

Debreceni Egyetem
Műszaki Kar
Környezetmérnöki Tanszék



Mikroalga termeszthetőségének kísérleti vizsgálata különböző kémiai összetételű tápközegekben

TDK dolgozat

Szerző: **Németh Bence**
MSc hallgató

Témavezető: Dr. Magyar Tamás, *egyetemi adjunktus*
Társ témavezető: Dr. Nagy Péter Tamás, *egyetemi docens*

Tanszékvezető:
Dr. Kocsis Dénes, *egyetemi docens*

Debrecen
2022

Tartalomjegyzék

Ábrajegyzék	4
Táblázatjegyzék	5
Bevezetés	6
1. Szakirodalmi áttekintés	8
1.1 Mikroalgák szerepe a fenntartható fejlődésben.....	8
1.2. A <i>Chlorella vulgaris</i>	9
1.3. A <i>Chlorella vulgaris</i> szaporodása.....	10
1.4. A <i>C. vulgaris</i> biokémiai összetevői.....	11
1.4.1. Fehérjék	11
1.4.2. Lipidek	11
1.4.3. Szénhidrátok.....	11
1.4.4. Pigmentek.....	12
1.4.5. Vitaminok és ásványi anyagok.....	12
1.5. A metabolitok termelésének környezeti paraméterei	12
1.5.1. Nitrogénforrás	14
1.5.2. Szénforrás.....	14
1.5.3. pH.....	15
1.5.4. Sótartalom	15
1.5.5. A fény intenzitása és minősége	16
1.5.6. Hőmérséklet	17
1.5.7. Homogenizálás és levegőztetés	17
1.6. A mikroalga termesztés technológiai módszerei.....	18
1.6.1. Autotróf növekedés	19
1.6.2. Heterotróf növekedés	20
1.6.3. Mixotróf növekedés.....	20
1.6.4. Egyéb tenyésztési módszerek.....	21
1.7. A <i>Chlorella vulgaris</i> alkalmazási lehetőségei.....	21
2. Anyag és módszer	23
2.1 A tápoldatok elkészítésének módszere.....	23
2.2. A kísérlet környezeti körülményei	25
2.3. Alkalmazott vizsgálati módszerek	25
2.3.1. Kémiai paraméterek meghatározása.....	25
2.3.2. Biológiai paraméterek meghatározása	27
3. Eredmények és azok értékelése	30
3.1. Kémiai paraméterek	30

3.1.1. C (kontroll) tápközeg	30
3.1.2. T1 (BG-11 emelt nitrát tartalommal) tápközeg.....	31
3.1.3. T2 (BG-11 emelt foszfát tartalommal) tápközeg	33
3.1.4. T3 (BG-11 emelt nitrát- és foszfát tartalommal) tápközeg	34
3.2. Abszorbancia értékek összehasonlítása C, T1, T2 és T3 tápközeg esetén	36
3.3. Biológiai paraméterek	38
3.3.1. C (kontroll) tápközeg	38
3.3.2. T1 (BG-11 emelt nitrát tartalommal) tápközeg.....	40
3.3.3. T2 (BG-11 emelt foszfát tartalommal) tápközeg	41
3.3.4. T3 (BG-11 emelt nitrát- és foszfát tartalommal) tápközeg	42
3.4. Optimális kultivációs időtartam T3 kezelés példáján keresztül	43
4. Következtetések és javaslatok	46
4.1. Környezeti paraméterek optimalizálása	46
4.2. Tápközeg összetételének optimalizálása	46
Összefoglalás	48
Irodalomjegyzék	49

Ábrajegyzék

1. ábra: A mikroalgák technológiai innovációinak szerepe az ENSZ fenntartható fejlődési céljainak elérésében [6] alapján.	9
2. ábra: A <i>Chlorella vulgaris</i> autospórulációs folyamata. (a) korai sejtnövekedési fázis; (b) késői sejtnövekedési fázis; (c) kloroplasztisz osztódási fázis; (d) korai protoplaszt osztódási fázis; (e) késői protoplaszt osztódási fázis; (f) leánysejtek érési fázisa (g) kelési fázis [13] alapján.	10
3. ábra: Mikroalgák termesztési módjai [58] alapján.	18
4. ábra: Autotróf növekedési technológiák [65] alapján.	20
5. ábra: A tápoldathoz készített törzsoldatok és a <i>C. vulgaris</i>	24
6. ábra: kontroll – C; kezelés 1 – T1; kezelés 2 – T2; kezelés 3 – T3.....	25
7. ábra: PF-12 kompakt fotométer, NANOCOLOR, VISOCOLOR ECO gyorsesztek [72]..	26
8. ábra: UV-6300PC kétsugaras spektrofotométer.	26
9. ábra: bbe Algae Toximéter II. [73].....	27
10. ábra: A kémiai paraméterek alakulása a C (kontroll) tápközegben.....	30
11. ábra: A kémiai paraméterek alakulása a T1 (BG-11 emelt nitrát tartalommal) tápközegben.	32
12. ábra: A kémiai paraméterek alakulása a T2 (BG-11 emelt foszfát tartalommal) tápközegben.	33
13. ábra: A kémiai paraméterek alakulása a T3 (BG-11 emelt nitrát- és foszfát tartalommal) tápközegben.....	35
14. ábra: klorofill A abszorpciós értékek [74].....	36
15. ábra: Az abszorbancia értékek összehasonlítása C, T1, T2 és T3 tápközeg esetén.	37
16. ábra: A biológiai paraméterek alakulása C (kontroll) tápközegben.	39
17. ábra: A biológiai paraméterek alakulása T1 (BG-11 emelt nitrát tartalommal) tápközegben.	40
18. ábra: A biológiai paraméterek alakulása T2 (BG-11 emelt foszfát tartalommal) tápközegben.....	41
19. ábra: A biológiai paraméterek alakulása T3 (BG-11 emelt nitrát- és foszfát tartalommal) tápközegben.....	42
20. ábra: Optimális kultivációs időtartam T3 kezelés esetén.	44

Táblázatjegyzék

1. táblázat: A <i>Chlorella vulgaris</i> termesztésének optimális feltételei [26] alapján.	13
2. táblázat: A <i>Chlorella vulgaris</i> alkalmazási lehetőségei [26] alapján.	22
3. táblázat: A BG-11 tápoldat összetevői.	23
4. táblázat: A kémiai paraméterekre illesztett egyenletek C közeg esetén.	31
5. táblázat: A kémiai paraméterekre illesztett egyenletek T1 közeg esetén.	32
6. táblázat: A kémiai paraméterekre illesztett egyenletek T2 közeg esetén.	34
7. táblázat: A kémiai paraméterekre illesztett egyenletek T3 közeg esetén.	35
8. táblázat: Az illesztett exponenciális egyenlethez tartozó konstans paraméterek, valamint a kultivációs idő az elérni kívánt koncentráció függvényében.	45

Bevezetés

A mikroalgák ősi múltra tekintenek vissza, amely 3,4 milliárd évvel ezelőtt kezdődött, amikor a cianobaktériumok csoportjába tartozó legrégebbi ismert mikroalga megkövesedett maradványát megtalálták a nyugat-ausztráliai kőzetekben. Az elvégzett vizsgálatok megerősítették, hogy szerkezetük napjainkig változatlan maradt, és bármilyen primitívek is, mégis meglehetősen bonyolult és szervezett életformákat képviselnek. Mindazonáltal más jelentések becslései szerint a cianobaktériumok evolúciójának tényleges ideje közelebb van a 2,7 milliárd évvel ezelőttihez, ezért az evolúcióbiológusok becslése szerint az algák a növények ősei lehettek [1]. Így az idők folyamán az algákból más tengeri növények születtek, és a 450 millió évvel ezelőtti paleozoikum során a szárazföldre költöztek, akárcsak az állatoknak. Az evolucionistáknak azonban több akadályt is le kell küzdeniük (kiszáradás veszélye, táplálkozás, szaporodás és oxigén elleni védelem) ahhoz, hogy ezt a forgatókönyvet további tudományos bizonyítékokkal kiegészítve biztosan megerősítsék.

Mint minden más fitoplankton, a mikroalgák is rendelkeznek tápértékkel. A kékszöld mikroalgát elsőként az aztékok és más mezoamerikaiak fogyasztották, akik erre a biomasszára fontos táplálékforrásként tekintettek. Napjainkban ezeket a mikroszkopikus organizmusokat – főként *Chlorella vulgaris* és a *Spirulina platensis* – még mindig táplálékkiegészítőként fogyasztják, továbbá termékeiket különböző célokra is felhasználják, mint például színezékek, gyógyszerek, állati takarmányok és kozmetikumok. Az elmúlt két évtizedben a mikroalgák felhasználása új irányt vett, amely során alternatív alkalmazásukat a fosszilis tüzelőanyag-készletek kimerülése, az ebből eredő olajárak emelkedése és a globális felmelegedéssel kapcsolatos aggodalmak motiválták. Ezek a jelenleg is zajló, globális folyamatok arra készítetik a világot, hogy az emberiség új stratégiákat találjon a széndioxid-kibocsátás csökkentésére az alternatív megújuló alapanyagok-, valamint a harmadik generációs bioüzemanyagokkal kapcsolatos kutatások intenzívebbé tételével. A fent leírtak alapján a mikroalgákat manapság ígéretes fenntartható energiaforrásnak tekintik, mivel képesek nagy mennyiségű lipid felhalmozására, amelyek alkalmasak biodízel előállítására [2]. Mindezek mellett fehérjék, szénhidrátok, pigmentek, vitaminok és ásványi anyagok is kinyerhetők belőlük. Ugyanakkor a mikroalgák befogják a napfényt és fotoszintézist végeznek, amely során a földi légköri oxigén mintegy felét termelik, valamint nagy mennyiségű szén-dioxidot nyelnek el. Ezért termesztésük a széntüzelésű erőművek mellett nagy jelentőséggel bír, mivel figyelemre méltó képességük van a szén-dioxid elnyelésére, amelyet potenciális bioüzemanyaggá, élelmiszerré, takarmánnyá és magas

hozzáadott értékű komponensekké alakítanak át. A mikroalgák édes- és tengervízben, valamint a Föld szélsőséges környezeti feltételeit tekintve – a skandináviai fagyos földektől a szaharai forró sivatagi talajokig – is képesek növekedni [3]. A gyors növekedési sebesség, a környezeti stresszhez való alkalmazkodóképesség és a mikroalgák által termelt biokémiai vegyületek nagy száma jelzi a mikroalgákban rejlő potenciális lehetőségeket számos alkalmazásban.

A termelési-feldolgozási költségek azonban továbbra is túl magasnak bizonyulnak ahhoz, hogy a piacon versenyképesek legyenek. Valójában ez a mikroalga termesztés iparának egyik fő gátja napjainkban, azonban el kell ismerni, hogy az elmúlt évtizedben jelentős javulást értek el, és a várakozások szerint a mikroalgák ipara a közeljövőben különböző szinteken igen versenyképes lesz a piacon [4].

A kutatásom célja az említettek alapján a különböző kémiai összetételű tápközegek hatásának vizsgálata volt a *Chlorella vulgaris* mikroalgák szaporodására. Ezen belül további célként tűztem ki, hogy:

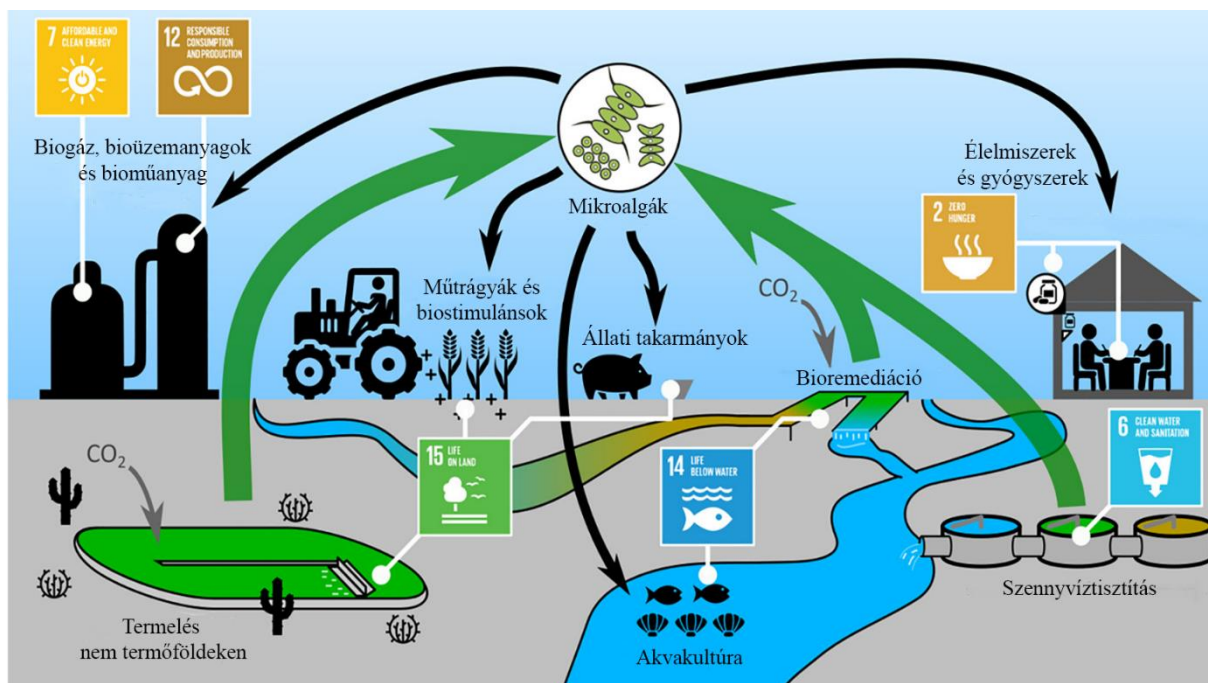
- megvizsgáltam a különböző kémiai összetételű tápközegek kémiai paramétereit (NH_4^+ , NO_3^- , K^+ , PO_4^{3-} , KOI, pH, elektromos vezetőképesség), valamint az UV-látható fény tartományban lévő abszorbanciáját és feltárjam azok kapcsolatát a biológiai paraméterekkel (klorofill koncentráció és mikroalga aktivitás).
- meghatároztam a különböző kémiai összetételű tápközegekre vonatkozó klorofill koncentráció – azaz biomassza növekedés – arányát, illetve elméleti elméleti maximumát, továbbá az ehhez tartozó optimális kultivációs időtartamot.
- összehasonlító elemzést végeztek a különböző tápoldatok szaporodásra gyakorolt hatására a kontroll tápoldathoz képest.

1. Szakirodalmi áttekintés

1.1 Mikroalgák szerepe a fenntartható fejlődésben

A fenntartható fejlődés egy nemzet környezeti, gazdasági, társadalmi és közegészségügyi értékeit támasztja alá. Az Egyesült Nemzetek Szervezetének (ENSZ) fenntartható fejlődési céljai (SDG) tényeken alapuló keretet biztosítanak az emberek és a bolygó jólétének fenntartható átalakításához regionális, nemzeti és globális szinten egyaránt [5]. Az SDG-k elérésének előre jelzett sikertelensége azonban azt jelenti, hogy a meglévő technológiák nem elegendők a gazdasági, környezeti és társadalmi igények kiegyensúlyozásához, és új technológiákra van szükség az előrehaladásához. A mikroalgák biotechnológiájának újszerű alkalmazásai azt mutatják, hogy ezek az organizmusok számos cél elérését segíthetik elő (1. ábra). Az SDG-2 (éhezés megszüntetése) tekintetében a mikroalgákból származó fehérjék táplálkozási alternatívát jelentenek az állati eredetű fehérjékkel szemben, hogy kielégítsék a növekvő globális fehérjeigényt, míg a mikroalgákból származó táplálékkiegészítők alkalmasak a mikrotápanyagok hiányának kezelésére az egészségi állapot javítása érdekében. Az SDG-6 (tiszta víz és higiénia) tekintetében a mikroalga alapú szennyvíztisztító rendszerek költséghatékony és eredményes szennyvízkezelést biztosíthatnak olyan települések és országok számára, ahol a mechanikai/kémiai alapú szennyvízkezelés nem lenne költséghatékony. A mikroalgás szennyvízkezelésből származó biomassza felhasználható helyi biogáz alapanyag előállítására az SDG-7 (megfizethető és tiszta energia) támogatására. A mikroalgákból előállított alternatív termékek, mint például a bioműanyagok, hozzájárulhatnak a fosszilis tüzelőanyag-fogyasztás csökkentéséhez és a biológiai lebonthatóság javításához, támogatva ezzel az SDG 12-t (felelős fogyasztás és termelés). A tápanyagszennyezés csökkentése a DG-14 (élet a víz alatt) eredményeinek javítása érdekében a fonalas algák alkalmazásával érhető el a szennyező tápanyagok eltávolítására az édes- és tengervizekből, míg a mikroalgák biostimuláló anyagai javíthatják a talaj állapotát és a stimulálhatják a növények növekedését, amely az SDG-15 (élet a szárazföldön) támogatását szolgálja. A mikroalgák biotechnológiája számos fenntartható fejlődési célt integrál és összekapcsol, és az egyik fenntartható fejlődési célban elért eredmények más fenntartható fejlődési célokban is pozitív előnyökhöz vezetnek. Ahhoz, hogy a mikroalgák biotechnológiája hozzájárulhasson az SDG-k eléréséhez, számos akadályt kell leküzdeni, többek között a termelés optimalizálását és a költséghatékony nagyüzemi termesztést. Továbbá megállapítható, hogy jelentős beruházásokra lesz szükség a mikroalgák technológiai innovációjának felgyorsításához. E kihívások ellenére a mikroalgák

biotechnológiájának vonzereje a környezetszennyező iparágakból eredő számos környezeti hatás és pazarló termelési folyamat mérséklése, valamint fenntartható alternatívák biztosítása szempontjából egyértelműen nyilvánvaló.



1. ábra: A mikroalgák technológiai innovációinak szerepe az ENSZ fenntartható fejlődési céljainak elérésében [6] alapján.

1.2. A *Chlorella vulgaris*

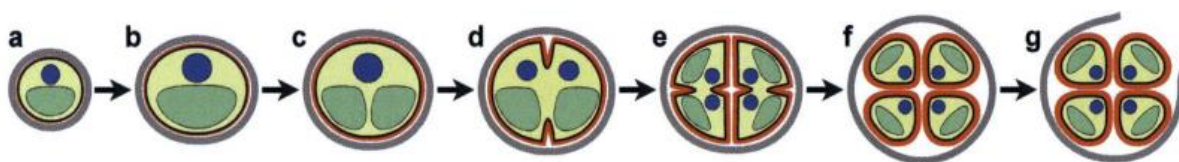
A mikroalgák az egysejtű autotróf szervezetek óriási biológiai sokféleséget képviselő csoportja, amelyek többnyire fotoszintetikusak. Az elmúlt évtizedekben már több mint 40000 eukarióta mikroalga fajt vizsgáltak, elemeztek, melyek közül az egyik legjelentősebb a *Chlorella vulgaris*. A *C. vulgaris* egy zöld alga, amelyet 1890-ben Martinus Willem Beijerinck holland mikrobiológus írt le az első tiszta eukarióta mikroalga tenyészetből. A *Chlorella* név a görög chloros (Χλωρός) szóból származik, amely zöldet jelent, és a latin ella utótagból, amely mikroszkopikus méretére utal. Egysejtű mikroalga, amely széles körben elterjedt édesvízi, tengeri és szárazföldi környezetben, valamint már a 2,5 milliárd évvel ezelőtti prekambriumi időszak óta jelen van a Földön, és azóta genetikai integritása állandó. Főbb tulajdonságai közé tartozik, hogy nagy fotoszintetikus képességgel rendelkezik, és képes gyors növekedésre autotróf, mixotróf és heterotróf körülmények között. Az 1900-as évek elejére a *Chlorella* fehérjetartalma (>55% száraz tömeg) felkeltette a német tudósok figyelmét, mint nem

hagyományos élelmiszerforrás. Az 1950-es években a washingtoni Carnegie Institution [7] vette át a tanulmányt, és sikerült ezt a mikroalgát nagy mennyiségben termesztetni a CO₂ csökkentés érdekében. Napjainkban Japán világelső a *Chlorella* fogyasztásában, valamint gyógyászati kezelésre is használja, mivel immunmoduláló és rákellenes tulajdonságai is bizonyítottak [8-9]. Patkányok, egerek és nyulak por formájában történő etetése után védő tulajdonságokat mutatott a vérképzés [10], az életkorral összefüggő betegségek, mint a szív- és érrendszeri betegségek, a magas vérnyomás és a szürkehályog ellen; csökkenti az érelmeszesedés kockázatát és serkenti a bőr kollagénszintézisét [11]. A *C. vulgaris* továbbá jelentős mennyiségű lipidek felhalmozására is képes, különösen nitrogénhiányos állapot után, amelyek zsírsavprofilja alkalmas a biodízel előállítására [12]. Mindezen tulajdonságai az egyik első olyan mikroalgává tették, amelyet nagyüzemi termesztésre és kereskedelmi termelésre tartanak számon.

A *C. vulgaris* 2-10 µm átmérőjű, gömb, szubgömb vagy ellipszoid alakú, flagellák nélkül. Egysejtűként jelenik meg, vagy legfeljebb 64 sejtből álló kolóniákat képes alkotni. A *C. vulgaris*-nak egyetlen, csésze alakú kloroplasztisza van pirenoidokkal (tároló keményítőszemcsékkel) vagy azok nélkül.

1.3. A *Chlorella vulgaris* szaporodása

A *C. vulgaris* nem mozgékony mikroalgaként aszexuális autospórák termelésével gyorsan szaporodik. Optimális körülmények között, 24 órán belül az anyasejt 2-32 autospórára vagy leánysejtre osztódik. Az autospórák érésekor az anyasejt fala felszakad, és a törmeléke az autospórulációnak nevezett folyamat során a leánysejtek táplálékává válik (2. ábra).



2. ábra: A *Chlorella vulgaris* autospórulációs folyamata. (a) korai sejtnövekedési fázis; (b) késői sejtnövekedési fázis; (c) kloroplasztisz osztódási fázis; (d) korai protoplaszt osztódási fázis; (e) késői protoplaszt osztódási fázis; (f) leánysejtek érési fázisa (g) kelési fázis [13] alapján.

1.4. A *C. vulgaris* biokémiai összetevői

A mikroalgák főként fehérjékből, lipidekből, szénhidrátokból, pigmentekből, ásványi anyagokból és vitaminokból állnak. Ezek az összetevők tovább osztályozhatók elsődleges és másodlagos metabolitokra. Az elsődleges metabolitok általában nélkülözhetetlenek a növekedéshez és a fő anyagcsere-folyamatokhoz, például a fotoszintézishez és a légzéshez, míg a másodlagos metabolitok az elsődleges metabolitokból származó molekulák, amikor a szervezetek bizonyos kedvezőtlen környezeti ingereknek vannak kitéve [14]. Összetétele a fajoktól és a tenyésztési környezettől függően változik, mint például a fényintenzitás, a hőmérséklet, a pH, a sótartalom és a közeg tápanyagforrásai [15].

1.4.1. Fehérjék

A fehérjék a legtöbb mikroalga fő alkotóelemei, fajoként 50-70%-ban [16], amelyek a sejtek növekedéséhez, javításához és fenntartásához szükségesek. A *C. vulgaris* teljes fehérjetartalma a növekedési körülményektől függően a száraz tömeg 43-58%-a. A mikroalgákban a fehérjék körülbelül 20%-a a sejtfalhoz kötődik, 50%-a a sejteken belül helyezkedik el, a maradék 30% pedig folyamatosan vándorol a sejtbe és a sejtől ki [17]. A fehérjék táplálkozási minősége az esszenciális és nem esszenciális aminosavakkal kapcsolatos.

1.4.2. Lipidek

A lipidek alapvető szerepet játszanak a mikroalgák anyagcseréjében és növekedésében, mivel energia- és szénkészletként szolgálnak [18]. A mikroalgák lipidkomponensei semleges és poláris lipidekre oszthatók. A poláris lipidek, mint például a kloroplasztiszok által termelt foszfolipidek és glikolipidek a sejtfalban és az organelláris membránokban dominálnak, míg a semleges lipidek (mono-, di- és triacilglicerin) a sejtorganellákban tárolódnak. A mikroalgák lipidprofilja széleskörű, a fajoktól és a környezettől függően 2 és 77% között mozog, a *C. vulgaris*-ban pedig a száraz tömeg 5 és 58%-a között mozog [19]. A *C. vulgaris* több lipidet termel (60-68%), ha mixotróf körülmények között termesztik [20].

1.4.3. Szénhidrátok

A szénhidrátok, mint a keményítő, a glükóz, a cukor és a poliszacharidok jellemzően energia- és szénkészletként szolgálnak a mikroalgákban. A *C. vulgaris*-ban a legnagyobb mennyiségben előforduló poliszacharidok az amilózból és amilopektinből álló keményítő, amelyet a sejtfalban a poliszacharid cellulóz követ. A *C. vulgaris* teljes szénhidrátértéke elérheti a 12-55%-os

szárazanyag-értéket, ha kedvezőtlen környezetben, különösen korlátozott nitrogén mellett termesztik [21].

1.4.4. Pigmentek

A pigmentek a fotoszintézis folyamatában a látható fény bizonyos hullámhosszúságú hullámainak elnyeléséért és visszaverődéséért felelős színes vegyületek [22]. A mikroalgák jól ismertek a magas hozzáadott értékű termékek - pigmentek és bioaktív vegyületek, például karotinoidok, klorofilok és fikobiliproteinek - termeléséről. A *C. vulgaris* potenciálisan képes nagy mennyiségű klorofillt termelni, elérve a száraz tömegének 1-2%-át. A *C. vulgaris* emellett gazdag forrása a karotinoidoknak (asztaxantin, lutein, β -karotin, likopin és kantaxantin), szárazanyagra számítva körülbelül 0,4%-os mennyiségben [23].

1.4.5. Vitaminok és ásványi anyagok

A vitaminok olyan szerves anyagok, amelyek a szervezet számára a normális növekedéshez és táplálkozáshoz szükségesek, és amelyek vízben oldódó (B és C), valamint zsírban oldódó (A, D, E és K) vitaminok kategóriájába sorolhatók. Az emberi szervezet nem képes a vitaminokat megfelelő mennyiségben szintetizálni, ezért azokat külső forrásból, a táplálékkal történő fogyasztás útján kell beszerezni. A *C. vulgaris* A-, B-, C- és E vitamint tartalmaz [24]. Az ásványi anyagok olyan szervesetlen anyagok, amelyekre az emberi szervezetnek szüksége van a megfelelő működéshez a jó egészség megőrzésének érdekében. A *C. vulgaris* gazdag kalciumban, káliumban, magnéziumban és cinkben, [25]. A *C. vulgaris*ban található vitaminok és ásványi anyagok széles skálája az alapvető mikrotápanyagok kiváló forrásává teszi.

1.5. A metabolitok termelésének környezeti paraméterei

A *C. vulgaris* jelentős erőforrás különböző magas hozzáadott értékű termékek előállításához. Ezért a következő szakaszban olyan különböző környezeti paramétereket tárgyalok, amelyek megváltoztathatják a metabolitok termelését. Az 1. táblázat összefoglalja a *C. vulgaris* optimális termesztési körülményeit.

Paraméterek	Preferenciák
Nitrogénforrás	Ammónium (autotróf) Karbamid (mixotróf)
Szénforrás	1,2 g/l NaHCO ₃ 8% CO ₂ 10% CO ₂ 24 órás fényellátás mellett 1% m/v glükóz (mixotróf) 4758 ppm CO ₂ , 75 mg/l NaHCO ₃ (lipidtermelés)
pH	pH 7,5 és pH 8,0 (kadmiumot tartalmaz) pH 10,0 és 10,5
Sótartalom	0,5 M nátrium-klorid (NaCl) alatt 0,5 M NaCl (lipidtermelés)
A fény intenzitása és minősége	100-200 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Sárga, vörös és fehér fény (gyorsabban éri el a lag fázist) Zöld fény Vörös fény (klorofilltermelés) Sötétben (többszörösen telítetlen zsírsavak)
Hőmérséklet	30°C (biomassza előállítása) 25°C (lipidtermelés) 38°C (megnövekedett olajsav)
Homogenizálás és levegőztetés	250 rpm keverés (klorofilltermelés) Levegőztetés 200 ml/perc (lipidtermelés)

1. táblázat: A *Chlorella vulgaris* termesztésének optimális feltételei [26] alapján.

1.5.1. Nitrogénforrás

A nitrogén létfontosságú szerepet játszik a sejtnövekedésben és a lipidtermelésben [27], a mikroalgák teljes szárazanyagának 1-10%-át teszi ki [28]. A nitrogén tápanyagként különböző formákban, például ammónium, nitrát, élesztő, karbamid és pepton formájában juttatható a mikroalgákhoz, és ezek mindegyike eltérő hatással van a növekedésre. A *C. vulgaris* az ammóniumot részesíti előnyben a nitráttal szemben, és azt meríti ki először, amikor mindkét vegyület egyidejűleg jelen van a táptalajban. Mixotróf kultúrában azonban a karbamid gyorsabban kimerül, mint a nitrát és az ammónium. Ez azt jelzi, hogy különböző tenyésztési körülmények között a *C. vulgaris* különböző preferenciákkal rendelkezik a nitrogénforrás tekintetében, és a mixotróf tenyésztés megvalósítható megközelítés a lipidtermeléshez [27]. A *C. vulgaris* lipidtermelése nitrogénhiányos körülmények között nő, amely azonban csökkenti a mikroalga teljes biomaszatömegét is, így pedig a teljes lipidhozam is csökkent [29]. Ezért a probléma megoldása érdekében – a lipidhozam befolyásolása nélkül – azt javasolják, hogy a mikroalgákat kezdetben nitrogénben gazdag körülmények között teremesszék a növekedés fokozása, valamint a biomassza növelése érdekében, majd később nitrogénhiányos környezetbe helyeznék át őket a lipidtermelés serkentése érdekében [30].

1.5.2. Szénforrás

Zheng és munkatársai [31] kimutatták, hogy a *C. vulgaris* biomassza termelése és nátrium-bikarbonát tartalma nőtt nátrium-hidrogén-karbonát (NaHCO_3) hozzáadásával, amely a maximális hozamot (0,6 g/l biomassza), 1,2 g/l NaHCO_3 -t adagolása esetén érte el [32]. Daliry, Hallajisani, Mohammadi Roshandeh, Nouri és Golzary [33] kimutatták, hogy a *C. vulgaris* a legnagyobb biomaszt akkor érte el, amikor 8% CO_2 -t biztosítottak a táptalajban, míg Yusof és munkatársai [25] azt találták, hogy a *C. vulgaris* a legnagyobb növekedési sebességet akkor érte el, amikor 10% CO_2 és 24 órás fény mellett termesztették. A biztosított CO_2 mennyisége befolyásolja a tenyészet pH-értékét, ezért a CO_2 koncentrációt folyamatosan monitorozni és optimális szükséges, hogy a mikroalgák lipid- és biomaszatermelése anélkül javuljon, hogy a növekedést befolyásolná [34]. Az autotróf kultúrához képest a *C. vulgaris* magasabb lipidtermelést produkált mixotróf termesztés során, amikor szénforrásként glükózt (1% w/v) használtak, ami azt jelzi, hogy a különböző szénforrások a kívánt metabolitok eltérő hozamát eredményezik [35]. Devgoswami, Kalita, Talukdar, Bora és Sharma [36] megfigyelték, hogy a *C. vulgaris* maximális lipidtermelődést ért el, amikor 4758 ppm CO_2 -t buborékolattak át 75 mg/l NaHCO_3 -ot tartalmazó táptalajban.

A szerves szén és a nitrogén (C/N) közötti kölcsönhatás a táptalajban döntő fontosságú a mikroalgák lipidtermelésének optimalizálásában, mivel a sejtek kívánt növekedési üteméhez magas nitrátkoncentrációra van szükség, ugyanakkor ezt a koncentrációt alacsonyan kell tartani a lipidtermelés serkentéséhez [33].

1.5.3. pH

A kiválasztott pH-érték fontos a mikroalgák termesztése során, mivel a kedvezőtlen pH érték abiotikus stresszként hat a mikroalgákra, amely végső soron befolyásolja a tápanyagfelvétel hatékonyságát és a termelt metabolitokat [37]. Ezen kívül a kedvezőtlen pH érték egyes kultúrákban kalcium kicsapódást okozhat [38]. Rachlin és Grosso [39] szerint a kadmiumot tartalmazó *C. vulgaris* kultúra optimális pH-ja 7,5-8,0 közötti, így a mikroalgák mind savas (pH 3,0-6,2), mind pedig lúgos (pH 8,3-9,0) körülmények között lassabban növekszenek. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a *C. vulgaris* potenciálisan felhasználható a vízben lévő kadmium toxikus hatásainak mérséklésére. Míg normál termesztés mellett a *C. vulgaris* növekedéséhez az optimális pH 10,0 és 10,5 közé esik [40]. Azt is kimutatták, hogy az optimális pH-hoz való folyamatos korrigálás fokozza a mikroalgák növekedését és megakadályozza az elszennyeződésüket.

1.5.4. Sótartalom

A sótartalom az egyik leggyakoribb stressztényező, amelyet a mikroalgák lipid- és biomassza-termelésének serkentésére használnak. A különböző mikroalga fajok különböző mértékben tolerálják a sótartalomból eredő stresszt, de a túlzott sótartalom a só toxicitása miatt zavarja a fotoszintézist, és gátolja a lipid- és biomassza termelést [41]. Aljabyev és mtsai [42] szerint a maximális sókoncentráció, amelyhez a *C. vulgaris* még alkalmazkodni képes kisebb, mint 0,5 M nátrium-klorid (NaCl). A *C. vulgaris* β -karotin termelése nő a NaCl-koncentrációval 0,1 M és 0,3 M között, de 0,4 M NaCl alkalmazásakor csökkent [43]. Habár a magas NaCl-koncentráció (0,5 M) csökkentette a mikroalgák növekedését, ugyanakkor megfigyelték azt is, hogy a lipidek felhalmozódtak a mikroalgákban a magas sótartalom okozta oxidatív stressz miatt [44]. Ezek alapján kijelenthető, hogy a magas sótartalom előnyös a mikroalgák lipidtermelésében.

1.5.5. A fény intenzitása és minősége

A fényexpozíció minősége és időtartama szintén befolyásolja a mikroalgák növekedését. A fény ugyanis elengedhetetlen a fotoszintézishez, és befolyásolja a mikroalgák kémiai összetételét [41]. Zhao és Su [45] szerint a mikroalgák termesztéséhez leggyakrabban használt fényintenzitás $100\text{--}200 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Jacob-Lopes, Scoparo, Lacerda és Franco [46], valamint Khoeyi, Seyfabadi és Ramezanpour [47] azt találták, hogy a sejtsűrűség a fotoperiódus növekedésével arányosan nő. Ettől eltérő eredményeket mutatott azonban Khoeyi és munkatársai [47], ahol a *C. vulgaris* a maximális biomasszárt ($2,05 \pm 0,1 \text{ g/l}$) ért el $62,5 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fényintenzitás mellett, 16:8 (világos: sötét) fotoperiódust alkalmazva érte el, majd a biomassa tömeg csökkenésnek indult $100 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fényintenzitás esetén. Az optimális fényviszonyok tehát fontosak egyrészt a költségek csökkentése érdekében, másrészt, ami még fontosabb, hogy a túlzott fényintenzitás leállítja a sejtosztódási folyamatokat, gátolva a sejtek növekedését [47]. Néhány korábbi tanulmány megállapította, hogy a *C. vulgaris* gyorsabban éri el a lag fázist (akklimatizálódás), ha sárga, vörös és fehér fénynek van kitéve, mint kék, zöld és lila hullámhosszú fények esetében [48]. A növekedési sebesség befolyásolása mellett a fényminőség a *C. vulgaris* teljes lipidtartalmát és zsírsavprofilját is befolyásolja. A legnagyobb mennyiségű hexadecatriénsavat (C16:3) és α -linolénsavat (C18:3) akkor találták a *C. vulgarisban*, amikor zöld fényben termesztették. A vörös fényt jellemzően a klorofill termelésének fokozására használják, mivel a klorofill jobban elnyeli a fényt a vörös hullámhossztartományban [49]. Emellett a *C. vulgaris* jelentős mennyiségű többszörösen telítetlen zsírsavat, például hexadecatrienoic, eikozapenaénsavat, sztearidonsavat és dokozahexaénsavat tartalmaz, amennyiben sötét körülmények között termesztik [50]. A megfelelő fényintenzitást és az adott hullámhosszú fények alkalmazását tehát jól kell megválasztani a kívánt tulajdonságú termékek, valamint a maximális hozam elérésének érdekében.

1.5.6. Hőmérséklet

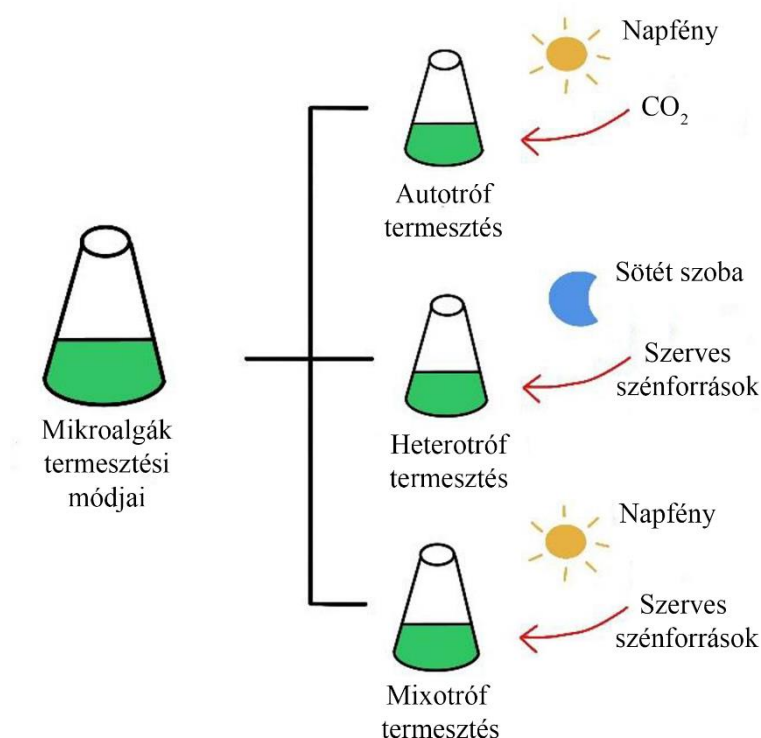
A növekedési hőmérséklet befolyásolja a mikroalgák biomassza-termelését és növekedési sebességét. Ennek oka, hogy a mikroalgákban mind a fotoszintézis (oxigéntermelés vagy széndioxid-megkötés), mind a légzési folyamatok hőmérsékletfüggőek [37]. A tenyésztéshez használt optimális hőmérséklet mikroalga fajonként eltérő, jellemzően 15 és 26°C között változik [34]. Az alacsonyabb hőmérséklet (16°C alatt) korlátozza a sejtek növekedését, a magasabb hőmérséklet pedig gyorsítja a mikroalgák anyagcseréjét, a 35°C feletti hőmérséklet viszont szintén gátolja a növekedést. A *C. vulgaris* számára az optimális növekedési hőmérséklet 30°C, amely a legnagyobb biomassza termelést mutatja [51]. A növekedési üteme 30°C feletti hőmérsékleten lelassul, 38°C-on pedig a kultúra elpusztulását eredményezi. Figyelemre méltó azonban, hogy a *C. vulgaris* lipidtermelése 14,7%-ra nőtt, amikor a növekedési hőmérséklet 30°C-ról 25°C-ra csökkent, továbbá a *C. vulgaris* olajsavtartalma 34%-ra nőtt, amennyiben 38°C-os hőmérsékleten termesztették, így a magasabb hőmérséklet potenciálisan alkalmas az élelmezési célú termékek előállítására.

1.5.7. Homogenizálás és levegőztetés

A levegőztetés vagy keverés megakadályozza a mikroalgák kicsapódását, valamint homogenizálja a termesztési környezetet (pl. hőmérséklet), továbbá elősegíti a gázcserét a kultúra és a levegő között [33]. A termesztés közbeni keverés fontos a radiális keveredés fokozása érdekében, ugyanakkor kíméletesen kell végezni nehogy a sejtek károsodjanak. Az erőteljes keverés rontja a sejtek növekedését, és fontos vegyi anyagok szivárgását okozza a sejtekből [52]. Funahashi, Nishiyama, Asano és Nakao [53] szerint a *C. vulgaris* magasabb klorofillhozamot ér el, ha 250 fordulat/perc mellett homogenizálják, és nagyobb biomasszát termel, ha levegőztetik [30]. Azt is megfigyelték [35], hogy a *C. vulgaris* maximális lipidtermelést ért el, amikor 200 ml/perc intenzitással levegőztették, ami megerősíti a levegőztetés fontosságát a metabolitok termelésében.

1.6. A mikroalga termesztés technológiai módszerei

A *Chlorella* éves termelése 2009-ben elérte a 2000 tonnát (száraz tömeg), és a fő termelők Japán, Németország és Tajvan [22]. Ez a mikroalga gyors növekedési sebességgel rendelkezik, és minden egyes növekedési feltételre egy adott komponens hozamának módosításával reagál. A *C. vulgaris* ideális a termeléshez, mivel figyelemre méltóan ellenálló a zord körülményekkel és a betolakodókkal szemben. Egyrészt a lipid- és keményítőtartalom megnő, a biomassa termelékenysége pedig megszűnik vagy csökken [54] olyan kedvezőtlen növekedési körülmények között, mint a nitrogén- és foszforlimitáció, a magas CO₂ koncentráció, a túlzott fényexpozíció [55-56], a közegben lévő vasfelesleg [57] vagy a hőmérséklet emelkedése. Másrészt a fehérjetartalom normális és irányított növekedési körülmények (nitrogénpótlás) esetén növekszik. Ezért számos növekedési technikát teszteltek a biomassa termelékenységének, lipid-, fehérje-, szénhidrát- és pigmenttartalmának önkéntes megcélzása érdekében (3. ábra).

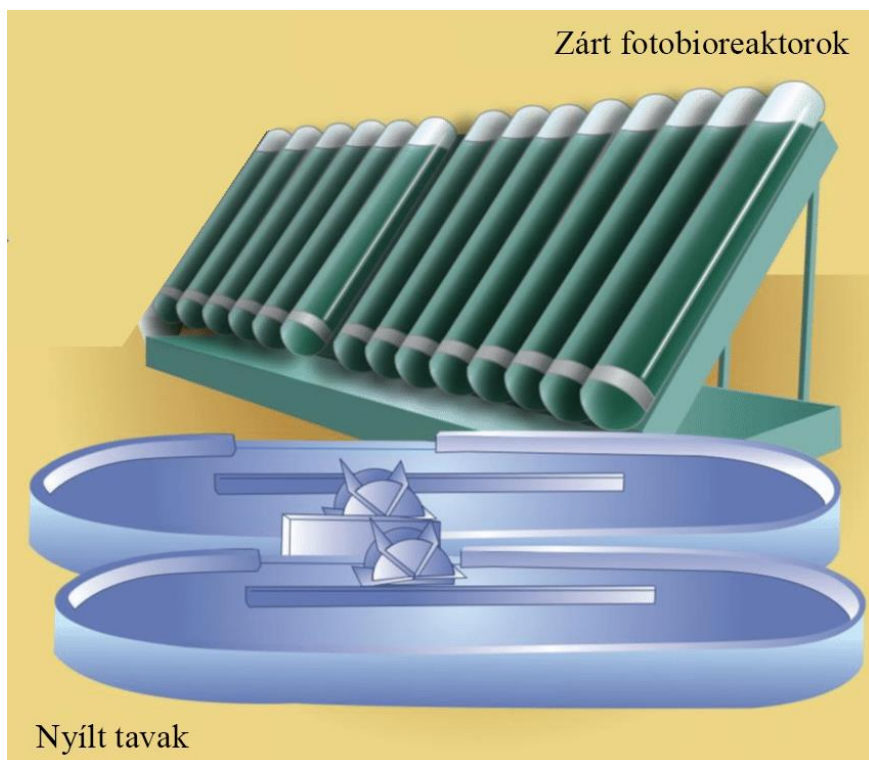


3. ábra: Mikroalgák termesztési módjai [58] alapján.

1.6.1. Autotróf növekedés

A nyílt tavak a legelterjedtebb termelési mód és a legolcsóbb módszer a nagyüzemi biomassza előállítására. Ezeket a rendszereket a természetes vizek (tavak, lagúnák és tavak) vagy szennyvíz, illetve mesterséges tavak vagy konténerek kategóriájába soroljuk. Általában erőművek vagy nagy szén-dioxid-kibocsátással járó nehézipar mellett építik őket, ahol a biomassza nitrogént vesz fel a légkörből NO_x formájában. Annak érdekében, hogy az összes sejtet könnyen napfény érje – különösen az exponenciális növekedési fázis végén –, a tó optimális mélységét 15-50 cm [22] közé kell megválasztani. Másrészt a nyitott tórendszereknek vannak bizonyos korlátai, mivel szigorú környezeti ellenőrzést igényelnek a szennyezés, a vízpárolgás, a betolakodó baktériumok és más algafajok szaporodási kockázatának elkerülése érdekében. Ezenkívül az évszakos változásokból adódó hőmérséklet-különbségeket ezekben a rendszerekben nem lehet szabályozni, továbbá a CO_2 -koncentráció és a túlzott napfény-expozíció is nehezen kezelhető. Ráadásul az exponenciális növekedési fázis vége felé néhány sejtet nem ér elegendő napfény, mert a felszín közelében lebegő más sejtek eltakarják őket, ami alacsonyabb tömeghozamot eredményez. Ezért a közeg keverése javasolt, amely jelenleg is bevett gyakorlat ilyen technológiai megoldások esetében.

A zárt fotobioreaktor technológiát elsősorban a nyílt tavi rendszerek néhány korlátozó tényezőjének leküzdése érdekében vezették be (4. ábra), így a biomasszát irányított környezetben (pH, fényintenzitás, hőmérséklet, szén-dioxid-koncentráció) termesztik, hogy nagyobb sejtkoncentrációt, valamint olyan termékeket kapjanak, amelyek alkalmasabbak tiszta gyógyszerek, táplálék- és kozmetikai termékek előállítására. Ezenkívül ezek a rendszerek jobban megfelelnek az érzékeny törzsek számára is, amelyek nem képesek növekedni zord környezeti körülmények között. A biomassza CO_2 -vel történő táplálása csöveken keresztül, injektálással történik. Fénycsöveket használnak abban az esetben, ha a csövek nincsenek vagy nem eléggé vannak kitéve napfénynek. A csövek átmérője általában 20 cm vagy annál kisebb [59], és átlátszó faluk vastagsága néhány milliméter, ami lehetővé teszi a megfelelő fényelnyelést. Ezért többféle kialakítást alkalmaztak és teszteltek: síklemezes fotobioreaktor [60], csöves fotobioreaktor [61] és oszlopos fotobioreaktor [62]. Degen és munkatársai [63] 0,11 g/L/h száraz biomassza termelékenységet értek el, miután a *C. vulgaris* sejteit egy lapos paneles, levegőbefűjéses fotobioreaktorban folyamatos megvilágítás mellett ($980 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) termesztették. Mindazonáltal a zárt rendszer fő hátrányai közé sorolhatók a bonyolult konstrukcióból eredő többletköltségek, a kis megvilágítási terület és a sterilizálási költségek [64].



4. ábra: Autotróf növekedési technológiák [65] alapján.

1.6.2. Heterotróf növekedés

Ezen technológiák előnye, hogy nem igényel fényt, amely során a biomasszát szerves szénforrással táplálják. Így a mikroalgákat kevert tartályos bioreaktorban vagy fermentorban termesztik, ahol nagyobb mértékű növekedés várható, amely alacsony betakarítási költséggel párosul, az elért magasabb száraz biomassza termelékenységnek (akár 0,25 g/L/nap) és a különböző komponensek, például a lipidek 22-54 mg/L/nap nagymértékű felhalmozódásának köszönhetően [66]. A *C. vulgaris* esetében használt szénforrások a glükóz, az acetát, a glicerint és a glutamát, a maximális fajlagos növekedési sebességet a glükózzal érték el. Ennek a rendszernek a legnagyobb hátránya azonban a cukrok ára és elérhetősége, amelyek versenyeznek az egyéb felhasználású alapanyagokkal, például az élelmiszer- és bioüzemanyag-előállítással.

1.6.3. Mixotróf növekedés

A *C. vulgaris* képes az autotróf és a heterotróf termesztési technológiák kombinálására, mivel fotoszintézist végez, valamint szerves anyagokat, például glükózt vesz fel. Ezért a sejtek növekedése nem függ szigorúan csakis a fénytől vagy a szerves szubsztráttól. Ez a technológia versenyképes az autotróf rendszerekkel, és Yeh és Chang [66] szerint a mixotróf körülmények

magas száraz biomassza-termelőkéességet (2-5 g/L/nap) és lipidtermelőkéességet (67-144 mg/L/nap) mutatnak. A mixotróf anyagcsere fő előnyei a sötét légzés során fellépő biomasszaveszteség hatásának korlátozása és a biomassza növekedéséhez felhasznált szerves szubsztrát mennyiségének csökkentése.

1.6.4. Egyéb tenyésztési módszerek

A *C. vulgaris* növekedése egy újabb dimenziót jelenthet az *Azospirillum brasilense* baktérium alginátgyöngyökben történő együttes immobilizálásával [67]. Ezt a technológiát a *C. vulgaris*ra és más mikroalgákra is kiterjesztették abból a hipotézisből kiindulva, hogy az *A. brasilense* stimulálja a szárazföldi növények növekedési ütemét azáltal, hogy beavatkozik a gazdanövény hormonális anyagcseréjébe, és O_2 -t biztosít a baktérium számára a szennyező anyagok biológiai lebontásához, majd a mikroalga elfogyasztja a baktériumok légzéséből felszabaduló CO_2 -t [68]. Következésképpen a *C. vulgaris* törzsétől függően [69] hatással van az élettartam meghosszabbítására, a biomassza termelés fokozására, a sejtméret növelésére (62%-kal nagyobb), a pigmentek és a lipidek felhalmozására. Ezzel egyidejűleg a szennyvízből származó cink, kadmium, foszfor, nitrogén és egyéb nehézfémek felvétele is növekszik. Másrészt a *C. vulgaris*nak a *Phyllobacterium myrsinacearum* asszociatív baktériummal való termesztése szintén eltérő hatást fejt ki a növekedés leállításával vagy a sejthalállal [70]. Továbbá a keveredés és a nyíróstressz hatással van a *C. vulgaris* fotoszintetikus aktivitására és növekedési ütemére. Így az optimális körülmények (126 cm s^{-1} csúcssebesség és $2,06\text{ cm s}^{-1}$ súrlódási sebesség) 4-5%-kal növelték a fotoszintetikus aktivitást 48-71%-kal erősebb növekedés mellett a nulla csúcssebességhez vagy az elhanyagolható súrlódási sebességhez képest. Mindazonáltal a nagyobb csúcssebesség és súrlódási sebesség mind a fotoszintetikus aktivitást, mind a növekedést a keveretlen állapot értékére, sőt még alacsonyabbra csökkentette [71].

1.7. A *Chlorella vulgaris* alkalmazási lehetőségei

A *C. vulgaris*ban rejlő hatalmas potenciált számos tanulmány feltárta, a 2. táblázat összefoglalja a biokémiai komponensek különböző alkalmazásait.

Kategória	Komponensek	Alkalmazás
Lipidek	Trigliceridek, foszfolipidek, glikolipidek,	Biodízel, állati takarmányok, antibiotikumok
Fehérjék	Aminosavak	Élelmiszer-kiegészítő, állati takarmányok, gyógyszerek, bioműtrágyák, élelmiszer-adalékanyagok, emulgeálószer
Szénhidrát	Keményítő, cellulóz, β -1-3-glükánok, szulfonált poliszacharidok	Élelmiszer-adalékanyagok, gyógyszerek, akvakultúra takarmányok
Pigmentek	β -karotin, asztaxantin, kantaxantin, lutein, klorofill	Gyógyszerek, neutraceutikumok, élelmiszer étrend-kiegészítők, színezékek és festékek, kozmetikumok, akvakultúra takarmányok
Vitaminok és ásványi anyagok	Mikroelemek, makroelemek, A-, B-, C-, E-vitamin	Antioxidánsok, anyagcserét segítő anyagok

2. táblázat: A *Chlorella vulgaris* alkalmazási lehetőségei [26] alapján.

2. Anyag és módszer

2.1 A tápoldatok elkészítésének módszere

A különböző kémiai összetételű tápközegek elkészítéséhez a BG-11 jól ismert tápoldatát vettem alapul, amely egy univerzális táptalaj a kék zöld algák (cianobaktériumok) termesztésére és fenntartására. A BG-11 tápoldat 6 különböző törzsoldatból áll, amelyek pontos összetevőit a 3. táblázat szemlélteti.

Törzsoldatok		Tápoldat [ml/L]	Tápoldat [g/L]
törzsoldat 1	[g/100 ml]	2	
citromsav	0,30		0,006
Ammónium-ferrocitrát	0,30		0,006
EDTA	0,05		0,001
törzsoldat 2	[g/1000 ml]	50	
NaNO ₃	30		1,5
K ₂ HPO ₄	0,78		0,039
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	1,50		0,075
törzsoldat 3	[g/100 ml]	2	
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1,90		0,038
törzsoldat 4	[g/100 ml]	1	
Na ₂ CO ₃	2		0,02
Na ₂ CO ₃ ·10 H ₂ O	5,04		0,0504
törzsoldat 5	[g/1000 ml]	1	
NaMoO ₄ ·2 H ₂ O	0,39		0,00039
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0,079		0,000079
Co(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O	0,0494		0,00004
H ₃ BO ₃	2,86		0,00286
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	1,81		0,0018
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,222		0,000222
törzsoldat 6	[g/200 ml]	1	
HEPES (5mM)	23,83		1,1915

3. táblázat: A BG-11 tápoldat összetevői.

A BG-11 komponenseinek pontos adagolása érdekében az elkészített törzsoldatokból mértem ki a vizsgálatokhoz szükséges mennyiségeket (5. ábra).



5. ábra: A tápoldathoz készített törzsoldatok és a *C. vulgaris*.

A mikroalga szaporítási kísérlethez 4 különböző kémiai összetételű tápközeget készítettem, amelyek a következők voltak:

- kontroll – C (BG-11);
- kezelés 1 – T1 (BG-11 emelt nitrát tartalommal);
- kezelés 2 – T2 (BG-11 emelt foszfát tartalommal);
- kezelés 3 – T3 (BG-11 emelt nitrát- és foszfát tartalommal).

Az össztérfogat minden egyes esetben 4 L volt, amely 3,8 L tápoldatot és 0,2 L mikroalgát tartalmazott. A *Chlorella vulgaris* a bbe Algae Toximeter gyártó által biztosított, a mérőberendezés fotobioreaktorában termesztett készletből származott. A 4 különböző kémiai összetételű tápközeget a már hozzáadott mikroalgákkal – azaz a kísérlet indításának pillanata – a 6. ábrán látható.



6. ábra: kontroll – C; kezelés 1 – T1; kezelés 2 – T2; kezelés 3 – T3.

2.2. A kísérlet környezeti körülményei

Az algaszaporítási kísérlet 7 héten keresztül zajlott heti 1 mintavételezéssel a 4 beállított különböző kémiai összetételű tápoldatban. A vizsgálat ideje alatt a szaporodáshoz szükséges környezeti körülmények közül a hőmérséklet értéke 25°C-ra lett megválasztva, továbbá a fotoszintézishez nélkülözhetetlen fényről egy állandó LED világítás gondoskodott. A LED fényforrás fényerőssége 400 lm, színhőmérséklete 4500 K. A kísérlet teljes időtartama alatt a kiülepedés, valamint az aggregátum képződés megakadályozása érdekében rázatóasztalt alkalmaztam 75 fordulat/perc sebességgel.

2.3. Alkalmazott vizsgálati módszerek

2.3.1. Kémiai paraméterek meghatározása

A kémiai paraméterek közül az NH_4^+ , NO_3^- , K^+ , PO_4^{3-} meghatározására VISOCOLOR ECO gyorsesztet használtam. A VISOCOLOR ECO lehetővé teszi még az alacsony határértékek megfelelő pontosságú meghatározását is. A nagy érzékenységet és pontosságot a precízen adagolható egyedi reagensek, valamint a vízminták zavarosságának és színének kompenzációs lehetősége biztosítja. A KOI meghatározásához NANOCOLOR tesztet használtam, mely sokkal gyorsabb és pontosabb a régebben használt módszereknél.

Az eredmények fotometrikus kiértékelését az erre alkalmas PF-12Plus kompakt fotométerrel végeztem (7. ábra). A PF-12Plus kompakt fotométer a MACHEREY-NAGEL mobil és laboratóriumi használatra szánt szűrőfotométere. A MACHEREY-NAGEL 16 mm-es csövekben lévő kolorimetriás tesztkészletek kiértékelésére szolgál. A PF-12Plus kompakt fotométer 345-690 nm hullámhossz-tartományban teszi lehetővé a méréseket. A xenonlámpa

által keltett fény egy interferenciaszűrőn keresztül jut a műszer küvettanyílásába. A mintán való áthaladás után az elnyelt fény arányát a csillapított fény detektálásával számítja ki. Az elnyelt fény arányát egy tárolt kalibráció segítségével a vizsgált analit koncentrációjává alakítja át. A pH és az elektromos vezetőképesség mérésére az arra rendszeresített HI 83325 Fotométert, valamint ProfiLine pH/Cond 3320-t használtam.



7. ábra: PF-12 kompakt fotométer, NANOCOLOR, VISOCOLOR ECO gyorsesztek [72].

Az abszorpciós értékek meghatározására az UV-6300PC kétsugaras spektrofotométert alkalmaztam, hullámhossz-szkennelési módszerrel (8. ábra). Ez a spektrofotométer képes egyszerre végezni a referencia- és mintaméréseket is. A vizsgálatokat 190-1100 nm közötti hullámhossz-tartományban végeztem, $\pm 0,3$ nm pontossággal. A műszer által gyűjtött adatokat UV-Vis Analyst szoftverrel elemeztem.



8. ábra: UV-6300PC kétsugaras spektrofotométer.

2.3.2. Biológiai paraméterek meghatározása

A klorofill koncentráció, valamint alga aktivitás nyomon követésére bbe Algae Toximétert használtam (9. ábra). A toximéterben az algák folyamatosan szaporodnak egy megvilágított és fűtött tartályban.

A bbe Algae Toximeter fő egységei:

- PC-egység monitorral, billentyűzettel, egérrel és lemezmeghajtóval,
- a klorofill-érzékelő egység tisztítóberendezéssel,
- szivattyúk és szelepek,
- az algaerjesztő a tesztalga folyamatos tenyésztéséhez.



9. ábra: bbe Algae Toximéter II. [73]

A mérések elvégzéséhez kis mennyiségű (~3 dl) minta szükséges. A különböző intenzitású fényimpulzusokra adott fluoreszcens válasz mérésével meghatározható a fotoszintézis fiziológiai aktivitása. Mivel a növények – azaz az algák – fotoszintézis apparátusa érzékenyen reagál a zavarokra, a fotoszintézis megfigyelése nagyon könnyen használható, mint a mérgezés indikátora. Mivel a tenyészetből kivett algák élettana is változhat az idő múlásával, a műszer az algák aktivitását is méri, amikor tiszta vízhez adjuk őket. Következésképpen szükségessé válik a mintából származó algák aktivitásának mérése, mivel ezeket az algákat korábban nem távolították el a vízáramból. Ennek előnye, hogy információt kaphatunk a vízi algák

koncentrációjáról. Az alगतoximéterbe épített klorofillérzékelők jellemzője, hogy a mért klorofill koncentrációt az algák osztályaihoz lehet rendelni. A mérési elv az algák fluoreszcencia-spektrumának és fluoreszcencia-kinetikájának meghatározásán alapul. Ennek a módszernek az az előnye, hogy gyors eredményt szolgáltat az algák állapotáról; ezzel ellentétben az algák növekedését gátló vizsgálat akár 72 órán keresztül is tarthat. A bbe Algae Toximeter mérési ideje mindössze 30 perc. A fluoreszcencia egy anyag utófénye, miután az anyagot megvilágították fénnel. A fluoreszcencia az a jelenség, amikor a fluoreszcens molekula egy adott hullámhosszúságú fényt elnyelve hosszabb hullámhosszúságú fényt bocsát ki. Egyes molekulák különösen intenzíven fluoreszkálnak, például a növények, algák és a cianobaktériumok zöld színű pigmentje – azaz a klorofill – amely a napfényt fogja fel. A befogott fényt főként kémiai energiává alakítják át (fotoszintézis). Az energia egy kis része visszahatásként elvész. Ez az energiavesztés fluoreszcenciában fejeződik ki, és fényérzékeny érzékelők segítségével mérhető. Mivel az egészséges algák a fotoszintetikus tevékenység következtében kisebb mennyiségű energiát veszítenek, mint a sérült vagy akár az elhalt algák, az algák állapotát a kis fényimpulzusokra adott reakció mérésével lehet meghatározni.

Az algák aktivitásának mérése a gyenge fényimpulzusra adott fluoreszcens válaszra vonatkozik, két különböző körülmény között. Az egyik mérés nagyon erős háttérfénnyel, a másik pedig anélkül történik. Az algák a fényt energiaforrásként használják a fotoszintézishez. További háttérfény nélkül a fényimpulzus nagy részét használják fel. Így nem bocsátanak ki fényt fluoreszcencia formájában. Ha azonban elegendő fény van jelen, az erős háttérfény miatt a fényimpulzusra adott fluoreszcens válasz szintje jelentősen megnő. Amennyiben a sejt sérült, a fényt a sejt nem használja fel, és még további háttérfény nélkül is magasabb a fényimpulzusra adott fluoreszcens válasz. Az úgynevezett Genty-paraméter összegzi a folyamatot, és az alga aktivitásának mértékét adja meg (1).

$$\text{Genty} = 100 \cdot \frac{F_m - F_0}{F_m} [\%] \quad (1)$$

ahol,

Genty: az algák aktivitását mutatja százalékban, ahol az algától függően, osztályától és a fiziológiai állapotától függően akár 75% is elérhető.

F_0 : fluoreszcencia-válasz háttérfény nélkül.

F_m : fluoreszcencia-válasz erős háttérfénnyel.

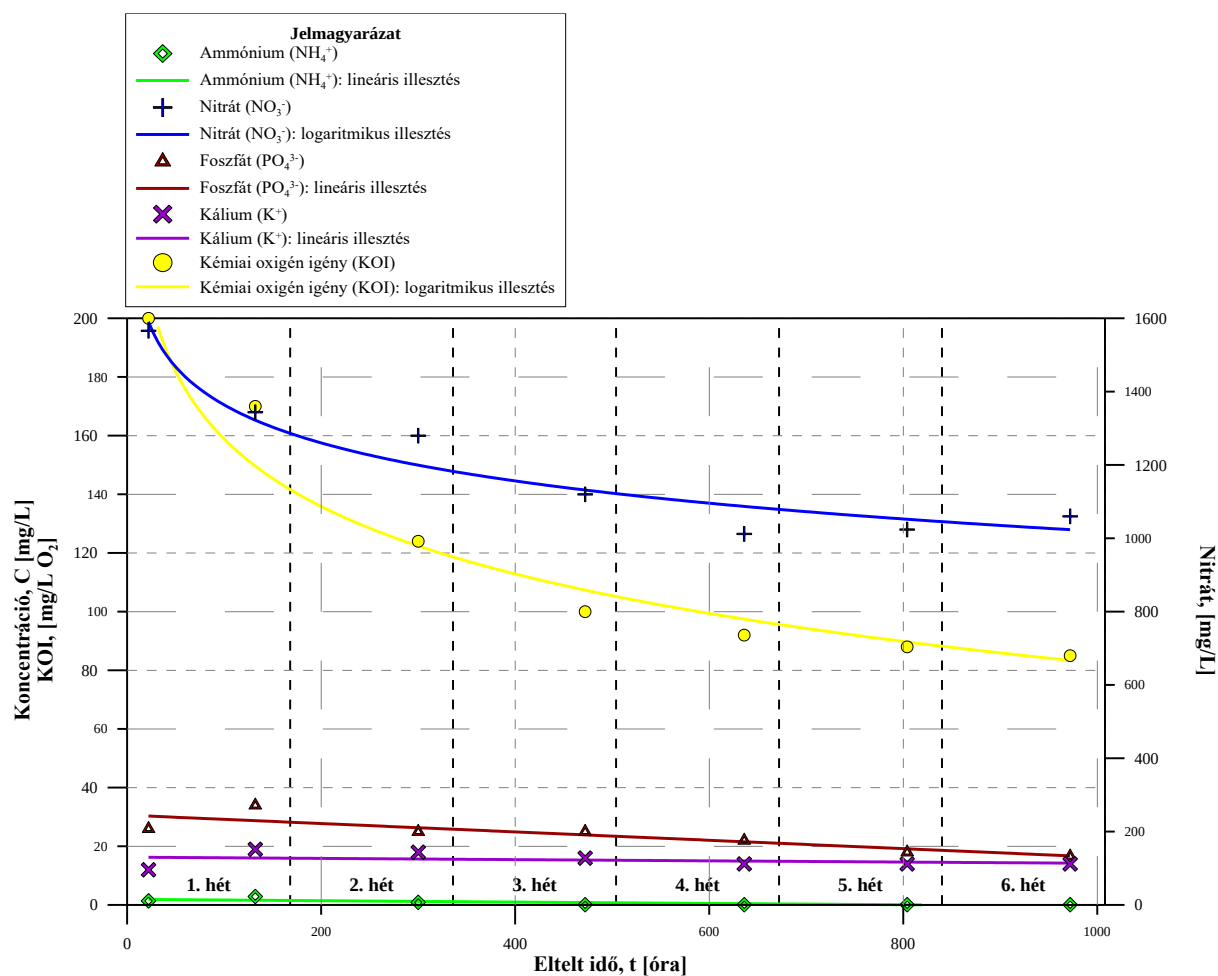
A különböző algák osztályait pigmentjeik és így a különböző színű fényre adott eltérő fluoreszcens reakcióik alapján lehet megkülönböztetni. Minden algaosztálynak megvan a maga jellegzetes „ujjlenyomata”, azaz egy speciális mintázat, amely szerint különböző gerjesztési hullámhosszokra reagálnak. A különböző algaosztályok megkülönböztetéséhez a keverék spektrumát rögzítik, és statisztikai számítási eljárással meghatározzák a mintában lévő különböző algaosztályokat.

3. Eredmények és azok értékelése

3.1. Kémiai paraméterek

3.1.1. C (kontroll) tápközeg

A kémiai paramétereket a kísérlet ideje alatt heti rendszerességgel mértem, alakulásukat a kontroll közegben az 10. ábra szemlélteti. A nitrát tartalom kezdeti ~1600 mg/L koncentrációja a kísérlet végére ~1000 mg/L-re csökkent, tehát 33%-a (600 mg/L) épült be a kontroll tápoldat esetén. A KOI értéke ~200 mg/L O_2 -ről ~100 mg/L O_2 -re csökkent. Ez alapján elmondható, hogy az algák képesek voltak eltávolítani a KOI 50%-át. A kálium tartalom 19 mg/L körül stagnált, a foszfát pedig 34 mg/L-ről 16,6 mg/L-re csökkent a 7. hétre. A tápoldatból az algák leghamarabb az ammóniumot merítették ki, a 4. hét elejére szinte teljesen lecsökkent a koncentrációja, a kezdeti 2,9 mg/L-ről 0,1 mg/L alá.



10. ábra: A kémiai paraméterek alakulása a C (kontroll) tápközegben.

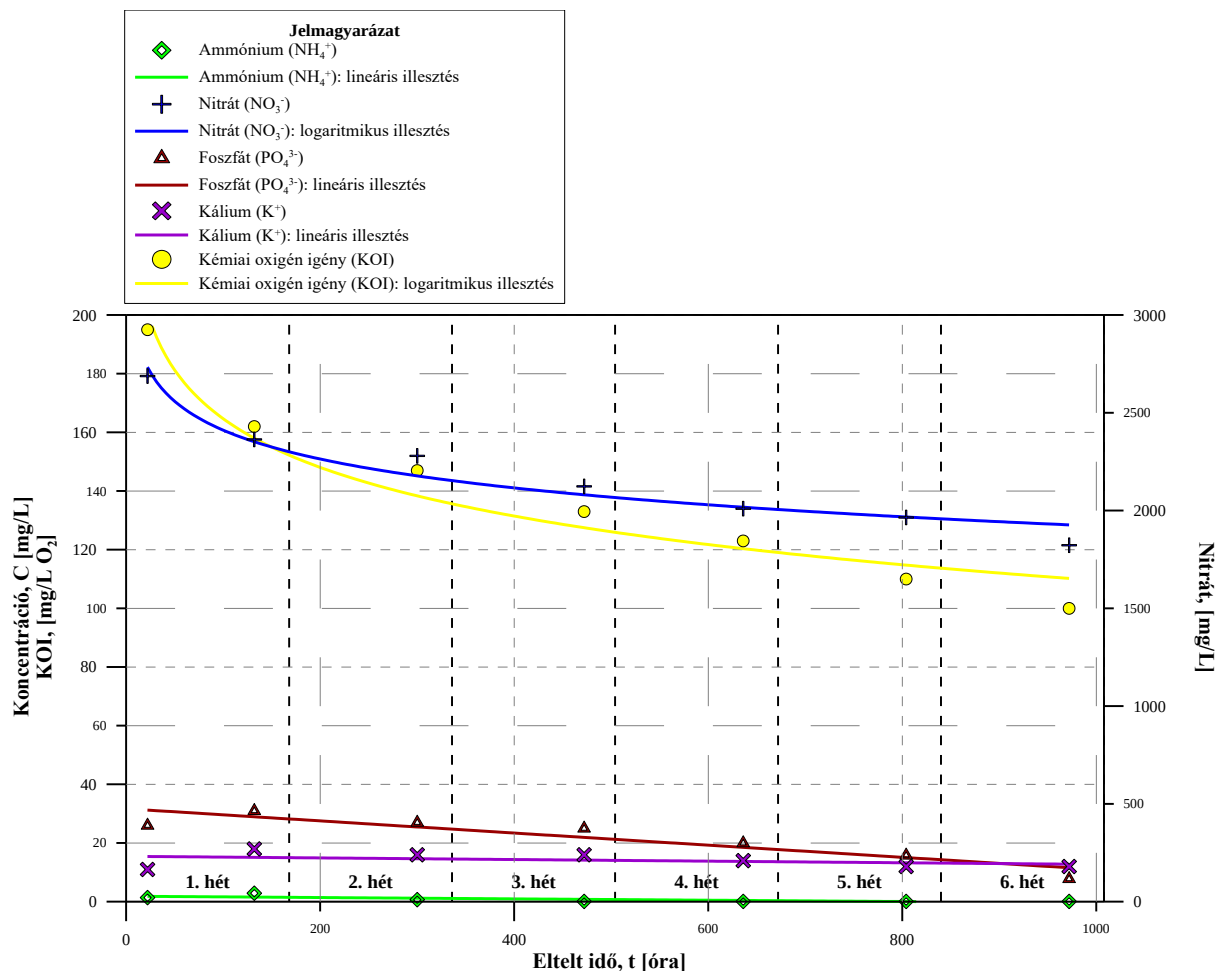
A kémiai oxigénigény és a nitrát tartalom értékeire az illesztés típusa alapján logaritmikus csökkenés, míg a kálium, a foszfát és az ammónium koncentrációra lineáris csökkenés volt a jellemző (4. táblázat). A lineáris illesztések esetében a determinációs együttható (R^2) értéke 0,8 körül, míg a logaritmikus illesztések esetében 0,95 körül alakult. A változások mértéke és iránya összhangban volt a mikroalgák szaporodásával, valamint aktivitásával.

Kémiai paraméter	Illesztés típusa	Illesztett egyenes/görbe egyenlete	Determinációs együttható (R^2)
Ammónium	lineáris	$Y = -0,0023 \cdot X + 1,9024$	0,78
Nitrát	logaritmikus	$Y = -149,6700 \cdot \ln(X) + 2053,0943$	0,93
Foszfát	lineáris	$Y = -0,0142 \cdot X + 30,6059$	0,74
Kálium	lineáris	$Y = -0,0021 \cdot X + 16,2799$	0,85
KOI	logaritmikus	$Y = -33,1977 \cdot \ln(X) + 311,7459$	0,95

4. táblázat: A kémiai paraméterekre illesztett egyenletek C közeg esetén.

3.1.2. T1 (BG-11 emelt nitrát tartalommal) tápközeg

A T1 kezelés kémiai paramétereinek változását az 11. ábra mutatja be. A nitrát tartalom kezdeti ~2750 mg/L koncentrációja ~1900 mg/L-re csökkent, azaz 31%-a (850 mg/L) épült be a mikroalgák sejtszerkezetébe. A magasabb kiindulási koncentráció a kontrollhoz képest a tápoldat nitrát tartalmának megemeléséből adódik. A KOI értéke hasonlóan a kontroll közegben tapasztaltakhoz ~200 mg/L O_2 -ről ~100 mg/L O_2 -re csökkent. A kálium tartalom 18 mg/L-ről 12 mg/L-re, a foszfát pedig 31 mg/L-ről 7,8 mg/L-re redukálódott a kísérlet végére. A tápoldatból az algák ebben az esetben is leghamarabb az ammóniumot merítették ki, szintén a 4. hét elejére lecsökkent a koncentrációja, a kezdeti 2,9 mg/L-ről 0,1 mg/L-re.



11. ábra: A kémiai paraméterek alakulása a T1 (BG-11 emelt nitrát tartalommal) tápközegben.

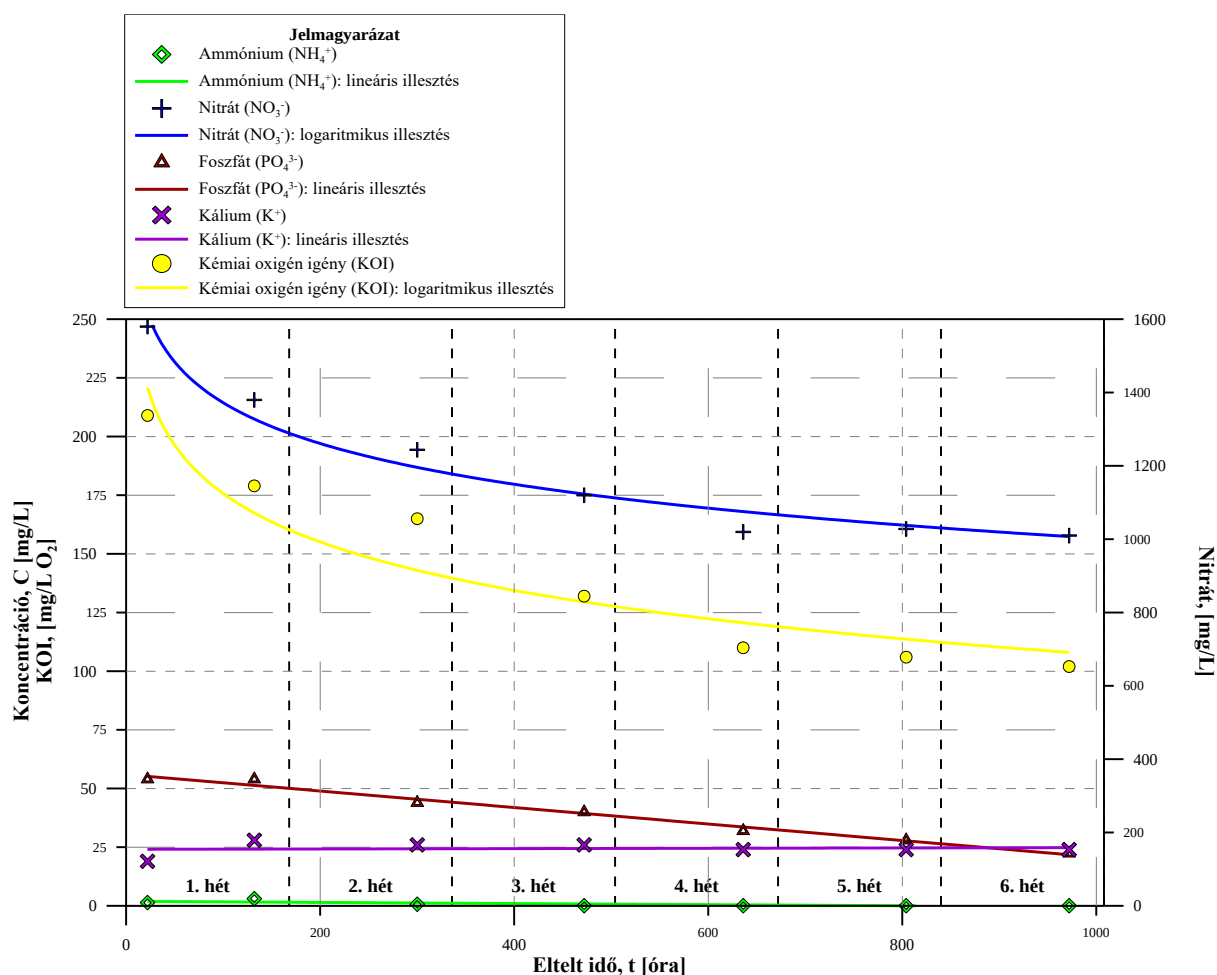
A kontroll kezeléshez hasonlóan a kémiai paraméterek logaritmikus (KOI, Nitrát), valamint lineáris (kálium, foszfát, ammónium) csökkenést mutattak (5. táblázat). A kapott determinációs együtthatók értéke is hasonlóan alakult, mint a kontroll kezelés esetében.

Kémiai paraméter	Illesztés típusa	Illesztett egyenes/görbe egyenlete	Determinációs együttható (R^2)
Ammónium	lineáris	$Y = -0,0022 \cdot X + 1,8509$	0,75
Nitrát	logaritmikus	$Y = -213,0298 \cdot \ln(X) + 3392,1577$	0,94
Foszfát	lineáris	$Y = -0,0206 \cdot X + 31,6661$	0,83
Kálium	lineáris	$Y = -0,0027 \cdot X + 15,4559$	0,63
KOI	logaritmikus	$Y = -23,9469 \cdot \ln(X) + 274,9281$	0,95

5. táblázat: A kémiai paraméterekre illesztett egyenletek T1 közeg esetén.

3.1.3. T2 (BG-11 emelt foszfát tartalommal) tápközeg

A T2 közegben mért eredményeket az 12. ábrán összegeztem. Mivel a T2 tápoldat nitrát tartalma változatlan a kontrollhoz képest, a kiindulási ~ 1600 mg/L koncentráció ~1000 mg/L-re csökkent, azaz a kiindulási mennyiség 33%-a (600 mg/L) épült be a T2 kezelés esetében is. A KOI koncentráció ~225 mg/L O₂-ről ~100 mg/L O₂-re csökkent, így megállapítható, hogy az algák képesek voltak eltávolítani a KOI 55%-át. A kálium tartalom 24-26 mg/L között stagnált, a foszfát pedig 54 mg/L-ről 28 mg/L-re csökkent a 7. hétre. Az kontrollhoz képest emelkedett koncentrációk oka a BG-11-ben módosított K₂HPO₄, mely egyben növelte a kálium és foszfát tartalmat is. A tápoldatból az algák leghamarabb ebben az esetben is az ammóniumot merítették ki. A 4. hét elejére a kezdeti 3,1 mg/L-ről szinte teljesen 0-ra csökkent az ammónium koncentrációja.



12. ábra: A kémiai paraméterek alakulása a T2 (BG-11 emelt foszfát tartalommal) tápközegben.

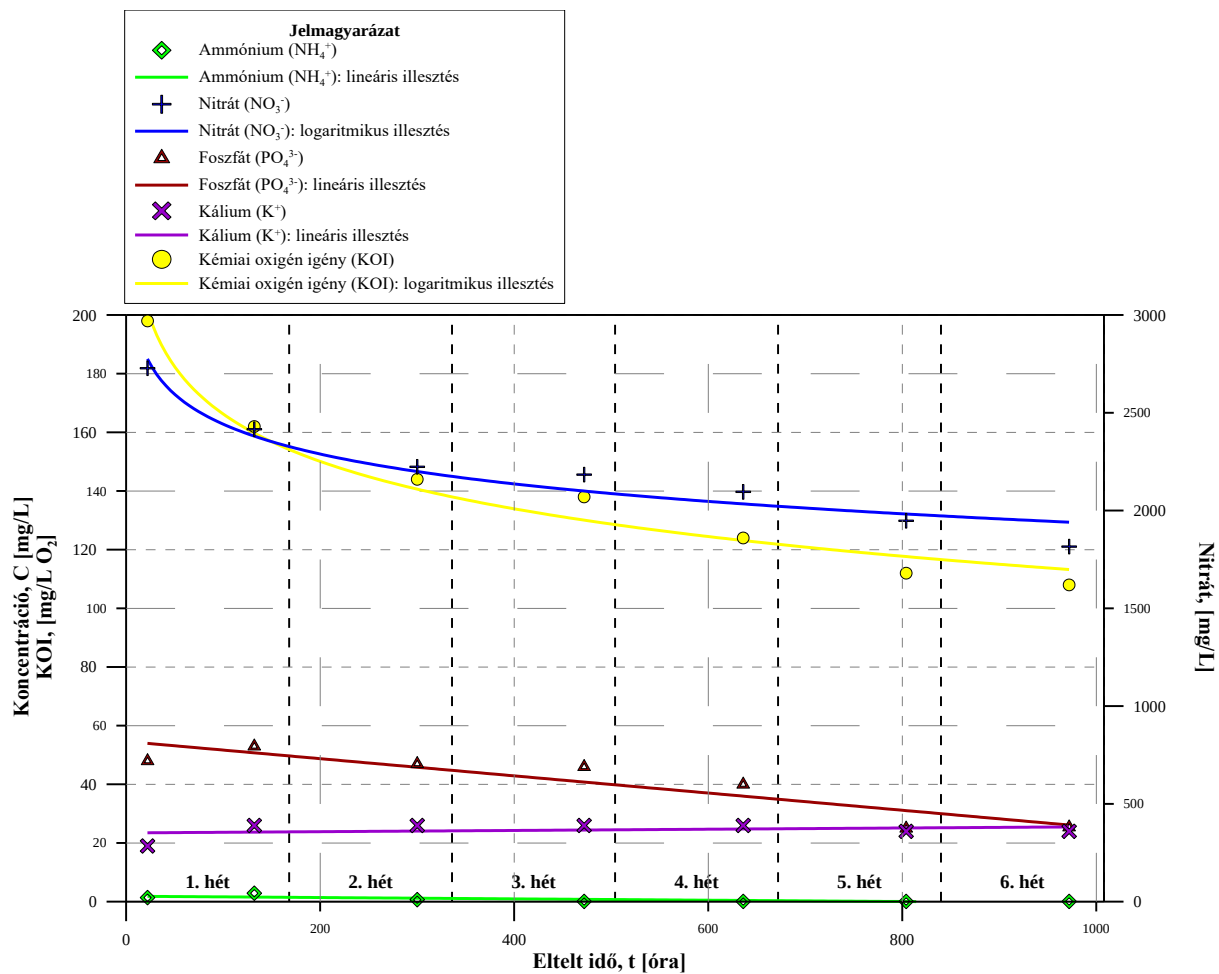
Az előbbi két kezeléshez hasonlóképpen a kémiai oxigénigény és a nitrát tartalom értékeire logaritmikus, míg kálium, a foszfát és az ammónium koncentrációkra lineáris csökkenés volt a jellemző (6. táblázat). A legjobb determinációs együtthatót a mért nitrát eredményekre illesztett logaritmikus egyenlet adta ($R^2=0,97$).

Kémiai paraméter	Illesztés típusa	Illesztett egyenes/görbe egyenlete	Determinációs együttható (R^2)
Ammónium	lineáris	$Y=-0,0023 \cdot X+1,9242$	0,73
Nitrát	logaritmikus	$Y=-160,5128 \cdot \ln(X)+2111,4061$	0,97
Foszfát	lineáris	$Y=-0,0351 \cdot X+55,9577$	0,98
Kálium	lineáris	$Y=0,0007 \cdot X+24,0836$	0,78
KOI	logaritmikus	$Y=-29,7858 \cdot \ln(X)+312,8895$	0,90

6. táblázat: A kémiai paraméterekre illesztett egyenletek T2 közeg esetén

3.1.4. T3 (BG-11 emelt nitrát- és foszfát tartalommal) tápközeg

Az 13. ábra mutatja a T3 kezelés kémiai paramétereiknek változását. A nitrát tartalom kezdeti ~2750 mg/L koncentrációja ~1900 mg/L-re csökkent, azaz a nitrát 31%-a (850 mg/L) épült be a különböző algaosztályok sejtjeibe. A magasabb kiindulási koncentráció a kontrollhoz képest a tápoldat NaNO_3 tartalmának megemeléséből adódik. A KOI koncentráció, hasonlóan a kontroll közegben tapasztaltakhoz ~200 mg/L O_2 -ről ~100 mg/L O_2 -re redukálódott. A kálium tartalom 20 mg/L-ről 26 mg/L-re nőtt, a foszfát pedig 53 mg/L-ről 25,4 mg/L-re csökkent a kísérlet végére. Az kontrollhoz képest emelkedett koncentrációk oka, hasonlóan a T2-es kezeléshez, a módosított K_2HPO_4 mennyiség, mely egyben növelte a kálium és foszfát tartalmat is. A tápoldatból az algák ebben az esetben az ammóniumot merítették ki, amely koncentrációja szintén a 4. hétre csökkent közel 0-ra, a kezdeti 2,9 mg/L-es értékeről.



13. ábra: A kémiai paraméterek alakulása a T3 (BG-11 emelt nitrát- és foszfát tartalommal) tápközegben.

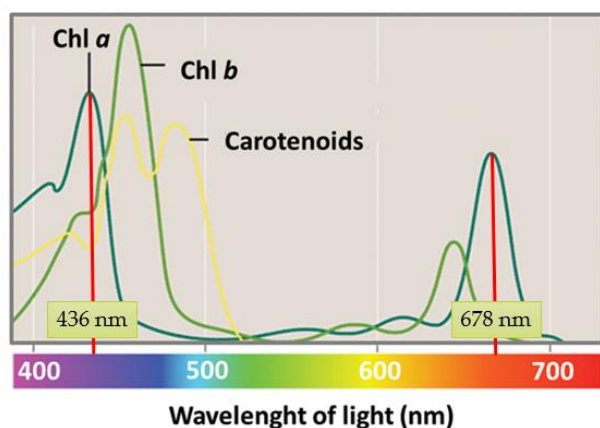
Ugyanúgy, mint az összes többi tápoldat esetében, a kémiai paraméterek közül a KOI és a nitrát logaritmikus, míg a kálium, a foszfát és az ammónium lineáris csökkenést mutattak (7. táblázat).

Kémiai paraméter	Illesztés típusa	Illesztett egyenes/görbe egyenlete	Determinációs együttható (R^2)
Ammónium	lineáris	$Y = -0,0022 * X + 1,8509$	0,75
Nitrát	logaritmikus	$Y = -220,4516 * \ln(X) + 3456,9899$	0,94
Foszfát	lineáris	$Y = -0,0293 * X + 54,6007$	0,83
Kálium	lineáris	$Y = 0,0020 * X + 23,4293$	0,81
KOI	logaritmikus	$Y = -23,3153 * \ln(X) + 273,6173$	0,97

7. táblázat: A kémiai paraméterekre illesztett egyenletek T3 közeg esetén.

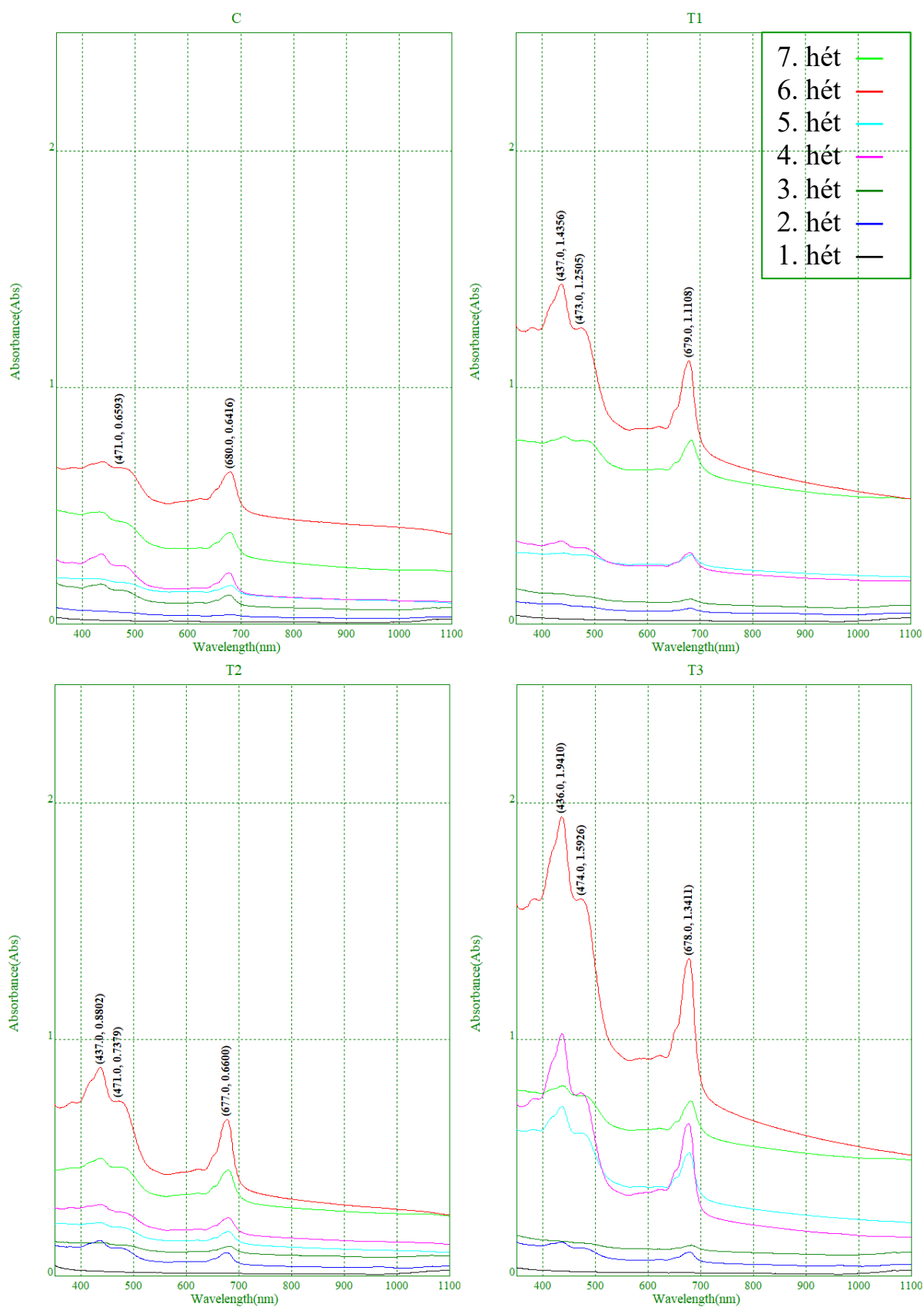
3.2. Abszorbancia értékek összehasonlítása C, T1, T2 és T3 tápközeg esetén

Az algatermesztés nyomon követéséhez heti rendszerességgel vizsgáltam azt is, hogy milyen jellegzetes csúcsok jelennek meg a klorofill koncentrációhoz kapcsolódóan illetve hogy a jellegzetes helyeken megjelenő abszorbancia értékek hogyan korrelálnak az algatoxicitás mérő berendezés által mért klorofill koncentrációkkal. A szakirodalom alapján a klorofill A 436 nm-nél és 678 nm-nél mutat jellegzetes abszorpciós értékeket (14. ábra).



14. ábra: klorofill A abszorpciós értékek [74]

Annak érdekében, hogy pontos képet kapjunk a minták UV-Vis spektrumáról, a küvettákba helyezett tápoldatokat 5 percig ultrahangos fürdőbe helyeztek. Ezzel kvázi megelőzhető, hogy nagyobb alga aggregátumokra mérjünk rá, amely pontatlan eredményeket adna vissza. A következő ábrán (15. ábra) az általam mért adatokat szemléltetem C, T1, T2 és T3 tápközegekre vonatkoztatva.



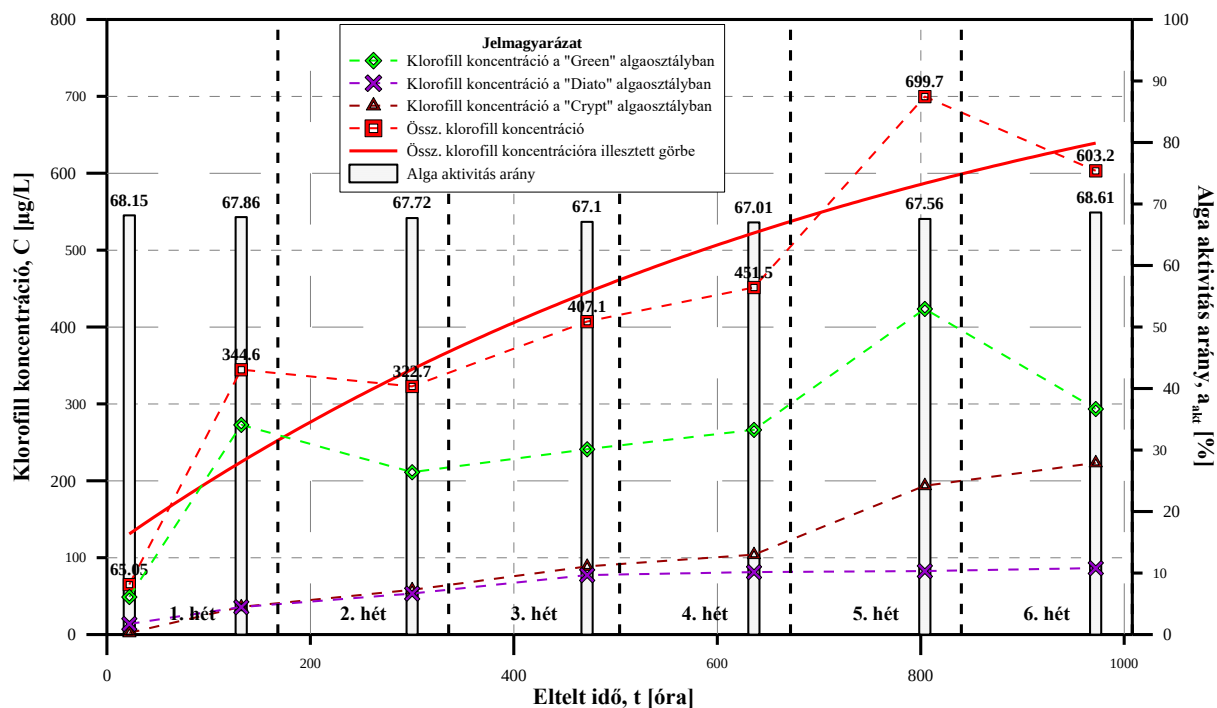
15. ábra: Az abszorbania értékek összehasonlítása C, T1, T2 és T3 tápközeg esetén.

Az UV-Vis spektrofotométer eredményei összhangban vannak a mikroalga termesztéssel, a klorofill A növekedése miatt a vörös tartományban 680 nm-en, a kék tartományban 430 és 470 nm-en tapasztaltunk nagyobb abszorpciós értékeket. Lényegi különbség a kezelések között az abszorpciós értékekben mutatkozott. A kontrollhoz képest a T1 (437.0 nm→1,4356; 679 nm→1,1108) és T3 (436.0 nm→1,9410; 678 nm→1,3411) kezelések eredményei a legszembetűnőbbek. Ennek oka lehet, hogy mind a két esetben emelt nitrát tartalommal rendelkezett a közeg, aminek köszönhetően az algák magasabb biomassza tömeget produkáltak.

3.3. Biológiai paraméterek

3.3.1. C (kontroll) tápközeg

A kontroll tápoldat esetén (16. ábra) az össz klorofill koncentráció emelkedő tendenciát mutatott, amely az 5. hét végére érte el a legmagasabb, 699,7 µg/L értéket a kísérlet során. A vizsgálat során 3 algaosztályt detektálunk: „Green”, „Diato” és „Crypt”. A legmagasabb arányban a „Green” algaosztály volt jelen, melyhez a vizsgált *Chlorella vulgaris* mikroalgák is tartoznak. A 6. hétre az össz klorofill koncentráció csökken, mely láthatóan a „Green” algaosztály pusztulásának eredménye lehet. A klorofill koncentrációs értéke 423,6-ról 293,4 µg/L-re esett vissza. Ennek oka az N, P, K, tápanyagok fogyása lehet a kísérlet végére a termesztő közegben. Ezzel szemben a „Diato” algaosztály klorofill koncentrációja stagnál, míg a „Crypt” algaosztályé növekedésnek indult. A növekedés oka valószínűleg az alga szukcesszió eredménye. Az alga aktivitás a kísérlet során közel állandó értéken, 67-68% között mozgott.



16. ábra: A biológiai paraméterek alakulása C (kontroll) tápközegben.

A mikroalga növekedést exponenciális egyenlettel jellemeztem, az össz klorofill koncentrációra a Grapher szoftver által illesztett görbe egyenlete a következő (2):

$$Y = C_{\max} \cdot (1 - A \cdot e^{-B \cdot x}) \quad (2)$$

ahol,

A és B a görbére jellemző konstansok (alaki tényezők),

C a görbe elméleti maximum értéke.

A szoftver iterációs eljárás segítségével meghatározta az illesztett egyenlet konstans paramétereinek értékeit, amelyek a következők:

$$C_{\max} = 865,4923$$

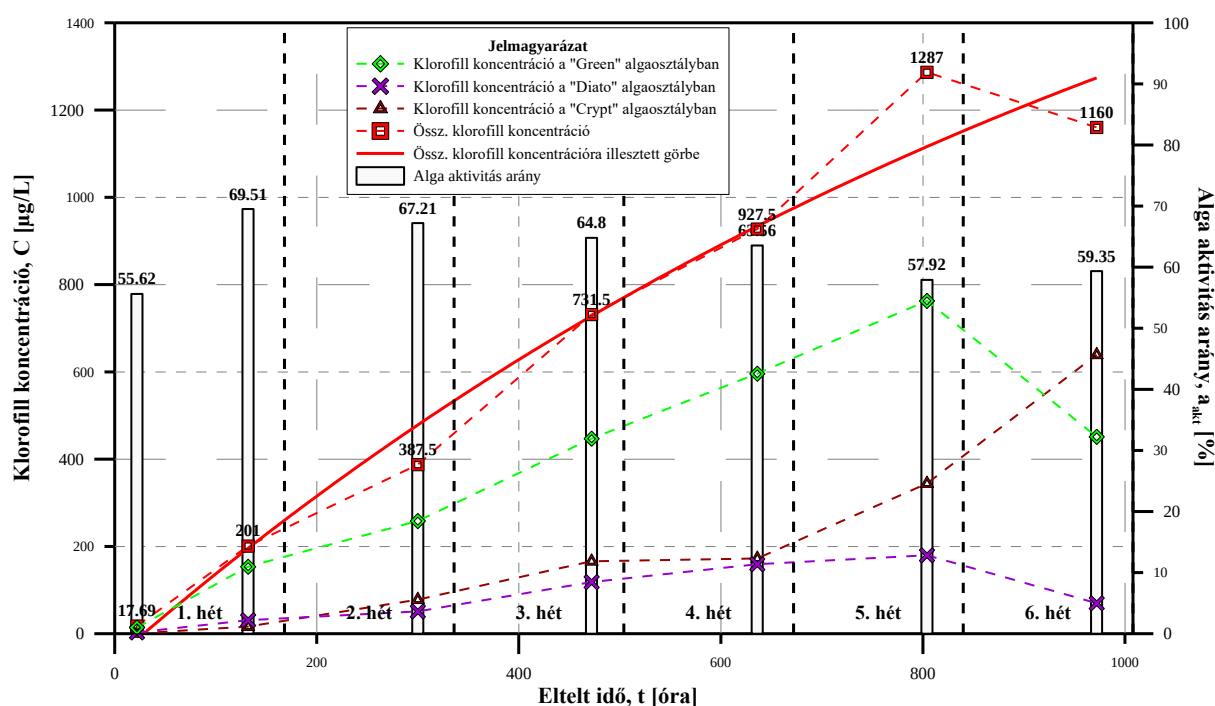
$$A = 0,8721$$

$$B = 0,0012$$

A determinációs együttható (R^2) értéke 0,84 volt.

3.3.2. T1 (BG-11 emelt nitrát tartalommal) tápközeg

A T1 tápoldat esetén (17. ábra) az össz klorofill koncentrációja meredek növekedési tendenciát mutatott, és az 5. hét végére érte el a maximális, 1287 $\mu\text{g/L}$ értéket a kísérlet során. A kontroll kezeléshez képest szinte a duplájára nőtt ez az érték, amely a megemelt nitrát tartalommal hozható összefüggésbe. A vizsgálatok során itt is 3 algaosztályt detektálunk: „Green”, „Diato” és „Crypt”. A legmagasabb arányban a „Green” algaosztály volt jelen. A 6. hétre a klorofill koncentráció csökkenni kezdett, mely láthatóan a „Green”, valamint a „Diato” algaosztály pusztulásának eredménye. A „Green” klorofill koncentrációja 762,8-ról 451,3-ra, a „Diato”-é 179,8-ról 69,9 $\mu\text{g/L}$ -re redukálódott. Ennek oka valószínűleg az N, P, K, tápanyagok fogyása a kísérlet végére a tápoldatban. Ezzel szemben a „Crypt” algaosztály koncentrációja kiugró növekedésnek indult, melynek oka ismételt az alga szukcesszió lehet. Az alga aktivitás a kísérlet során 69,51%-ról 59,35%-ra csökkent.



17. ábra: A biológiai paraméterek alakulása T1 (BG-11 emelt nitrát tartalommal) tápközegben.

A mikroalga növekedést a kontroll esetében is ismertett exponenciális egyenlettel jellemeztem, amelyhez kapcsolódóan az iterált paraméterek és determinációs együttható értéke a következőképpen alakult:

$$C_{\max} = 2277,2348$$

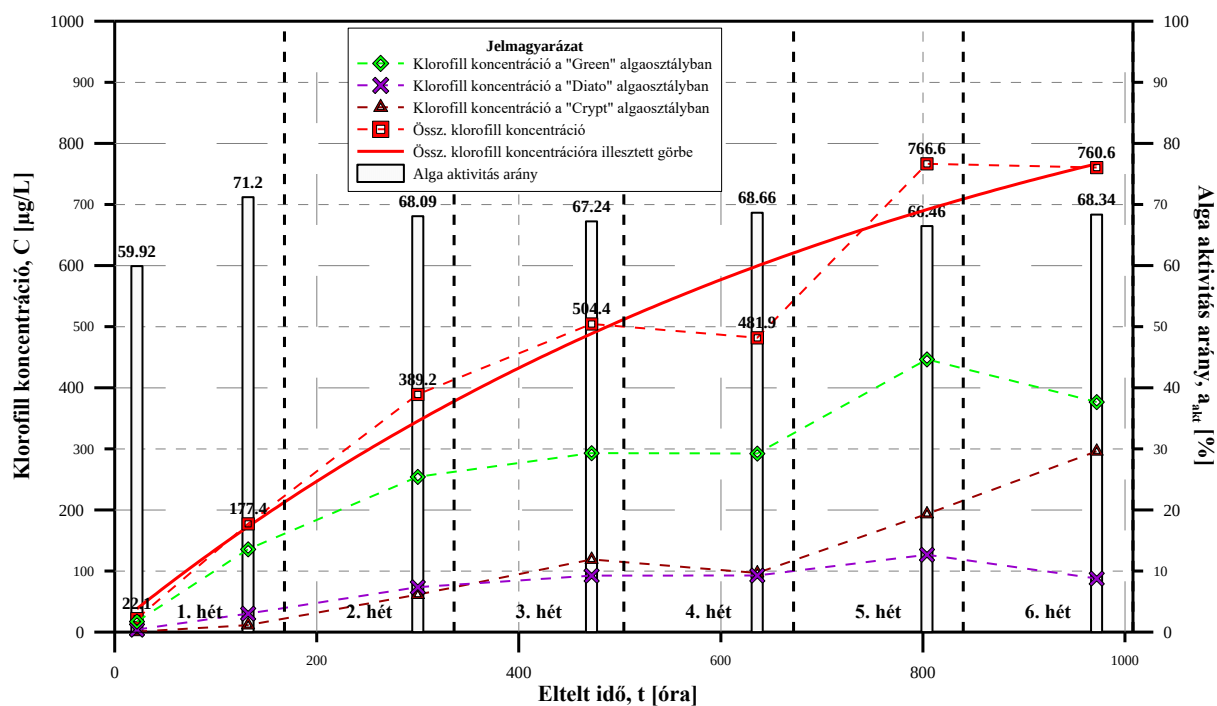
$$A = 1,0251$$

$$B = 0,0008$$

$$R^2 = 0,96$$

3.3.3. T2 (BG-11 emelt foszfát tartalommal) tápközeg

A T2 tápoldat esetén (18. ábra) az össz klorofill koncentráció szintén növekvő görbét ír le, amely az 5. hét végére éri el a maximális (766,6 $\mu\text{g/L}$) értékét a kísérlet során. Ezek alapján elmondható, hogy a megemelt foszfát tartalom a T1-es nitrát koncentráció emeléssel szemben nem bizonyult olyan hatékonynak a biomassza tömeg gyarapodását tekintve. A vizsgálatok során a 3 detektált algaosztályból a legmagasabb arányban a „Green” algaosztály volt jelen. Hasonlóan a T1-es kezeléshez a 6. hétre a klorofill koncentráció visszaesett, mely valószínűleg a „Green”, valamint a „Diat” algaosztály pusztulásának eredménye. A „Green” algaosztály klorofill koncentrációja 446,5-ről 376,7-re, a „Diat”-é 126,7-ről 87,8 $\mu\text{g/L}$ -re csökkent, amely ismételten az N, P, K, tápanyagok fogyásával magyarázható. Ezzel szemben a „Crypt” algaosztály koncentrációja a kísérlet végére növekvő tendenciát mutatott. Az alga aktivitás értéke a kísérlet során 66,46% és 71,2% között változott.



18. ábra: A biológiai paraméterek alakulása T2 (BG-11 emelt foszfát tartalommal) tápközegben.

Az ismertetett exponenciális egyenlet konstans paraméterei, valamint a determinációs együttható értéke T2 tápoldat esetében az alábbiak szerint alakult:

$$C_{\max} = 1089,2491$$

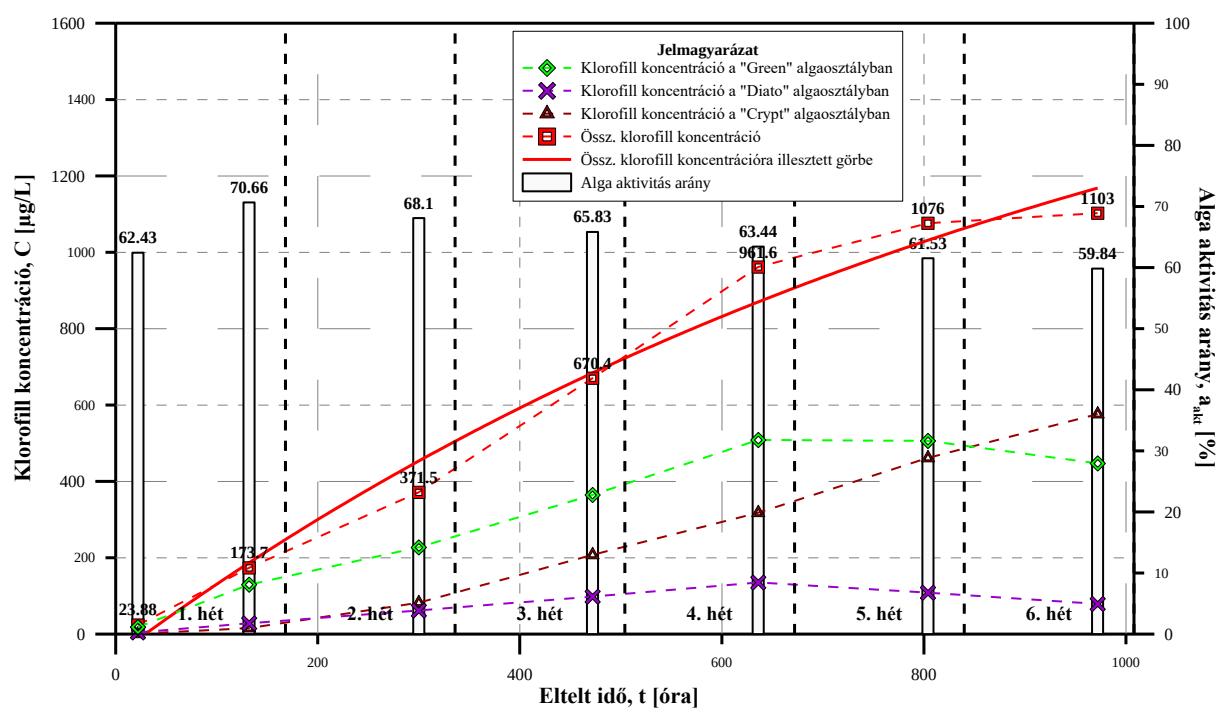
$$A = 0,9916$$

$$B = 0,0012$$

$$R^2 = 0,95$$

3.3.4. T3 (BG-11 emelt nitrát- és foszfát tartalommal) tápközeg

A T3 tápközeg esetén (19. ábra) az össz klorofill koncentráció ugyancsak emelkedő tendenciát mutatott. Az eddigi eredményekkel ellentétben a 6. hét végére érte el a legmagasabb, 1103 $\mu\text{g/L}$ értéket a kísérlet során. A kontroll kezeléshez képest hasonlóan a T1-hez, szintén a duplájára nőtt ez az érték. A növekedés a megemelt nitrát- és foszfát tartalommal hozható összefüggésbe. A vizsgálat során szintén 3 algaosztály került detektálásra a mintában: „Green”, „Diat” és „Crypt”. A legmagasabb arányban a „Green” algaosztály volt jelen. A 6. hétre az össz klorofill koncentráció kis mértékű változást mutat. A „Green” osztály klorofill koncentrációja 506-ról 447-re, a „Diat”-é 108,5-ről 79 $\mu\text{g/L}$ -re csökkent. Ezzel szemben a „Crypt” algaosztályé 461,5-ről 576,3 $\mu\text{g/L}$ -re nőtt. Az alga aktivitás a kísérlet során 70,66%-ról 59,84%-ra csökkent.



19. ábra: A biológiai paraméterek alakulása T3 (BG-11 emelt nitrát- és foszfát tartalommal) tápközegben.

Ahogy az előző 3 esetben, T3 tápközeg esetében is illesztettem az exponenciális egyenletet a mért össz klorofill koncentrációs értékekre, amellyel a biomassza növekedésének jellemzése volt a cél. Az egyenlet konstans paramétereinek, továbbá az illesztés jóságának (R^2) értéke alább látható:

$$C_{\max} = 1921,1182$$

$$A = 1,0293$$

$$B = 0,0009$$

$$R^2 = 0,98$$

3.4. Optimális kultivációs időtartam T3 kezelés példáján keresztül

A mikroalga növekedésére alkalmazott exponenciális egyenletből a Y értékhez tartozó kultivációs idő az egyenlet x -re történő rendezésével számítható, mivel x a változó paraméter, amely ebben az esetben az időt jelöli. Az egyenlet x -re történő rendezésének részletes lépései a következők:

$$Y = C_{\max} \cdot (1 - A \cdot e^{-B \cdot x})$$

$$Y = C_{\max} \cdot (1 - A \cdot e^{-B \cdot x}) \quad / C_{\max}$$

$$\frac{Y}{C_{\max}} = 1 - A \cdot e^{-B \cdot x} \quad + A \cdot e^{-B \cdot x}; \quad - \frac{Y}{C_{\max}}$$

$$A \cdot e^{-B \cdot x} = 1 - \frac{Y}{C_{\max}} \quad / A$$

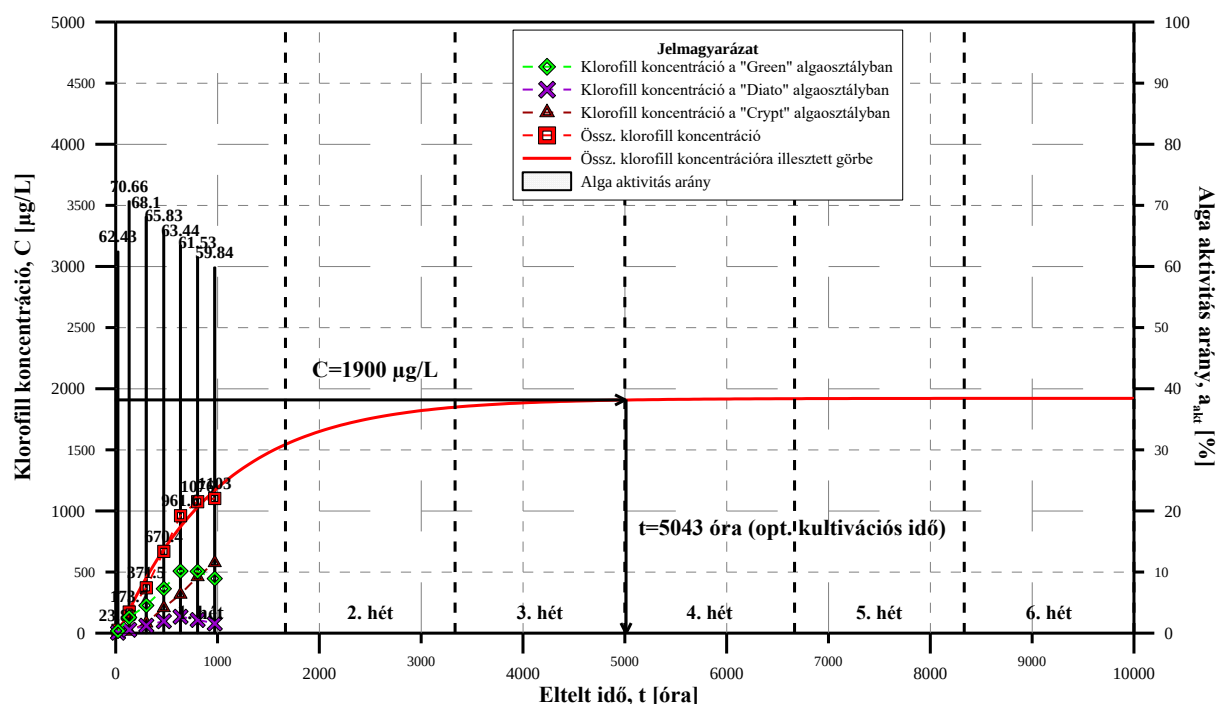
$$e^{-B \cdot x} = \frac{1}{A} - \frac{Y}{C_{\max} \cdot A} \quad \ln$$

$$-B \cdot x = \ln\left(\frac{1}{A} - \frac{Y}{C_{\max} \cdot A}\right) \quad / (-B)$$

$$x = \frac{\ln\left(\frac{1}{A} - \frac{Y}{C_{\max} \cdot A}\right)}{-B}$$

Az 20. ábrán 0-tól 1000 óráig az általunk mért klorofill koncentráció értékek láthatóak, 1000 órán túl pedig a szoftver által illesztett exponenciális görbe időbeni meghosszabbítása. A függvény alapján elmondható, hogy az Y értéke a $C_{\max}$ értékéhez konvergál. A függvény Y értéke $C_{\max}$ értékét azonban a végtelenben éri el, így logikusan gondolkodva Y értékének kisebbnek kell, hogy legyen, mint $C_{\max}$ értéke. T3 kezelés esetében $C_{\max}$ értéke 1921,1182 $\mu\text{g/L}$,

így az Y-ra beállított értéket csak ezen érték alatt tudjuk értelmezni (pl. 1900 µg/L), amelyhez így már a kultivációs idő is kiszámítható.



20. ábra: Optimális kultivációs időtartam T3 kezelés esetén.

Az x-re rendezett egyenletbe T3 tápoldat esetében az alaktényezők konstans értékeit – azaz $A=1,0293$ és $B=0,0009$ –, valamint az Y-ra megválasztott 1900 µg/L értéket visszahelyettesítve a kultivációs idő pontosan meghatározható:

$$x = \frac{\ln\left(\frac{1}{1,0293} - \frac{1900}{1921,1182 \cdot 1,0293}\right)}{0,0009}$$

$$x = \frac{\ln\left(0,9715 - \frac{1900}{1977,4069}\right)}{0,0009}$$

$$x = \frac{\ln(0,9715 - 0,9608)}{0,0009}$$

$$x = \frac{\ln(0,0107)}{0,0009} = 5043,7849 \text{ óra}$$

A rendezett egyenlet alapján az optimális kultivációs idő (x) számítható minden egyes tápoldat esetében, ismerve a leíró exponenciális egyenlet konstans paramétereit, továbbá az Y értékét önkényesen megválasztva, úgy, hogy $C_{\max}$ értékénél semmiképpen sem legyen nagyobb (8. táblázat).

Számított paraméterek	C	T1	T2	T3
C_{max} , [$\mu\text{g/L}$]	865,4923	2277,2348	1089,2491	1921,1182
A, [-]	0,8721	1,0251	0,9916	1,0293
B, [-]	0,0012	0,0008	0,0012	0,0009
Elérni kívánt koncentráció (Y), [$\mu\text{g/L}$]	800	2200	1000	1900
Kultivációs idő t, [óra]	2037,0955	4260,8215	2077,8141	5043,7849

8. táblázat: Az illesztett exponenciális egyenlethez tartozó konstans paraméterek, valamint a kultivációs idő az elérni kívánt koncentráció függvényében.

A számított kultivációs idők alapján jól látható, hogy a legjobb kezelésnek a kontrollhoz képest a T1 és T3 tápközegek bizonyultak, mind a görbe elméleti maximumát (C_{max}), mind pedig az Y-ra beállított értékekhez tartozó optimális kultivációs időtartamot figyelembe véve (t). A bemutatott számítási módszer a jövőben döntéstámogatást nyújthat arra vonatkozóan, hogy mennyi ideig érdemes az algák termesztését folytatni. Maradva a T3 kezelés példájánál, a kísérlet időtartama alatt (0-1000 óra) elért maximum klorofill koncentráció 1103 $\mu\text{g/L}$ volt, azonban az optimális kultivációs időt figyelembe véve (5043,78 óra), a fennmaradó közel 4000 órában ez az érték szinte a duplájára, azaz 1900 $\mu\text{g/L}$ -re növelhető lenne.

4. Következtetések és javaslatok

A 3. fejezetben ismertetett eredmények alapján a következtetéseimet és javaslataimat az alábbi 2 alfejezetben ismertetem.

4.1. Környezeti paraméterek optimalizálása

A mikroalgákban mind a fotoszintézis (oxigéntermelés vagy szén-dioxid-megkötés), mind a légzési folyamatok hőmérsékletfüggők. Ebből adódóan a növekedési hőmérséklet erősen befolyásolja a mikroalgák biomassza-termelését és növekedési sebességét. A biomassza tömeg növelésének, valamint a kultivációs idő csökkentésének szempontjából a *C. vulgaris* számára az optimális növekedési hőmérséklet 25-30°C közé esik.

A levegőztetés megakadályozza a mikroalgák kicsapódását, valamint homogenizálja a termesztési környezetet (pl. hőmérséklet), továbbá elősegíti a gázcserét az alga kultúra és a levegő között. Megerősíti a levegőztetés fontosságát, hogy a *C. vulgaris* megfelelő levegőztetés mellett nagyobb biomasszát termel, ezzel pedig egyidejűleg csökkenthető a kultivációs időtartam is.

4.2. Tápoldat összetételének optimalizálása

T3 közegben az emelt NO_3^- és PO_4^{3-} koncentrációnak köszönhetően a kontrollhoz képest +58%-kal magasabb biomassza tömeg termelődött. A nitrogén létfontosságú szerepet játszik a sejtnövekedésben és a lipidtermelésben. A foszfátok jelentik az algák másik táplálékforrását, így a magasabb koncentráció szintén elősegítheti a sejtnövekedést. A növekedés fokozása, valamint a biomassza növelése érdekében érdemes NO_3^- , valamint PO_4^{3-} gazdag környezetbe helyezni a mikroalgákat.

A mikroalga növekedése exponenciális egyenlettel jellemezhető, amely alapján az optimális kultivációs idő számítható a vizsgált közegekre vonatkozóan. A módszer a jövőben döntéstámogatást nyújthat arra vonatkozóan, hogy mennyi ideig érdemes az algák termesztését folytatni a magasabb biomassza termelés érdekében.

A beállított pH-érték fontos szerepet játszik a mikroalgák termesztése során, mivel a kedvezőtlen pH érték abiotikus stresszként hat a mikroalgákra, amely végső soron befolyásolja a tápanyagfelvétel hatékonyságát, valamint a metabolit termelést is. Normál termesztés mellett a *C. vulgaris* növekedéséhez az optimális pH 10,0 és 10,5 között van. A pH monitoring és

szabályozás által az optimális pH-hoz történő folyamatos korrigálás intenzifikálhatja a mikroalgák növekedését és megakadályozhatja az elszennyeződésüket.

Összefoglalás

A *Chlorella vulgaris* könnyen termeszthető olcsó tápanyagrendszerrel és a szárazföldi energianövényekhez képest gyorsabb növekedési sebességgel, valamint magas biomassza-termelőképeséssel rendelkezik. A termelési-feldolgozási költségek azonban továbbra is túl magasak ahhoz, hogy a piacon versenyképesek legyenek. Valójában ez a mikroalgák iparának egyik fő problémája napjainkban, azonban el kell ismerni, hogy az elmúlt évtizedben jelentős javulást értek el és a várakozások szerint a mikroalgák ipara a közeljövőben különböző szinteken erősen versenyképes lesz a piacon. A *C. vulgaris* figyelemre méltó értékei megalapozzák a jövőbemutató alkalmazások további kutatását, ahol a jövő bioiparának erős jelöltjeként fog szerepelni. Napjainkban ezeket a mikroszkopikus organizmusokat javarészt még mindig táplálékkiegészítőként fogyasztják, mindazonáltal ígéretes fenntartható energiaforrásnak is tekintik, mivel képesek nagy mennyiségű lipid felhalmozására, amelyek alkalmasak a biodízel előállítására.

A kutatás célja különböző kémiai összetételű tápközegek hatásának vizsgálata volt a *Chlorella vulgaris* mikroalgák szaporodására. Ennek nyomon követésére a minták különböző kémiai- (NH_4^+ , NO_3^- , K^+ , PO_4^{3-} , KOI, pH, elektromos vezetőképesség) és biológiai paramétereit (klorofill koncentráció, aktivitás), valamint az UV-látható fény tartományban lévő abszorbanciáját is vizsgáltuk. A kísérlet 7 héten keresztül zajlott heti 1 mintavételezéssel 4 beállított, egyenként 4 L-es különböző kémiai tápoldatban, melyek a következők voltak: kontroll – C (BG-11); kezelés 1 – T1 (BG-11 emelt nitrát tartalommal); kezelés 2 – T2 (BG-11 emelt foszfát tartalommal); kezelés 3 – T3 (BG-11 emelt nitrát- és foszfát tartalommal).

A vizsgálat során a kémiai paraméterek minden egyes minta esetében logaritmikus, valamint lineáris csökkenést, míg az abszorbancia vizsgálat során a klorofill és karotinoid AB koncentrációk hétről hétre növekvő tendenciát mutattak. A változások mértéke és iránya összhangban volt a mikroalgák szaporodásával, aktivitásával. A legjelentősebb biomassza növekedést a kontrollhoz képest a T3-as kezelés mutatta (+58%) a maximális mért klorofill koncentrációt figyelembe véve. A mikroalga növekedését exponenciális egyenlettel jellemeztük, amely alapján az optimális kultivációs idő számítható a vizsgált közegekre vonatkozóan [75].

Irodalomjegyzék

- [1] Dalton R. **Microfossils: squaring up over ancient life.** Nature 2002; 417:782–4.
- [2] González-Fernández C, Sialve B, Bernet N, Steyer J-P. **Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part I: focus on cultivation and biofuel production.** Biofuel Bioprod Biorefin 2012; 6:105–13.
- [3] Lee RE. **Phycology. 4th ed.** Cambridge, England; New York: CambridgeUniversity Press; 2008.
- [4] Carl S., Bachar Z., Othmane M., Pierre-Yves P., Carlos V., **Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review**, Renewable and Sustainable Energy Reviews, Volume 35, 2014, Pages 265-278,
- [5] Allen, C., Metternicht, G., Wiedmann, T., 2019. **Prioritising SDG targets: assessing baselines, gaps and interlinkages.** *Sustain. Sci.* 14 (2), 421–438.
- [6] Donna L. Sutherland, Janice McCauley, Leen Labeeuw, Parijat Ray, Unnikrishnan Kuzhiumparambil, Christopher Hall, Martina Doblin, Luong N. Nguyen, Peter J. Ralph, **How microalgal biotechnology can assist with the UN Sustainable Development Goals for natural resource management**, *Current Research in Environmental Sustainability, Volume 3*, 2021, 100050, ISSN 2666-0490, https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S2666049021000268-ga1_lrg.jpg
- [7] Burlew JS. **Algal culture from laboratory to pilot plant.** Washington DC: Carnegie Institution of Washington; 1953.
- [8] Justo GZ, Silva MR, Queiroz ML. **Effects of the green algae Chlorella vulgaris on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice.** *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001; 23:119–32.
- [9] Morimoto T, Nagatsu A, Murakami N, Sakakibara J, Tokuda H, Nishino H, et al. **Anti-tumour-promoting glyceroglycolipids from the green alga, Chlorella vulgaris.** *Phytochemistry* 1995; 40:1433–7.
- [10] de Souza Queiroz J, Barbosa CM, da Rocha MC, Bincoletto C, Paredes-Gamero EJ, de Souza Queiroz ML, et al. **Chlorella vulgaris treatment ameliorates the suppressive effects of single and repeated stressors on hematopoiesis.** *Brain Behav Immun* 2012; 29:39–50.

- [11] Sano T, Kumamoto Y, Kamiya N, Okuda M, Tanaka Y. **Effect of lipophilic extract of *Chlorella vulgaris* on alimentary hyperlipidemia in cholesterol-fed rats.** *Artery* 1988; 15:217–24.
- [12] Zheng H, Yin J, Gao Z, Huang H, Ji X, Dou C. **Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves.** *Appl Biochem Biotechnol* 2011; 164:1215–24.
- [13] Yamamoto M, Kurihara I, Kawano S. **Late type of daughter cell wall synthesis in one of the *Chlorellaceae*, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).** *Planta* 2005; 221:766–75.
- [14] Santhosh, S., Dhandapani, R., & Hemalatha, N. (2016). **Bioactive compounds from microalgae and its different applications - a review.** *Advances in Applied Science Research*, 7, 153–158.
- [15] Sharma, R., Singh, G. P., & Sharma, V. K. (2012). **Effects of culture conditions on growth and biochemical profile of *Chlorella vulgaris*.** *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 3, 1–6.
- [16] Jacob-Lopes, E., Ramírez Mérida, L. G., Queiroz, M. I., & Zepka, L. Q. (2015). **Microalgal biorefineries.** In E. Jacob-Lopes & L. Q. Zepka (Eds.), *Biomass production and uses*. London: IntechOpen.
- [17] Servaites JC, Faeth JL, Sidhu SS. **A dye binding method for measurement of total protein in microalgae.** *Anal Biochem* 2012; 421:75–80.
- [18] Kottuparambil, S., Thankamony, R. L., & Agusti, S. (2019). **Euglena as a potential natural source of value-added metabolites. A review.** *Algal Research*, 37, 154–159
- [19] Stephenson AL, Dennis JS, Howe CJ, Scott SA, Smith AG. **Influence of nitrogen limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks.** *Biofuels* 2009; 1:47–58.
- [20] Yeh, K. L., & Chang, J. S. (2012). **Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31.** *Bioresource Technology*, 105, 120–127.
- [21] Choix, F. J., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2012). **Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: I. Autotrophic conditions.** *Enzyme Microbial Technology*, 51, 294–299.

- [22] Brennan, L., & Owende, P. (2010). **Biofuels from microalgae– A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 557–577.
- [23] Gouveia, L., Choubert, G., Pereira, N., Santinha, J., Empis, J., & Gomes, E. (2002). **Pigmentation of gilthead sea bream, Sparus aurata (L. 1875), using Chlorella vulgaris (Chlorophyta, Volvocales) microalga.** *Aquaculture Research*, 33, 987–993.
- [24] Yeh, K. L., & Chang, J. S. (2011). **Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga Chlorella vulgaris ESP-31: implications for biofuels.** *Biotechnology Journal*, 6, 1358–1366.
- [25] Yusof, Y. A. M., Basari, J. M. H., Nukti, N. A., Sabuddin, R., Muda, A. R., Sulaiman, S., Wan Ngah, W. Z. (2011). **Fatty acids composition of microalgae Chlorella vulgaris can be modulated by varying carbon dioxide concentration in outdoor culture.** *African Journal of Biotechnology*, 10, 13536–13542.
- [26] Irene Tiong Kai Ru, Yeong Yik Sung, Malinna Jusoh, Mohd Effendy Abdul Wahid & Thilahgavani Nagappan (2020) **Chlorella vulgaris: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts,** *Applied Phycology*, 1:1, 2-11.
- [27] Kong, W., Song, H., Cao, Y., Yang, H. S., Hua, S., & Xia, C. (2011). **The characteristics of biomass production, lipid accumulation and chlorophyll biosynthesis of Chlorella vulgaris under mixotrophic cultivation.** *African Journal of Biotechnology*, 10, 11620–11630.
- [28] Wijffels, R. H., Barbosa, M. J., & Eppink, M. H. M. (2010). **Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels.** *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4, 287–2.
- [29] Příbyl, P., Cepák, V., & Zachleder, V. (2012). **Production of lipids in 10 strains of Chlorella and Parachlorella, and enhanced lipid productivity in Chlorella vulgaris.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 549–561.
- [30] Mujtaba, G., Choi, W., Lee, C.-G., & Lee, K. (2012). **Lipid production by Chlorella vulgaris after a shift from nutrient rich to nitrogen starvation conditions.** *Bioresource Technology*, 123, 279–283.
- [31] Zheng, H., Yin, J., Gao, Z., Huang, H., Ji, X., & Dou, C. (2011). **Disruption of Chlorella vulgaris cells for the release of biodiesel-producing lipids: A comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis and microwaves.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 1215–1224.

- [32] Yeh, K. L., Chang, J. S., & Chen, W. M. (2010). **Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31.** *Engineering in Life Sciences*, 10, 201–208.
- [33] Daliry, S., Hallajisani, A., Mohammadi Roshandeh, J., Nouri, H., & Golzary, A. (2017). **Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth.** *Global Journal of Environmental Science and Management*, 3, 217–230.
- [34] Kumar, A., Ergas, S., Yuan, X., Sahu, A., Zhang, Q., Dewulf, J., Langenhove, H. (2010). **Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: Recent developments and future directions.** *Trends in Biotechnology*, 28, 371–380.
- [35] Liang, T., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). **Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions.** *Biotechnology Letters*, 31, 1043–1049.
- [36] Devgoswami, C. R., Kalita, M. C., Talukdar, J., Bora, R., & Sharma, P. (2011). **Studies on the growth behavior of *Chlorella*, *Haematococcus* and *Scenedesmus* sp. in culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas.** *African Journal of Biotechnology*, 10, 13128–13138.
- [37] Morais, M. G., Vas, B. S., Morais, E. G., & Costa, J. A. V. (2015). **Biologically active metabolites synthesized by microalgae.** *Biomedical Research International*, 2015: 835761.
- [38] Sirisansaneeyakul, S., Singhasuwan, S., Choorit, W., Phoopat, N., & Garcia, J. L. (2011). **Photoautotrophic production of lipids by some *Chlorella* strains.** *Marine Biotechnology*, 13, 928–941.
- [39] Rachlin, J. W., & Grosso, A. (1991). **The effects of pH on the growth of *Chlorella vulgaris* and its interactions with cadmium toxicity.** *Architectures Environmental Contamination Toxicology*, 20, 505–508.
- [40] Gong, Q., Feng, Y., Kang, L., Luo, M., & Yang, J. (2014). **Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*.** *Energy Procedia*, 61, 2012–2015.
- [41] Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). **A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids.** *Frontier in Microbiology*, 7, 1–19.

- [42] Alyabyev, A. J., Loseva, N. L., Gordon, L. K., Andreyeva, I. N., Rachimova, G. G., Tribunskih, V. U., Kemp, R. B. (2007). **The effect of changes in salinity on the energy Applied Phycology 7 yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells.** *Thermochimica Acta*, 458, 65–70.
- [43] Hiremath, S., & Mathad, P. (2010). **Impact of salinity on the physiological and biochemical traits of *Chlorella vulgaris* Beijerinck.** *Journal Algal Biomass Utilization*, 1, 51–59.
- [44] Rai, M. P., Gautam, T., & Sharma, N. (2015). **Effect of salinity, pH, light intensity on growth and lipid production of microalgae for bioenergy application.** *Online Journal of Biological Sciences*, 15, 260–267.
- [45] Zhao, B., & Su, Y. (2014). **Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, 121–132.
- [46] Jacob-Lopes, E., Scoparo, C. H. G., Lacerda, L. M. C. F., & Franco, T. T. (2009). **Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors.** *Chemical Engineering and Processing*, 48, 306–310.
- [47] Khoeyi, Z. A., Seyfabadi, J., & Ramezanzpour, Z. (2012). **Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae *Chlorella vulgaris*.** *Aquaculture International*, 20, 41–49.
- [48] Hultberg, M., Larsson, H., Bergstrand, K., & Carlsson, A. S. (2014). **Impact of light quality on biomass production and fatty acid content in the microalga *Chlorella vulgaris*.** *Bioresource Technology*, 159, 465–467.
- [49] Fu, W., Gudmundsson, O., Feist, A. M., Herjolfsson, G., Brynjolfsson, G., & Palsson, B. Ø. (2012). **Maximizing biomass productivity and cell density of *Chlorella vulgaris* by using light-emitting diode-based photobioreactor.** *Journal Biotechnology*, 161, 242–249.
- [50] Khotimchenko, S. V., & Yakovleva, I. M. (2005). **Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance.** *Phytochemistry*, 66, 73–79.
- [51] Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Borghi, M. D. (2009). **Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production.** *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48, 1146–1151.

- [52] Sobczuk, T., Camacho, F., Grima, E., & Chisti, Y. (2006). **Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum***. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28, 243–250.
- [53] Funahashi, H., Nishiyama, Y., Asano, M., & Nakao, K. (1999). **Effects of pH shift and agitation speed on chlorophyll biosynthesis in heterotrophic culture of *Chlorella***. *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, 25, 218–219.
- [54] Přibyl P, Cepák V, Zachleder V. **Production of lipids and formation and mobilization of lipid bodies in *Chlorella vulgaris***. *J Appl Phycol* 2013; 25:545–53.
- [55] Lv JM, Cheng LH, Xu XH, Zhang L, Chen HL. **Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions**. *Bioresour Technol* 2010; 101:6797–804.
- [56] Widjaja A, Chien C-C, Ju Y-H. **Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris***. *J Taiwan Inst Chem Eng* 2009; 40:13–20.
- [57] Liu ZY, Wang GC, Zhou BC. **Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris***. *Bioresour Technol* 2008; 99:4717–22.
- [58] Jareonsin S and Pumas C (2021) **Advantages of Heterotrophic Microalgae as a Host for Phytochemicals Production**. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:628597.
- [59] Chisti Y. **Biodiesel from microalgae**. *Biotechnol Adv* 2007; 25:294–306.
- [60] Zhang K, Miyachi S, Kurano N. **Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 55:428–33.
- [61] Molina Grima E, Belarbi EH, Acien Fernández FG, Robles Medina A, Chisti Y. **Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics**. *Biotechnol Adv* 2003; 20:491–515.
- [62] Kojima E, Zhang K. **Growth and hydrocarbon production of microalga *Botryococcus braunii* in bubble column photobioreactors**. *J Biosci Bioeng* 1999; 87:811–5.
- [63] Degen J, Uebele A, Retze A, Schmid-Staiger U, Trosch W. **A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect**. *J Biotechnol* 2001; 92:89–94.

- [64] Lee Y-K. **Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential.** *J Appl Phycol* 2001; 13:307–15.
- [65] Paddock, Matthew. (2019). **Microalgae Wastewater Treatment: A Brief History.** 10.20944/preprints201912.0377.v1.
- [66] Yeh KL, Chang JS. **Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31.** *Bioresour Technol* 2012;105:120–7.
- [67] de-Bashan LE, Antoun H, Bashan Y. **Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*.** *FEMS Microbiol Ecol* 2005; 54:197–203.
- [68] Munoz R, Guieysse B. **Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review.** *Water Res* 2006; 40:2799–815.
- [69] de-Bashan LE, Bashan Y, Moreno M, Lebsky VK, Bustillos JJ. **Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*.** *Can J Microbiol* 2002; 48:514–21.
- [70] Lebsky VK, Gonzalez-Bashan LE, Bashan Y. **Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*.** *Can J Microbiol* 2001; 47:1–8.
- [71] Leupold M, Hindersin S, Gust G, Kerner M, Hanelt D. **Influence of mixing and shear stress on *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Chlamydomonas reinhardtii*.** *J Appl Phycol* 2013; 25:485–95.
- [72] <https://www.aktivit.hu>, Letöltve: 2022. november 3.
- [73] Biomonitoring Toxicity <https://envitech.co.uk/solutions/river-and-marine/biomonitoring-toxicity/>, Letöltve: 2022. november 3.
- [74] L. Guidi, M. Tattini, and M. Landi, "**How Does Chloroplast Protect Chlorophyll Against Excessive Light?**", in **Chlorophyll**. London, United Kingdom: *IntechOpen*, 2017.

[75] Németh B, Nagy P, Magyar T. **Mikroalga termeszthetőségének kísérleti vizsgálata különböző kémiai összetételű tápközegekben.** In: *2nd International Symposium on Environment, Health and Safety (ISEHS) 2022: Book of Abstracts*. Debrecen, Magyarország: Debreceni Egyetem, Műszaki Kar (2022) 19 p. p. 11.