenuis* for the production of a biofertilizer. *Bioresource Technology*, *98*(3), 607–611. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.026>
- Silva, Patricia Gisela, & Silva, H. de J. (2013). Biomass production of *Tolypothrix tenuis* as a basic component of a cyanobacterial biofertilizer. *Journal of Applied Phycology*, *25*(6), 1729–1736. doi: 10.1007/s10811-013-0035-2
- Simkin, A. J. (2019). Genetic engineering for global food security: Photosynthesis and biofortification. *Plants*, *8*(586). doi: 10.3390/plants8120586

- Singh, P. K., Kumar, A., Yadav, M. K., Kaushalendra, & Singh, S. (2022). Chapter11 - Cyanobacteria as biostimulants in the paddy fields. In Prashant Singh, M. Fillat, & A. Kumar (Eds.), *Cyanobacterial Lifestyle and its Applications in Biotechnology* (pp. 281–306). Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90634-0.00005-6>
- Singh, Poonam, Kumari, S., Guldhe, A., Misra, R., Rawat, I., & Bux, F. (2016). Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 1–16. doi: 10.1016/j.rser.2015.11.001
- Singh, S. P., & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 431–444. doi: 10.1016/j.rser.2015.05.024
- Sirohi, R., Kumar, A., Ranganathan, P., Singh, S., Udayan, A., Kumar, M., Tuan, A., Reddy, C., Hyoun, S., & Jun, S. (2022). Bioresource Technology Design and applications of photobioreactors- a review. *Bioresource Technology*, 349(February), 126858. doi: 10.1016/j.biortech.2022.126858
- Sliney, D. H. (2016). What is light ? The visible spectrum and beyond. *Cambridge Ophthalmological Symposium*, 30(2), 222–229. doi: 10.1038/eye.2015.252
- Solmaz, A., & Işık, M. (2020). Optimization of membrane photobioreactor; the effect of hydraulic retention time on biomass production and nutrient removal by mixed microalgae culture. *Biomass and Bioenergy*, 142, 105809. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105809>
- Stanic-Vucinic, D., Minic, S., Nikolic, M. R., & Velickovic, T. C. (2018). Spirulina Phycobiliproteins as Food Components and Complements. In E. Jacob-Lopes, L. Q. Zepka, & M. I. Queiroz (Eds.), *Microalgal Biotechnology*. Rijeka: IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.73791
- Stefanski, F. S., Camargo, A. F., Scapini, T., Bonatto, C., Venturin, B., Weirich, S. N., Ulkovski, C., Carezia, C., Ulrich, A., Michelon, W., Soares, H. M., Mathiensen, A., Fongaro, G., Mossi, A. J., & Treichel, H. (2020). Potential

- Use of Biological Herbicides in a Circular Economy Context: A Sustainable Approach. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(October), 1–14. doi: 10.3389/fsufs.2020.521102
- Stirk, W. A., Ördög, V., Van Staden, J., & Jäger, K. (2002). Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 14(3), 215–221. doi: 10.1023/A:1019928425569
- Stomp, M., Huisman, J., De Jongh, F., Veraart, A. J., Gerla, D., Rijkeboer, M., Ibelings, B. W., Wollenzien, U. I. A., & Stal, L. J. (2004). Adaptive divergence in pigment composition promotes phytoplankton biodiversity. *Nature*, 432(7013), 104–107. doi: 10.1038/nature03044
- Stomp, M., van Dijk, M. A., van Overzee, H. M. J., Wortel, M. T., Sigon, C. A. M., Egas, M., Hoogveld, H., Gons, H. J., & Huisman, J. (2008). The timescale of phenotypic plasticity and its impact on competition in fluctuating environments. *The American Naturalist*, 172(5), 169–185. doi: 10.1086/591680
- Storni de Cano, M., Zaccaro, M. C., García, I., Stella, A. M., & Zulpa de Caire, G. (2003). Enhancing rice callus regeneration by extracellular products of *Tolypothrix tenuis* (Cyanobacteria). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(1), 29–34. doi: 10.1023/A:1022574107580
- Storni, M. M., Zaccaro, M. C., Capano, A., Stella, A. M., & Zulpa, G. (2007). *Tolypothrix tenuis* stress response to nickel. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 833–836. doi: 10.1007/s11274-006-9306-2
- Sunghetha, D. A., & Sharma R, D. R. (2020). Cost Effective Energy-Saving System in Parking Spots. *Journal of Electronics and Informatics*, 2(1), 18–29. doi: 10.36548/jei.2020.1.003
- Suparmaniam, U., Lam, M. K., Lim, J. W., Yusup, S., Tan, I. S., Lau, S. Y., Kodgire, P., & Kachhwaha, S. S. (2022). Influence of environmental stress on microalgae growth and lipid profile: a systematic review. *Phytochemistry Reviews*, 7. doi: 10.1007/s11101-022-09810-7

- Supraja, K. V, Behera, B., & Balasubramanian, P. (2020). Industrial Crops & Products Efficacy of microalgal extracts as biostimulants through seed treatment and foliar spray for tomato cultivation. *Industrial Crops & Products*, *151*(January), 112453. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112453
- Tan, H. T., Yusoff, F. M., Khaw, Y. S., Ahmad, S. A., & Shaharuddin, N. A. (2021). Uncovering research trends of phycobiliproteins using bibliometric approach. *Plants*, *10*(11), 1–28. doi: 10.3390/plants10112358
- Tan, J. Sen, Lee, S. Y., Chew, K. W., Lam, M. K., Lim, J. W., Ho, S. H., & Show, P. L. (2020). A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*, *11*(1), 116–129. doi: 10.1080/21655979.2020.1711626
- Tanaka, A., & Tanaka, R. (2019). Chapter Six - The biochemistry, physiology, and evolution of the chlorophyll cycle. In B. Grimm (Ed.), *Metabolism, Structure and Function of Plant Tetrapyrroles: Introduction, Microbial and Eukaryotic Chlorophyll Synthesis and Catabolism* (Vol. 90, pp. 183–212). Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.03.005>
- Tandeau De Marsac, N. (1977). Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, *130*(1), 82–91. doi: 10.1128/jb.130.1.82-91.1977
- Toribio, A. J., Suárez-Estrella, F., Jurado, M. M., López, M. J., López-González, J. A., & Moreno, J. (2020). Prospection of cyanobacteria producing bioactive substances and their application as potential phytostimulating agents. *Biotechnology Reports*, *26*. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00449
- Tredici, M. R. (2010). Photobiology of Microalgae Mass Cultures: Understanding the Tools for the Next Green Revolution. *Biofuels*, *1*(1), 143–162.
- Ubando, A. T., Anderson S. Ng, E., Chen, W. H., Culaba, A. B., & Kwon, E. E. (2022). Life cycle assessment of microalgal biorefinery: A state-of-the-art review. *Bioresour. Technol.*, *360*(April), 127615. doi: 10.1016/j.biortech.2022.127615

- Udayan, A., Sirohi, R., Sreekumar, N., Sang, B. I., & Sim, S. J. (2022). Mass cultivation and harvesting of microalgal biomass: Current trends and future perspectives. *Bioresource Technology*, 344(PB), 126406. doi: 10.1016/j.biortech.2021.126406
- UE. (2021). Revision of the Energy Taxation Directive: Fit for 55 package. In European Parliament (Issue July). Retrieved from [https://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document/EPRS_BRI\(2022\)698883](https://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document/EPRS_BRI(2022)698883)
- Ukai, Y., Fujita, Y., Morimura, Y., & Watanabe, A. (1958). STUDIES ON GROWTH OF BLUE GREEN ALGA TOLYPOTHRIX TENUIS. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 4(3), 163–169.
- van der Voort, M., Vulsteke, E., Vulsteke, E., & Visser, C. L. M. de. (2015). Report WP2A7.02: Macro-economics of algae products. *Public Output Report of the EnAlgae Project*, 47. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/282333133_Macro-economics_of_algae_products
- Vecchi, V., Barera, S., Bassi, R., & Dall’osto, L. (2020). Potential and challenges of improving photosynthesis in algae. *Plants*, 9(1). doi: 10.3390/plants9010067
- Velu, C., Cirés, S., Alvarez-Roa, C., & Heimann, K. (2015). First outdoor cultivation of the N₂-fixing cyanobacterium *Tolypothrix* sp. in low-cost suspension and biofilm systems in tropical Australia. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 1743–1753. doi: 10.1007/s10811-014-0509-x
- Vidal, L., Ballot, A., Azevedo, S., Padisak, J., & Martin, W. (2021). Introduction to Cyanobacteria. In *Toxic Cyanobacteria in Water* (pp. 163–211).
- Viegas, C., Gouveia, L., & Gonçalves, M. (2021). Evaluation of microalgae as bioremediation agent for poultry effluent and biostimulant for germination. *Environmental Technology and Innovation*, 24, 102048. doi: 10.1016/j.eti.2021.102048

- Vijay, R., Id, K., & Butler, T. O. (2018). *Microwave-Assisted Extraction for Microalgae : From Biofuels to Biorefinery*. doi: 10.3390/biology7010018
- Villar-Navarro, E., Ruiz, J., Garrido-Pérez, C., & Perales, J. A. (2022). Microalgae biotechnology for simultaneous water treatment and feed ingredient production in aquaculture. *Journal of Water Process Engineering*, 49(June), 103115. doi: 10.1016/j.jwpe.2022.103115
- Vinothkanna, A., & Sekar, S. (2020). Diagnostic Applications of Phycobiliproteins. In E. Jacob-Lopes, M. I. Queiroz, & L. Q. Zepka (Eds.), *Pigments from Microalgae Handbook* (pp. 585–610). Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-030-50971-2_24
- Vonshak, A., & Torzillo, G. (2004). Environmental Stress Physiology. In *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (pp. 57–82). doi: <https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch4>
- Wang, Y., Fu, F., Li, J., Wang, G., Wu, M., Zhan, J., Chen, X., & Mao, Z. (2016). European Journal of Soil Biology Effects of seaweed fertilizer on the growth of *Malus hupehensis* Rehd . seedlings , soil enzyme activities and fungal communities under replant condition. *European Journal of Soil Biology*, 75, 1–7. doi: 10.1016/j.ejsobi.2016.04.003
- Watanabe, M., Semchonok, D. A., Webber-birungi, M. T., Ehira, S., & Kondo, K. (2014). *Attachment of phycobilisomes in an antenna – photosystem I supercomplex of cyanobacteria*. 111(7), 2512–2517. doi: 10.1073/pnas.1320599111
- 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. doi: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., & Kuča, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Archives of Toxicology*, 90(8), 1817–1840. doi:

10.1007/s00204-016-1744-5

- Xie, J., Chen, S., & Wen, Z. (2021). Effects of light intensity on the production of phycoerythrin and polyunsaturated fatty acid by microalga *Rhodomonas salina*. *Algal Research*, 58(June), 102397. doi: 10.1016/j.algal.2021.102397
- You, T., & Barnett, S. M. (2004). Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochemical Engineering Journal*, 19(3), 251–258. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.02.004>
- Yousuf, A. (2019). Fundamentals of microalgae cultivation. In *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-817536-1.00001-1
- Zahra, Z., Choo, D. H., Lee, H., & Parveen, A. (2020). Cyanobacteria: Review of current potentials and applications. *Environments - MDPI*, 7(2). doi: 10.3390/environments7020013
- Zaimes, G. G., & Khanna, V. (2013). Microalgal biomass production pathways: Evaluation of life cycle environmental impacts. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 1–11. doi: 10.1186/1754-6834-6-88
- Zanolla, V., Biondi, N., Niccolai, A., Abiusi, F., Adessi, A., Rodolfi, L., & Tredici, M. R. (2022). Protein, phycocyanin, and polysaccharide production by *Arthrospira platensis* grown with LED light in annular photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 34(3), 1189–1199. doi: 10.1007/s10811-022-02707-0
- Zewdie, D. T., & Ali, A. Y. (2020). Cultivation of microalgae for biofuel production: Coupling with sugarcane-processing factories. *Energy, Sustainability and Society*, 10(1), 1–16. doi: 10.1186/s13705-020-00262-5
- Zhang, L., Yan, C., Guo, Q., Zhang, J., & Ruiz-Menjivar, J. (2018). The impact of agricultural chemical inputs on environment: Global evidence from informetrics analysis and visualization. *International Journal of Low-Carbon*

Technologies, 13(4), 338–352. doi: 10.1093/ijlct/cty039

Zuccaro, G., Yousuf, A., Pollio, A., & Steyer, J. P. (2019). Microalgae cultivation systems. In *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-817536-1.00002-3

