

## PRODUKTYWNOŚĆ HODOWLI MIKROGLONÓW *CHLORELLA VULGRIS* W WARUNKACH LABORATORYJNYCH

Agnieszka Patyna<sup>1</sup>, Łukasz Biłos<sup>2</sup>, Małgorzata Płaczek<sup>1</sup>, Stanisław Witczak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Inżynierii Procesowej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Opolska, ul. Mikołajczyka 5, 45-271 Opole, e-mail: patyna.a@gmail.com

<sup>2</sup> Katedra Inżynierii Biosystemów, Wydział Inżynierii Produkcji i Logistyki, Politechnika Opolska, ul. Mikołajczyka 5, 45-271 Opole, e-mail: l.bilos@po.opole.pl

### STRESZCZENIE

Biomasa glonów coraz częściej uważana jest za potencjalny surowiec mogący służyć do produkcji biopaliw oraz energii elektrycznej czy ciepłej. Dodatkowo algi zawierają całe bogactwo substancji odżywczych, mogą więc stanowić źródło pożywienia dla ludzi i zwierząt hodowlanych. Ich właściwości biosorpcyjne sprawiają, że działają oczyszczająco na organizm i dlatego są przyjmowane w celu detoksykacji lub jako suplementy zróżnicowanej diety. Hodowla alg nie wymaga dużych powierzchni, a ponadto wskaźnik produkcji ich biomasy jest dużo wyższy niż roślin naczyniowych. Wymaga to jednak prowadzenie jej w ściśle określonych warunkach procesowych, których zakres zmian określa się na drodze doświadczalnej. Uwzględniając konieczność ustalenia odpowiednich warunków procesowych dla ściśle określonych rodzajów mikroalg, w pracy dokonano przeglądu literatury z zakresu warunków hodowli mikroglonów z gatunku *Chlorella* oraz przedstawiono wyniki badań własnych przeprowadzonych w fotobioreaktorze laboratoryjnym.

**Słowa kluczowe:** *Chlorella vulgaris*, fotobioreaktor, hodowla alg, produktywność biomasy

### PRODUCTIVITY OF MICROALGAE *CHLORELLA VULGARIS* IN LABORATORY CONDITION

#### ABSTRACT

Algae biomass is increasingly regarded as a potential resource that could be used to produce biofuels, electricity and heat. Algae contain a lot of nutrients, so they can be used as food for humans and livestock. Because of their valuable composition (many nutrients) they are used as supplements of balanced diet, in turn taking into account their biosorption ability they are used to detoxification of human body. Algae cultivation does not demand large areas of land to expose cells to sunlight, so their production rate is higher than vascular plants. Moreover algae cultivation lets to achieve high biomass concentration. Important cultivation factors are: illumination (light intensity is an important factor because it drives photosynthesis), CO<sub>2</sub> supply, culture medium and mixing. The experimental research was conducted using *Chlorella vulgaris* BA 002 strain. The aim of this study was to determine the effectiveness of biomass growth in laboratory condition.

**Keywords:** algae cultivation, biomass productivity, *Chlorella vulgaris*, photobioreactor

#### WPROWADZENIE

Algi to jedne z najbardziej rozpowszechnionych organizmów na Ziemi, zdolnych do wzrostu w różnych warunkach. Są rozproszone w całej biosferze. Zwykle można je zlokalizować w wodzie (od wód słodkich po ekstremalnie zasolone). Równie powszechnie jak w wodach występują na lądzie. Od innych mikroorganizmów odróżnia

je obecność chlorofilu i zdolność do przeprowadzania procesu fotosyntezy w każdej pojedynczej komórce. Wyodrębniony nukleus, pirenoide, ściana komórkowa, chloroplasty zawierające chlorofil oraz inne barwniki, stigma i flagella to główne składowe komórek alg [Singh i in. 2012, Mata 2010]. Obecnie opisanych jest ponad 72,500 gatunków, a szacuje się, że na Ziemi żyje ich od dwustu tysięcy do nawet miliona [Guiry 2012].

Mikroalgi, jako organizmy fotosyntetyzujące zmieniają energię słoneczną na chemiczną [Mohsenpour i in. 2013]. Produkują one wartościowe związki biochemiczne, takie jak barwniki, białka, węglowodany, kwasy tłuszczowe oraz lipidy używane do produkcji biodiesla [Mohsenpour i in. 2013, Chen i in. 2011].

Są one zdolne do absorpcji lotnych związków organicznych, usuwania CO<sub>2</sub>, oczyszczania ścieków, mogą być wykorzystywane jako surowce kosmetyczne, środki medyczne czy też składniki pożywienia [Borowitzka 1999, Li i in. 2003, Seo i in. 2012]. Pozostałość alg po ekstrakcji oleju wykorzystuje się jako paszę dla zwierząt lub nawóz do wzrostu roślin naczyniowych. Hodowlę alg można prowadzić zarówno w systemach otwartych, jak i zamkniętych zwanych fotobioreaktorami. Pierwszymi systemami użytymi do hodowli alg na skalę przemysłową były otwarte stawy, które pojawiły się w Niemczech podczas drugiej wojny światowej. Od tamtego czasu wykorzystuje się tego typu organizmy głównie jako suplementy diety. W latach pięćdziesiątych XX wieku zaczęto wzbogacać hodowle alg w dwutlenek węgla. Lata siedemdziesiąte XX wieku przyniosły szybki rozwój hodowli alg na skalę przemysłową w Europie Wschodniej, Izraelu i Japonii, w dalszym ciągu z przeznaczeniem na cele spożywcze.

Aktualnie celem hodowli alg są konkretne potrzeby ludzi. W Stanach Zjednoczonych odkryto zdolność alg do oczyszczania wody. Ponadto z biomasy alg można produkować biometan, biodiesel, bioetanol oraz biowodór [Ugwu i in., 2008]. W literaturze można znaleźć różne projekty fotobioreaktorów do hodowli mikroalg, jednak duże nakłady energii do ich działania oraz koszty przeznaczone np. na sztuczne oświetlenie, są głównym problemem do praktycznego ich wykorzystania na większą skalę [Chen i in., 2011]. Bioreaktory są konstruowane zgodnie z późniejszym zastosowaniem produkowanej w nich biomasy. Obecnie temat bioreaktorów jest szeroko omawiany. Produkcja w nich biomasy różni się od produkcji w systemach otwartych (konwencjonalnych) głównie sposobem oddzielenia samej hodowli od środowiska zewnętrznego [Holtmann i in. 2011]. Idealny fotobioreaktor służący do produkcji biomasy powinien absorbować całe dostępne światło słoneczne i umożliwiać jego dystrybucję do wnętrza naczynia hodowlanego, w którym energia ta wykorzystywana jest bezpośrednio do produkcji biomasy. Otrzymanie wysokich stężeń biomasy w fotobioreaktorach

możliwe jest tylko poprzez właściwe dostosowanie ich konstrukcji i eksploatacji do zachodzących wewnątrz procesów biologicznych [Zijffers i in. 2008]. Równie ważne jest dostarczanie CO<sub>2</sub> o odpowiednim stężeniu w doprowadzanym gazie oraz odbiór produktów gazowych fotosyntezy.

Znanych jest wiele doświadczeń wskazujących, że produktywność biomasy i współczynnik asymilacji węgla wzrasta, gdy stężenie dwutlenku węgla jest wyższe niż w powietrzu atmosferycznym [Yoo i in. 2010, Jacob-Lopes i in. 2008]. Jian-Ming i in. [2010] badali wpływ różnych stężeń CO<sub>2</sub> na wzrost *Chlorella vulgaris*. Do hodowli doprowadzano mieszaninę gazów ze stężeniem CO<sub>2</sub> równym 0,5%, 1%, 6% oraz 12%. We wszystkich 4 przypadkach nie zaobserwowano znaczących różnic w przyroście glonów. Najwyższy wzrost otrzymano w przypadku doprowadzania CO<sub>2</sub> w stężeniu 1%. W 70 godzinie doświadczenia ilość otrzymanej suchej masy wynosiła 750 mg/dm<sup>3</sup>. Najniższa wartość w danej godzinie wynosiła 600 mg/dm<sup>3</sup> przy 12% stężeniu CO<sub>2</sub>. Doświadczenia nad wpływem ilości dostarczanego CO<sub>2</sub> znalazły się także w pracy Douskowej i in. [2009]. Do hodowli prowadzonej w szklanych kolumnach barbotażowych, pod stałym oświetleniem, wprowadzano mieszaninę gazów zawierającą w pierwszym przypadku 2% dwutlenku węgla, a w drugim 11%. Douskowa i in. również i w tym przypadku nie zaobserwowali znaczących różnic. Ważnym aspektem jest także mieszanie zawiesiny bioalg, które korzystnie wpływa na rozprowadzanie w zawieszynie hodowlanej anionów wodorowęglanowych oraz zawartych w cieczy substancji odżywczych (pożywki). Zapewnia ono również poszczególnym komórkom równomierny dostęp do światła [Ugwu i in. 2008, Zhang i in. 2002, Chai i in. 2012]. Ważnym parametrem eksploatacyjnym każdej hodowli jest również zapewnienie i utrzymywanie odpowiedniej temperatury. Wszystkie wskazane już parametry, tj. rozmiar fotobioreaktora, jego kształt, głębokość docierania światła, sposób dostarczania CO<sub>2</sub> (istotnego komponentu fotosyntezy) oraz mechanizm mieszania, powinny być tak dobrane by zapewnić maksymalny wzrost alg [Seo i in. 2012].

Celem badań było zbadanie efektywności wzrostu biomasy alg *Chlorella vulgaris* w warunkach laboratoryjnych. W pracy omówiono warunki hodowli oraz przedstawiono wybrane wyniki badań dotyczące efektywności przyrostu ich masy.

## METODYKA I ZAKRES BADAŃ

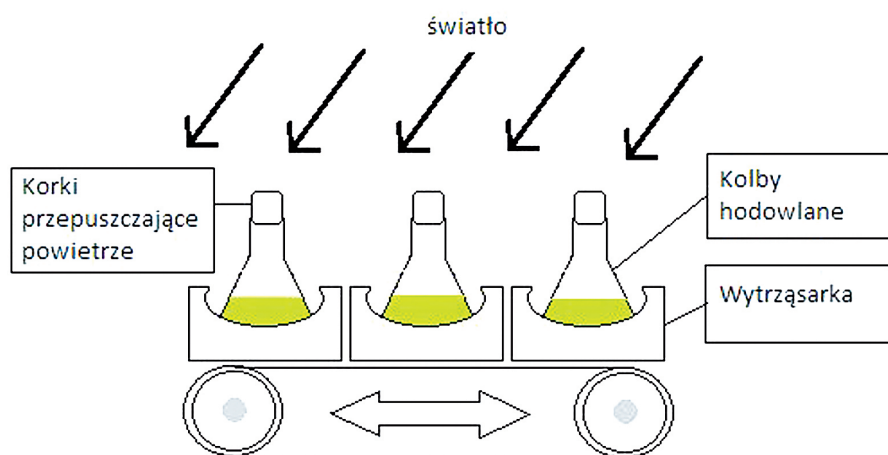
Hodowlę prowadzono w kolbach Erlenmeyera o pojemności 100 ml, które wcześniej były sterylizowane w autoklawie, w temperaturze ok. 120°C przez 20 minut. Schemat stanowiska do badania produktywności mikroglonów *Chlorella vulgaris* przedstawiono na rysunku 1.

Wstępnie do każdej kolby nalewano 50 ml pożywki oraz 2 ml inokulum alg *Chlorella vulgaris* BA 002, zawierającego  $2,5 \cdot 10^6$  komórek w podanej porcji. Użyty do badań szczep pozyskano z Kolekcji Kultur Glonów Bałtyckich In-

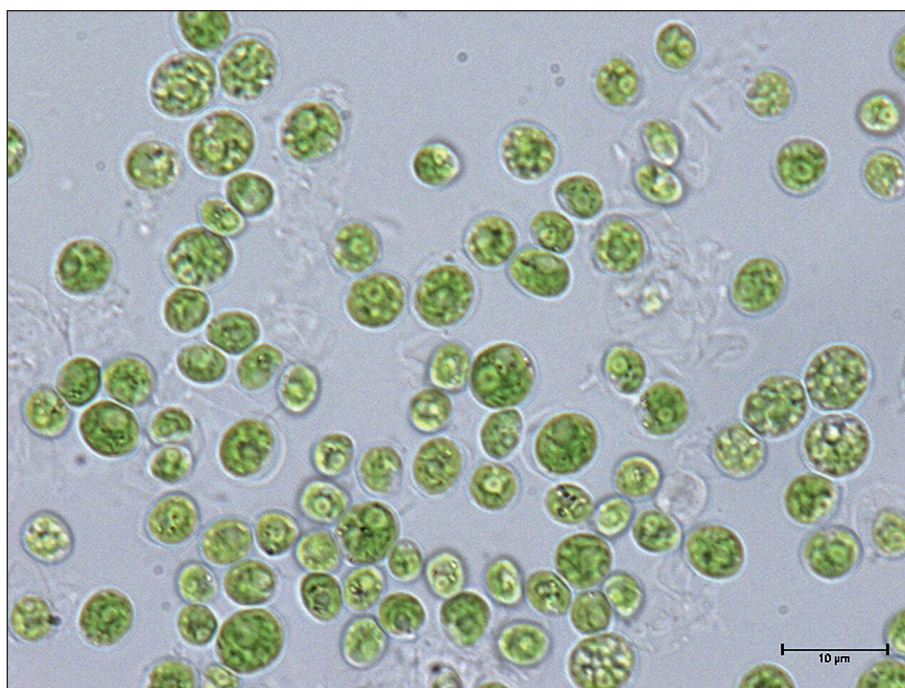
stytutu Oceanografii Uniwersytetu Gdańskiego, którego obraz mikroskopowy przedstawiono na rysunku 2.

Skład chemiczny zastosowanej pożywki do hodowli glonów wraz z określeniem stężeń poszczególnych jej składników przedstawiono w tabeli 1. Należy zaznaczyć, że tak dobraną pożywkę także poddano sterylizacji w autoklawie.

Hodowlę prowadzono w świetle sztucznym. Oświetlana ona była lampami jarzeniowymi w cyklach 15 minut oświetlenia oraz 15 minut jego wyłączenia (stosunek dzień/noc). Moc zastosowanego oświetlenia wynosiła ok. 1500 luk-



**Rys. 1.** Stanowisko do badania produktywności mikroglonów *Chlorella vulgaris*  
**Fig. 1.** Experimental setup to research productivity of microalgae *Chlorella vulgaris*



**Rys. 2.** Glony *Chlorella vulgaris* BA 002 [Instytut Oceanografii Uniwersytetu Gdańskiego]  
**Fig. 2.** Photo of *Chlorella vulgaris* BA 002 culture [The Institute of Oceanography of the University of Gdańsk]



**Tabela 1.** Skład pożywki do hodowli glonów użytej w badaniach [Anderson 2005]

Substancje wchodzące w skład pożywki	Stężenie [g/dm <sup>3</sup> ]
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,042
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,53
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,34
Kwas cytrynowy x 2H <sub>2</sub> O	1,094
Mocznik	1,1
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,08
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2
Glukoza	40

sów. W trakcie badań dokonywano także pomiaru odczynu, którego dokonywano z wykorzystaniem pH-metru Elmetron CP-401, a zmierzone wartości wynosiły średnio 7–8 pH. Wszystkie testy przeprowadzane były w temperaturze otoczenia, tj. 22–24 °C. Próbkę do badań stężenia mikroalg w zawiesinie oraz określania zawartości ich suchej masy były pobierane każdego dnia, w równych odstępach czasu. Obserwacje mikroskopowe stanu zawiesiny dokonywane były przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego Jenamed 2 Fluorescence.

Oznaczenie suchej masy w trakcie trwania doświadczenia polegało na pobraniu próbki zawiesiny alg w medium hodowlanym do uprzednio zważonych próbek. Odwirowanie zawiesiny wykonywano w wirówce laboratoryjnej z prędkością 5000 obrotów/minutę. Następnie próbki z algami poddawano procesowi suszenia w suszarce laboratoryjnej z wymuszonym obiegiem powietrza w temperaturze 100°C przez 2 godziny. Po wyjęciu próbek z suszarki przenoszono je do eksykatora, a następnie ponownie ważono i ustalano przyrost suchej masy w odniesieniu do próby wcześniej wykonanej.

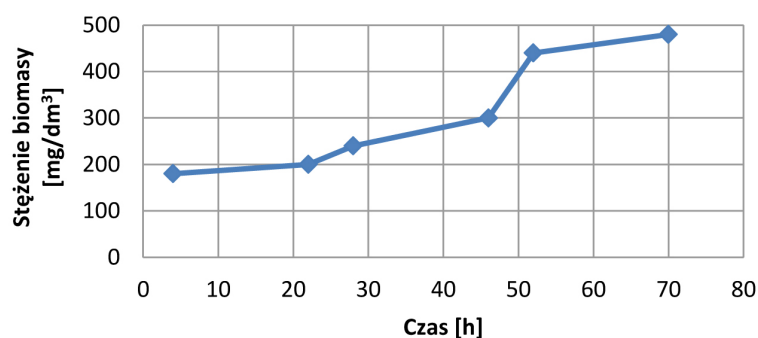
## DYSKUSJA WYNIKÓW

Na rysunku 3 przedstawiono przyrost suchej masy alg *Chlorella vulgaris* w czasie, w odniesieniu do jednostki objętości zawiesiny. Maksymalny dobowy przyrost biomasy wyniósł około 190 mg/dm<sup>3</sup>. Dzoska i Makowska [(2015)] w badaniach przeprowadzonych nad *Chlorella sp.* w temperaturze 28°C, również w warunkach laboratoryjnych otrzymały przyrost równy 226,6 mg/dm<sup>3</sup>. Tym samym dowiodły, że była to najbardziej korzystna temperatura do hodowli tych mikroglonów. Zmiana temperatury na 26°C spowodowało zmniejszenie przyrostu do 75 mg/dm<sup>3</sup>. Jian-Ming i in. [2010] prowadząc podobne doświadczenie w kolbach o pojemności 3 litrów pod ciągłym oświetleniem otrzymał w 70 godzinie trwania doświadczenia około 540 mg/dm<sup>3</sup> suchej masy. Changling i in. [2013] prowadzili hodowlę *Chlorella vulgaris* w 7,5 litrowym bioreaktorze, jako pożywkę wykorzystali ścieki komunalne. W 70 godzinie trwania doświadczenia stężenie biomasy w hodowli wynosiło około 500 mg/dm<sup>3</sup>. Najwyższa wartość została osiągnięta po 120 godzinach i wynosiła 750 mg/dm<sup>3</sup>, po osiągnięciu tego punktu stężenie zaczęło maleć. Kujawska i in. [2012] prowadzili badania nad przyrostem badanego gatunku w fotobioreaktorze panelowym, hodowla była prowadzona w 30°C oraz na standardowym medium f/2. Po 70 godzinach doświadczenia uzyskano około 1000 mg/dm<sup>3</sup> komórek glonów.

W oparciu o pomiary przyrostu suchej masy mikroalg w czasie trwania ich hodowli wyznaczano także jej produktywność, którą określano z zależności

$$P(\tau) = |C_k - C_p| / \Delta\tau, \quad (1)$$

w której wielkości  $C_k$ ,  $C_p$  oznaczają końcowe i początkowe stężenia suchej masy w g/dm<sup>3</sup> zmierzono-



**Rys. 3.** Przyrost alg *Chlorella vulgaris* w czasie  
**Fig. 3.** Increase in weight of *Chlorella vulgaris* algae over time

ne w badanym przedziale czasu  $\Delta\tau$ . Wyznaczone wartości dla przeprowadzonej próby zawarto na rysunku 4.

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono ciągle zmniejszanie produktywności masy mikroalg. Związane to jest niewątpliwie z ubożeniem, w przypadku hodowli okresowej, części składników pożywki. Z uzyskanych wartości danych doświadczalnych wynika jednak, że po stosunkowo krótkim czasie hodowli następowała stabilizacja szybkości narastania masy tych glonów. Średnia w tym przypadku produktywność (oceniana w kilku pomiarach) wyniosła  $8 \text{ mg}/(\text{dm}^3 \times \text{h})$ .

Niezależnie od badania wydajności procesu wyznaczano także na bieżąco gęstość optyczną próbek zawiesiny jako miarę ilości komórek w jednostce objętości cieczy. Wielkość tą wyznaczono z wykorzystaniem densytometru optycznego pracującego w zakresie długości fali 560 nm. Wyniki zmiany gęstości optycznej zawiesiny z algami w czasie zilustrowano na rysunku 5. Wartość gęstości optycznej (absorbancji) określano jako logarytm dziesiętny stosunku intensywności

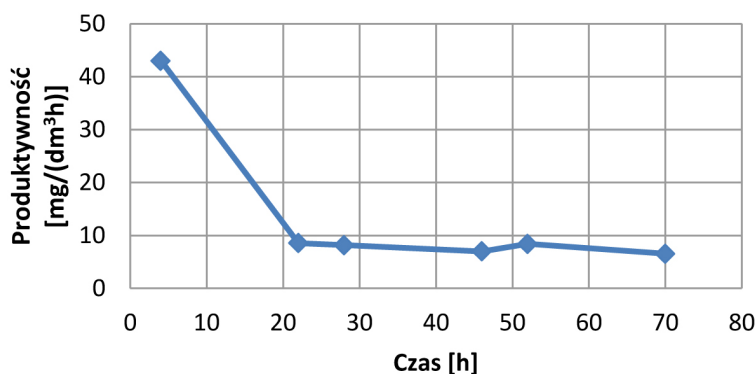
promieniowania na wejściu i wyjściu z próbki zawiesiny, tj.

$$A(\tau) = \log(I_p / I_k) \quad (2)$$

gdzie:  $I_p$  – intensywność promieniowania na wejściu do próbki zawiesiny;

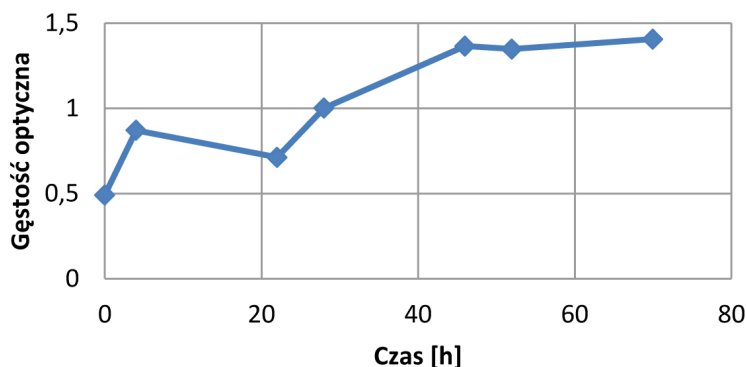
$I_k$  – intensywność promieniowania na wyjściu z próbki zawiesiny.

Z przebiegu wartości zmian gęstości optycznej zawiesiny wynika, że następuje jej ciągły wzrost, a jego intensywność związana jest niewątpliwie z przyrostem liczby komórek poszczególnych mikroalg. W oparciu o przeprowadzone badania mikroskopowe określono, że w badanym przedziale gęstości optycznej mieszaninie liczba komórek szczepu *Chlorella vulgaris* mieściła się w granicach od  $2,5 \times 10^6$  do  $25 \times 10^6$ . Warto w tym miejscu zaznaczyć, że podobne wartości gęstości optycznych oraz liczby komórek wyznaczali [Amini i in., 2011] w trakcie przebiegu hodowli glonów z rodzaju *Chlorella sp.*, również na pożywce produkcyjnej o tym samym składzie co użyta w badaniach własnych.



Rys. 4. Produktowność alg hodowanych na podłożu hodowlanym w czasie

Fig. 4. Productivity in the subsequent hours of the experiment over time



Rys. 5. Zmiany gęstości optycznej zawiesiny *Chlorella vulgaris* w czasie

Fig. 5. Changes to the optical density of a suspension of *Chlorella vulgaris* over time

## WNIOSKI

Uwzględniając uzyskane wyniki badań stwierdzono, że prezentowane w pracy stanowisko badawcze umożliwiło wytworzenie biomasy w ilościach porównywalnych z danymi literaturowymi oraz zapewniło utrzymanie sterylnych warunków podczas trwania hodowli, czego potwierdzeniem były wyniki obserwacji mikroskopowych, w których nie zaobserwowano żadnych zakażeń. Potwierdzenie skuteczności zastosowanej metodyki badań hodowli mikroglonów *Chlorella vulgaris* pozwoliły także na określenie dalszych planów badawczych.

Aktualnie, w tym zakresie, prowadzone są dalsze badania mające na celu określenie szerszej gamy parametrów mających wpływ na produktywność hodowli tego typu biomasy. W szczególności prowadzone są badania w kierunku określenia sposobu i intensywności oświetlenia hodowli, sposobu mieszania zawiesiny, określenia stężenia CO<sub>2</sub> w doprowadzanej mieszaninie gazów, zmian w składzie pożywki itp. Poszerzenie w ten sposób bazy danych doświadczalnych pozwoli na wskazanie korzystnych warunków produkcji tego typu glonów, które mogą stanowić zarówno alternatywę odnawialnych źródeł energii, jak i mogą być wykorzystane do usuwania CO<sub>2</sub> ze spalin czy też oczyszczania ścieków, a tym samym wykorzystane w ochronie środowiska.

## LITERATURA

1. Anderson R.A. Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press. 2005.
2. Amini S.R., Najafabady N. M., Mobasher M., Alhashemi S.H., Ghasemi Y., 2011. *Chlorella* sp.: A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor. *Applied Energy*. 88, 3354–3356.
3. Borowitzka M. A., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*. 70, 313–321.
4. Chai X., Zhao X., 2012. Enhanced removal of carbon dioxide and alleviation of dissolved oxygen accumulation in photobioreactor with bubble tank. *Bioresour Technology*. 116, 360–365.
5. Changling L., Hailin Y., Yuji L., Luping Ch., Meng Z., Ling Z., Wu W., 2013. Novel bioconversions of municipal effluent and CO<sub>2</sub> into protein riched *Chlorella vulgaris* biomass. *Bioresource Technology*. 132, 171–177.
6. Chen C. Y., Yeh K. L., Aisyah R., Lee D. J., Chang J. S., 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*. 102, 17–81.
7. Douskova I., Doucha J., Livansky K., Machat J., Novak P., Umysova P., Zachleder V., Vitova M., 2009. Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. *Appl Microbiol Biotechnol*. 82, 179–185.
8. Dziosa K., Makowska M., 2015. Wpływ temperatury na przyrost biomasy mikroalg słodkowodnych hodowanych w bioreaktorach laboratoryjnych. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*. 54, 152–153.
9. Guillard R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates in “Culture of Marine Invertebrate Animals”, Plenum Press, Nowy Jork 1975.
10. Guiry M.D., 2012. How many species of algae are there? *Phycological Society of America*. 48, 1057–1063.
11. Holtermann T., Madlener R., 2011 Assessment of the technological development and economic potential of photobioreactors. *Applied Energy*. 88, 1906–1919.
12. Jacob-Lopes E., Ferreira Lacerda L., M., C., Teixeira Franco T., 2008. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica* Nägeli in a bubble column photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 40(1), 27–34.
13. Jian-Ming L., Li-Hua Ch., Xin-Hua X., Lin Z., Huan-Lin Ch., 2010. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*. 101, 6797–6804.
14. Kujawska N, Latała A., Talbierz S., 2012. Opatentowany fotobioreaktor do produkcji nowych leków i nutraceutyków wytwarzanych na bazie mikroalg. *Przegląd Lekarski*. 69(10), 1031–1034.
15. Li J., Xu N. S., Su W. W., 2003. Online estimation of stirred-tank microalgal photobioreactor cultures based on dissolved oxygen measurement. *Biochemical Engineering Journal*. 14, 51–65.
16. Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14, 217–232.
17. 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.
18. Pegallapati A.K., Nirmalakhandan N., 2013. Internally illuminated photobioreactor for algal cultivation under carbon dioxide-supplementation: Performance evaluation. *Renewable Energy*. 56, 129–135.
19. Seo I., Lee I., Hwang H., Hong S., Bitog J. P., Kwon K., Lee C., Kim Z., Cuello J. L., 2012. Numerical

- investigation of a bubble-column photo-bioreactor design for microalgae cultivation. *Biosystems engineering*. 113, 229–241.
20. Singh R.N., Sharma S., 2012. Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16, 2347–2353.
21. Ugwu C.U., Aoyagi H., Uchiyama H., 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Biore-source Technology*. 99, 4021–4028.
22. Yoo C., Jun S. Y., Lee J. Y., Ahn C. Y., Oh H. M., 2010. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Biore-source Technology*. 101(1), S71–S74.
23. Zhang K., Kurano N., Miyachi S., 2002. Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng*. 25(2), 97–101.
24. Zijffers J-W. F., Janssen M., Tramper J., Wijffels R.H., 2008. Design Process of an Area-Efficient Photobioreactor. *Mar Biotechnol*. 10, 404–415.