

# Rast čiste kulture mikroalgi pri različitim uvjetima saliniteta i dužine svjetlosnog dana

---

**Jurgec, Monika**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:493178>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-23**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**RAST ČISTE KULTURE MIKROALGI PRI RAZLIČITIM  
UVJETIMA SALINITETA I DUŽINE SVJETLOSNOG DANA**

DIPLOMSKI RAD

Monika Jurgec

Zagreb, rujan 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Obnovljivi izvori energije u poljoprivredi

**RAST ČISTE KULTURE MIKROALGI PRI RAZLIČITIM  
UVJETIMA SALINITETA I DUŽINE SVJETLOSNOG DANA**

DIPLOMSKI RAD

Monika Jurgec

Mentor:

prof. dr. sc. Ana Gavrilović

Zagreb, rujan 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA  
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Monika Jurgec**, JMBAG 0178113619, rođen/a 01.11.1998. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**RAST ČISTE KULTURE MIKROALGI PRI RAZLIČITIM UVJETIMA SALINITETA I DUŽINE  
SVJETLOSNOG DANA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studenta / studentice*

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE**

**O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studenta/ice **Monika Jurgec**, JMBAG 0178113619, naslova

**RAST ČISTE KULTURE MIKROALGI PRI RAZLIČITIM UVJETIMA SALINITETA I DUŽINE  
SVJETLOSNOG DANA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. prof. dr. sc. Ana Gavrilović mentor

\_\_\_\_\_

2. prof. dr. sc. Neven Voća član

\_\_\_\_\_

3. prof. dr. sc. Tea Tomljanović član

\_\_\_\_\_

## Zahvala

Ovime zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima, kolegama i profesorima, asistentima i suradnicima. Hvala na svim iskustvima, putovanjima i prilikama, hvala na vrijednim lekcijama, na usponima i na padovima.

Zahvaljujem kolegicama sa studija Ani, Borni, Katarini i Nikolini, IAAS kolegama Ianu, Pauli i Marti te prijateljima od djetinjstva Ivi, Evi, Bruni i Franu.

Posebno hvala mentorici prof. dr. sc. Ani Gavrilović na prihvaćenom mentorstvu i nevjerojatnoj suradnji, dostupnosti, profesionalnosti i susretljivosti. Ovim putem zahvaljujem članovima povjerenstva, prof. dr. sc. Nevenu Voća i prof. dr. sc. Tei Tomljanović, na prihvaćenom sudjelovanju u obrani diplomskog rada.



## Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Monika Jurgec**, naslova

### **RAST ČISTE KULTURE MIKROALGI PRI RAZLIČITIM UVJETIMA SALINITETA I DUŽINE SVJETLOSNOG DANA**

Mikroalge zbog brze reprodukcije i visokog sadržaja ulja ističu se kao sirovina budućnosti u proizvodnji biogoriva. Donedavno su predstavljale ključne čimbenike u mrjestilištima riba i školjkaša, ali u posljednjih dvadeset godine sve su značajnija sirovina u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te industriji biogoriva. Na rast mikroalgi utječu brojni čimbenici kvalitete uzgojne sredine. Razumijevanje tih čimbenika od ključne je važnosti za optimizaciju njihovog uzgoja i održivu proizvodnju. U ovom je radu istraživana utjecaj saliniteta i dužine svjetlosnog dana na brzinu rasta čiste kulture mikroalge *Isochrysis galbana*. Pokus je proveden u dva ponavljanja te u dvije faze. U prvoj fazi je ispitan utjecaj različiti saliniteta (15, 25 i 35 ppt) dok su ostali uvjeti uzgoja bili konstantni. U drugoj je fazi ispitan utjecaj različitih duljina svjetlosnog dana (16, 18 i 24 sata). Rezultati su za obje faze uspoređeni ANOVA testom. Najbolji rast postignut je pri salinitetu od 25 ppt te pri konstantnom osvjetljenju, odnosno duljini svjetlosnog dana od 24 sata.

**Ključne riječi:** mikroalge, salinitet, svjetlosni dan, brzina rasta, biodizel



## Summary

Of the master's thesis – student **Monika Jurgec**, entitled

### **GROWTH OF PURE CULTURE OF MICROALGAE UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF SALINITY AND DAYLENGHT**

Microalgae, due to their rapid reproduction and high oil content, stand out as a future raw material in the production of biofuels. Until recently, they played a key role in fish and shellfish hatcheries, but in the last two decades, they have become increasingly important as a raw material in the food, pharmaceutical, and biofuel industries. The growth of microalgae is influenced by various factors in the cultivation environment. Understanding these factors is of crucial importance for optimizing their cultivation and ensuring sustainable production. This study investigates the impact of salinity and photoperiod on the growth rate of a pure culture of the microalgae *Isochrysis galbana*. The experiment was conducted in duplication and in two phases. The first phase examined the influence of different salinities (15, 25, and 35 ppt) while keeping other cultivation conditions constant. In the second phase, the impact of different photoperiods (16, 18, and 24 hours) was investigated. The results for both phases were compared using ANOVA testing. The best growth was achieved at a salinity of 25 ppt and under constant illumination, corresponding to a photoperiod of 24 hours.

**Keywords:** microalgae, salinity, photoperiod, growth rate, biodiesel

## SADRŽAJ

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Pregled literature.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Mikrolge.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Struktura stanice mikroalgi .....	3
2.1.2. Podjela s obzirom na veličinu stanica .....	3
2.1.3.1. Odjel Chrysophyta.....	5
2.1.3.1.1. Razred Prymnesiophyceae (sin. Haptophyceae) .....	5
2.1.3.1.1.1. Red Isochrysidales.....	6
<b>2.2. Uzgoj mikroalgi za proizvodnju biodizela .....</b>	<b>8</b>
2.2.1. Proizvodnja biogoriva od mikroalgi.....	9
<b>3. Materijali i metode .....</b>	<b>10</b>
<b>4. Rezultati .....</b>	<b>16</b>
<b>5. Rasprava .....</b>	<b>19</b>
<b>6. Zaključak .....</b>	<b>21</b>
<b>7. Popis literature .....</b>	<b>22</b>
<b>8. Prilog.....</b>	<b>26</b>
8.1. Tablice mjernih jedinica .....	26
<b>Životopis .....</b>	<b>28</b>

## 1. Uvod

Alge predstavljaju raznoliku skupinu biljnih fotosintetskih organizama koji obitavaju u vodenoj sredini, a dijele se na makroalge (višestanične morske alge) i mikroalge (jednostanične). Većina algi su fotoautotrofi, dok je samo nekoliko vrsta heterotrofne prirode. Iako se neke vrste odavno primjenjuju za prehranu stanovništva te u mrjestilištima akvatičnih organizama, u novije vrijeme postale su, osim za prehrambenu i farmaceutsku industriju, značajna sirovina i za proizvodnju biogoriva (Chen i sur., 2015a; Morales i sur., 2021; Gaurov i sur., 2024; Sánchez i sur., 2000.) treće i četvrte generacije. Dok sirovinu za goriva treće generacije predstavljaju konvencionalno uzgojene mikroalge, sirovinu za četvrtu generaciju predstavljaju genetski modificirane mikroalge (Chen i sur., 2015a; Moravvej i sur., 2019). Ova ekološki održiva alternativa fosilnim gorivima istražuje se i razvija u sklopu trenda „plave“ ili „zelene“ revolucije kako bi se smanjile emisije stakleničkih plinova i ovisnost o ograničenim naftnim resursima. S obzirom na sve veću potrebu za održivim izvorima energije, goriva treće generacije obećavaju ključnu ulogu u energetskom svijetu.

Mikroalge su jednostanični biljni organizmi koji se mogu prihvatiti na određenu površinu, ili pak slobodno lebditi u vodenom stupcu. One koje nalazimo u vodenom stupcu pripadaju fitoplanktonu. Upravo je ova fitoplanktonska skupina predstavljala ključni čimbenik u sustavima mrjestilišta ribe i školjkaša, no od početka 21. stoljeća sve je veća njihova primjena i u proizvodnji biogoriva. Primjenom različitih termokemijskih ili biokemijskih procesa od uzgojene biomase proizvode se ulje, plin, etanol, biodizel i bio-vodik (Demirbas, 2010). Izuzetno su prikladna sirovina za proizvodnju biodizela zbog prisutnosti velike količine lipida unutar stanice. Kako sastav lipida ovisi o vrsti mikroalgi, brojna su istraživanja posvećena kemijskom sastavu pojedinih vrsta (Morales i sur., 2021; Singh i Singh, 2015; Zarrinmehr i sur., 2020).

S obzirom na sve veću primjenu, povećava se i proizvodnja mikroalgi te se razvijaju tehnološki napredniji sustavi većeg proizvodnog kapaciteta koji koriste energiju sunca ili umjetno osvjetljenje (Gavrilović i sur., 2021). Količina lipida, ključni čimbenik koji ove jednostanične biljne organizme čini pogodnim kandidatom za proizvodnju biodizela, tako ne ovisi samo o vrsti, već i o optimiziranju čimbenika kvalitete uzgojne sredine. Mikroalge se u akvakulturi uzgajaju u tekućim kulturama, odnosno fertiliziranoj morskoj ili slatkoj vodi, gdje su stanice izložene svjetlu, ugljičnom dioksidu (CO<sub>2</sub>) te mineralima i drugim hranjivim tvarima (Rosenberg i sur., 2008). Brzina rasta uzgojenih populacija mikroalgi ovisi o različitim čimbenicima, od kojih su uz mineralni sastav uzgojnog medija, najvažniji salinitet, intenzitet svjetla i dužina svjetlosnog dana (Singh i Singh, 2015). Razumijevanje čimbenika koji utječu na brzinu rasta i kemijski čistih kultura pojedinačnih vrsta mikroalgi od ključne je važnosti za optimizaciju njihovog uzgoja (Sánchez i sur., 2000; Singh i Singh, 2015; Zarrinmehr i sur., 2020; Haris i sur., 2022).

## 1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je dublje razumijevanje utjecaja saliniteta i dužine svjetlosnog dana na brzinu rasta čiste kulture mikroalge *Isochrysis galbana*. Želimo utvrditi kako tri različita saliniteta (15, 25 i 35 ppt) utječu na brzinu rasta mikroalgi te identificirati optimalni salinitet za maksimalnu produktivnost. Analizirat će se kako varijacija u dužini svjetlosnog dana (16, 18 i 24 sata) utječe na brzinu rasta mikroalgi i definirati optimalne uvjete svjetla za najbržu reprodukciju. Kroz navedeno istraživanje, cilj je pružiti relevantne podatke i informacije koji će pomoći u optimizaciji uzgoja mikroalgi za proizvodnju biodizela, doprinoseći tako održivoj proizvodnji energije uz poticaj biogoriva treće generacije te posljedično smanjenju negativnog utjecaja na okoliš.

## 2. Pregled literature

### 2.1. Mikrolge

Mikroalge su vodeni jednostanični biljni organizmi koji se mogu prihvatiti na određenu površinu, ili pak slobodno lebde u vodenom stupcu.

Fitoplankton je skupni naziv za fotosintetske – autotrofne i miksotrofne, jednostanične ili kolonijalne mikroalge, mikroskopske biljke, kojima stanice lebde u vodi (Viličić, 2002).

#### 2.1.1. Struktura stanice mikroalgi

Stanična stijenka višeslojna je struktura koja se nalazi s vanjske strane stanične membrane (plazmaleme) te određuje oblik stanice i izdržava stanični turgor. Stanična stijenka se sastoji od mikrofibrila (vlaknaste niti) celuloze uklopljenih u amorfni matriks polisaharida, lipida i proteina te sadrži hemicelulozu. U vrsta čije stanice nemaju staničnu stijenku nalazi se periplast, struktura koju čine plazmatski ili amorfni slojevi nejednake gustoće, s vanjske ili unutrašnje strane od plazmaleme (Viličić, 2002). U proizvodnji biogoriva struktura stanične stijenke važna je i za sami tehnološki proces ekstrakcije te ju je potrebno poznavati (Jothibasur i sur., 2022).

Od morfoloških elemenata još treba spomenuti plastide i bič. Plastidi su stanične organele koje igraju ključnu ulogu u procesima fotosinteze te skladištenju energije. Plastidi sadrže pigmente, a fotosintetski pigment klorofil, zajednički svim algama, naziva se klorofil a (Viličić, 2002). Bič ili flagela je struktura koja omogućuje kretanje te se razlikuju u broju i duljini. Kod nekih algi, bičevi mogu biti glatki ili prekriveni sitnim dlačicama zvanim mastigoneme (specifično za odjel *Haptophyta*), dok kod nekih vrsta u potpunosti izostaju (Hubert i sur., 2017).

#### 2.1.2. Podjela s obzirom na veličinu stanica

S obzirom na veličinu stanica, prema Siubert-u i sur. (1978) fitoplankton se dijeli na tri veličinske kategorije:

- pikofitoplankton (stanice 0,2 – 2  $\mu\text{m}$ ),
- nanofitoplankton (stanice 2 - 20  $\mu\text{m}$ ),
- mikrofifoplankton (stanice > 20  $\mu\text{m}$ ).

### 2.1.3. Taksonomska klasifikacija

Oblik stanice te prisutnost i struktura stanične stjenke važni su elementi za taksonomsku klasifikaciju mikroorganizama koji su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Taksonomska klasifikacija fitoplanktona (Viličić, 2002)

<b>NADCARSTVO PROCARYOTA:</b>	<b>CARSTVO MONERA</b> <u>Odjel Cyanobacteria</u> (cijanobakterije, modrozelenne alge)
<b>NADCARSTVO EUCARYOTA:</b>	<b>CARSTVO PROTISTA</b> <u>Odjel Euglenophyta</u> - razred Euglenophyceae  <u>Odjel Dinophyta</u> (dinoflagelati)  <u>Odjel Chrysophyta:</u> - razred Bacillariophyceae (dijatomeje) - razred Primnesiophyceae red Coccoisphaerales (kokolitoforidi) - razred Chrysophyceae red Dyctiochaales (silikoflagelati)  <u>Odjel Chlorophyta</u> (zelene alge)

Mikroalga *Isochrysis galbana* pripada odjelu *Chrysophyta* te razredu *Primnesiophyceae*.

### 2.1.3.1. Odjel Chrysophyta

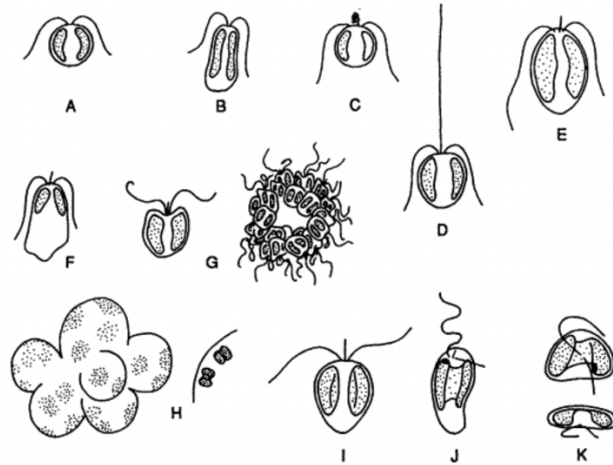
To su pokretne stanice koje imaju dva vršna biča dok ameboidne vrste nemaju bičeve. Oblik stanice često je okrugli ili piriformni (kao kruška). Stanična stijenka, ako je prisutna, građena je od pektina i celuloze uz mogućnost silifikacije. Rezervna tvar naziva se krizolaminaran (polimer glukoze) (Thronsdén, 1993). Prehranjuju se uz pomoć fototrofije (svjetlost, CO<sub>2</sub>, fotosinteza), miksotrofije (svjetlost, organski C) ili heterotrofije (organski C) (Alkhamis i Qin, 2013). Fitoplanktonske vrste nalaze se u obalnim i oceanskim područjima, ali uglavnom su ograničene na priobalne vode, posebno boćata zaštićena područja. Vrste bentoskih bičaša i nekoliko višestaničnih vrsta koje tvore niti i jednostavne talije prisutne su u morskom i boćatom okolišu (Thronsdén, 1993).

#### 2.1.3.1.1. Razred Prymnesiophyceae (sin. Haptophyceae)

Stanice koje pripadaju razredu *Prymnesiophyceae* jednostanične su vrste, nemaju staničnu stijenku, a periplast stvara celulozne ljuske i druge kalcificirane modifikacije. Pločice od kalcita nazivaju se kokoliti, a njihov oblik važan je za sistematiku. Stanice mogu biti pokretne, ameboidne i kokoidne, a neke vrste stvaraju palmeloidni i nitasti talus. Oblik stanice može biti sferičan, okrugao ili spljošten, izdužen ili sedlast. Stanica ima dva jednaka ili nejednaka vršna biča. Neke stanice ne posjeduju mastigoneme, cjevaste strukture na flagelama, po čemu se razlikuju i odvajaju u poseban odjel *Haptophyta* (Viličić, 2002). Boja je žuto-smeđa do zlatno-smeđa (Thronsdén, 1993), a karakterističan identifikacijski pigment naziva se 19'-heksanoiloksifukoksantin (Viličić, 2002).

Mastigoneme imaju ulogu u lakšem kretanju kroz vodeni medij koji olakšava hranjenje i preživljavanje u različitim uvjetima. Haptonema je specifična organela karakteristična za ovu skupinu, a ima ulogu u hvatanju čestica hrane i njihovom prijanjanju. Haptonema može biti razvijena, reducirana ili može izostati (Thronsdén, 1993).

Ovu skupinu karakterizira veličina stanice najčešće između 4 – 20 μm što ih svrstava u nanoplanktonske organizme (slika 1.). Poznato je oko 75 rodova i 500 vrsta koje su svrstane u 4 reda: *Isochrysidales*, *Prymnesiales*, *Coccosphaerales* i *Pavlovaes* (Viličić, 2002).



Slika 1. Prikaz razreda Prymnesiophyceae: (A) Dicrateria/Imantonia 3-8 um; (B) Isochrysis 5-6 um; (C,D) Chrysochromulina 4-26 um; (E) Prymnesium 6-18 um; (F) Platychrysis 6-12 um; (G) Corymbellus 8-11 um, colony 200 um; (H) Phaeocystis nonmotile in colony  $\geq 2000-8000$  um; (I) Phaeocystis motile 4.5-8 um; (J) Pavlova 4-10 um; (K) Diacronema 3-6 um. (Thronsdén, 1993)

#### 2.1.3.1.1.1. Red Isochrysidales

Postoje dva izomorfna i izodinamička biča, a haptonema u nekih vrsta reda *Isochrysidales* nedostaje (slika 2.). Pretežno se mogu naći u morskim sredinama, a rijetko u slatkim vodenim sredinama (Viličić, 2022).



Slika 2. Ilustracija *Isochrysis galbana* (Conrad, 1941).

Izvor: <https://tinyurl.com/5cj8dfcv>

*Isochrysis galbana* jedan je od primjera haptofitne mikroalge koja se često koristi u akvakulturi i istraživanju biodizela zbog svojih svojstava i sastava lipida (Maiko i sur., 2012).



Prvi su je identificirali Knight i Parke 1939. godine. *Isochrysis galbana* je prilično mala (5-6  $\mu\text{m}$ ), okrugla do ovalna stanica (2–5  $\mu\text{m}$ ; 40–50  $\mu\text{m}$ ) s dva glatka apikalna biča (slika 3.). U skladu s nazivom odjeljka, stanice posjeduju smanjenu haptonemu koji se naziva "vestigijalni" bič, umetnut između dva biča (slika 3.) (Hubert i sur., 2017).

Za razliku od drugih mikroalgi klasificiranih unutar reda *Isochrysidales*, kao što je *Emiliana huxleyi*, *I. galbana* nema dimorfni životni ciklus i ne formira kalcificirane kokolite. Osim toga, za razliku od *E. huxleyi*, *I. galbana* ima organske opne. Dimorfni životni ciklus znači da organizam prolazi kroz dvije različite morfološke faze u svom životnom ciklusu. To može uključivati promjenu oblika ili strukture između različitih stadija. Kod mikroalgi, dimorfni životni ciklus može uključivati promjenu između pokretnih i nepokretnih faza, ili između različitih oblika stanica (Hubert i sur., 2017).



Slika 3. SEM prikaz *Isochrysis galbana* (Steve Gschmeissner, Photo Library, 2018)

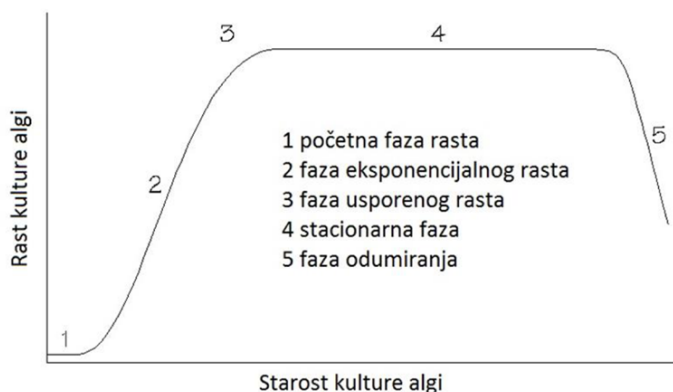
Izvor: <https://tinyurl.com/2z2hb2rn>

*Isochrysis galbana* nema čvrstu staničnu stijenku, što olakšava proces ekstrakcije lipida u usporedbi s drugim mikroalgama. Ova karakteristika pojednostavljuje oslobađanje lipida, što je ključno za proizvodnju biogoriva, jer smanjuje potrebu za snažnim predtretmanima koji su često potrebni za razgradnju staničnih stijenki kod drugih vrsta (Señoráns i sur., 2020). Ova osobina, zajedno s visokim udjelom lipida, čini *I. galbana* vrlo pogodnom za proizvodnju biodizela. Ova vrsta mikroalge ujedno pokazuje i bolja svojstva biodizela zbog većeg sadržaja zasićenih masnih kiselina što je istraživanjem pokazao Atmanli (2020). Pogodnost ove vrste za proizvodnju biodizela ističu i Ruiz-Domínguez i sur. (2022).

## 2.2. Uzgoj mikroalgi za proizvodnju biodizela

Mikroalge karakterizira brzi rasti, što ih čini povoljnom sirovinom za biogoriva jer je u kratkom vremenu moguće dobiti veliku količinu biomase. Osnovni izazov za kultiviranje algi je stvaranje odgovarajućeg medija koji treba oponašati prirodne uvjete (Hemaiswarya i sur., 2011). Medij sadrži potrebne hranjive tvari koje podržavaju rast i razvoj algi, uključujući makronutrijente i mikronutrijente, te uključuje spojeve koji osiguravaju izvore dušika (N), fosfora (P), vitamina, elemenata u tragovima poput željeza (Fe), mangana (Mn), kobalta (Co) i drugih (Kumar i sur., 2013).

Rast kulture algi sastoji se od nekoliko faza: faza indukcije, eksponencijalnu faza brzog razmnožavanja, faza usporavanja rasta, stacionarna faza i faza odumiranja (slika 4.) (Gavrilović i sur., 2021). Svaka od ovih faza ima svoje karakteristike i utječe na nutritivnu vrijednost algi.



Slika 4. Prikaz faze rasta kulture u usporedbi sa starosti kulture (Gavrilović, 2021)

Sve aktivnosti u procesu uzgoja algi obavljaju se prema uspostavljenom protokolu, uključujući provođenje svih sanitarnih pravila i pravila higijene kako bi se osigurao uspješan rast i kvalitetan proizvod. Odstupanja od optimalnih uvjeta također mogu usporiti rast kulture i/ili smanjiti nutritivnu vrijednost algi (Gavrilović i sur., 2021; Đođo, i sur 2022), odnosno utjecati na promjene kemijskog sastava što se negativno odražava na kvantitetu i/ili kvalitetu sirovine za biogoriva (Fabregasa i sur., 1985; Zhu i Chao, 1997; Ho i sur., 2014; Cañavate i sur., 2020; Wolfe i sur., 1998; Sánchez i sur., 2000a; Singh i Singh, 2015; Zarrinmehr i sur., 2020; Haris i sur., 2022).

### 2.2.1. Proizvodnja biogoriva od mikroalgi

Biogoriva se proizvode fermentacijom bioloških sirovina koje sadrže fermentabilne šećere, lipide ili ugljikohidrate. To se postiže pretvaranjem biomase sirovina u različite oblike energije kao što su toplina, električna energija, bioplin i tekuća goriva. Klasificiraju se u prvu, drugu, treću i četvrtu generaciju. Svaka generacija biogoriva ima za cilj zadovoljiti globalnu potražnju za energijom uz minimiziranje utjecaja na okoliš te ima svoje prednosti i nedostatke (Mat i sur., 2020).

Biogorivo treće generacije ekstrahira se iz biomase konvencionalnih mikroalgi. Mikroalge imaju višu stopu rasta u usporedbi s drugim biljkama i ne zahtijevaju obradivo ili veliko zemljište te doprinose globalnom smanjenju CO<sub>2</sub> iz atmosfere. Sirovinu za biogoriva četvrte generacije predstavljaju genetski modificirane mikroalge. Cilj je proizvesti mikroalge koje mogu apsorbirati velike količine ugljikovog dioksida (CO<sub>2</sub>), povećati produktivnost biogoriva i prilagodljivost mikroalgi u otpadnim vodama koristeći napredne tehnologije. Genetski modificirane mikroalge smatraju se ugljično negativnima jer je količina ispuštenog CO<sub>2</sub> manja od količine apsorbirane CO<sub>2</sub>. Biodizel se proizvodi iz ulja mikroalgi, pa se tako sirova fosilna nafta može zamijeniti uljem mikroalgi uzgojenih u velikim količinama za ekološki održivu proizvodnju biodizela u bliskoj budućnosti (Mat i sur., 2020).

Istraživanja Rodolfija i sur. (2009) pokazalo je da lipidi mogu činiti i do 80% suhe mase mikroalgi, ovisno o uvjetima rasta, čime *I. galbana* postaje izuzetno važan izvor sirovina za proizvodnju biodizela. Sun i sur. (2018) ističu da *I. galbana*, zbog odsustva stanične stijenke i visokog sadržaja bioaktivnih spojeva poput fukoksantina i masnih kiselina, dodatno olakšava proces ekstrakcije lipida. Povezivanje spomenutih rezultata i otkrića s radom Maiko i sur. (2012) naglašava ekološke prednosti korištenja biodizela iz algi, uključujući smanjenje emisija CO<sub>2</sub> i SO<sub>2</sub>, što čini *I. galbana* potencijalnom sirovinom za održivu proizvodnju biogoriva.

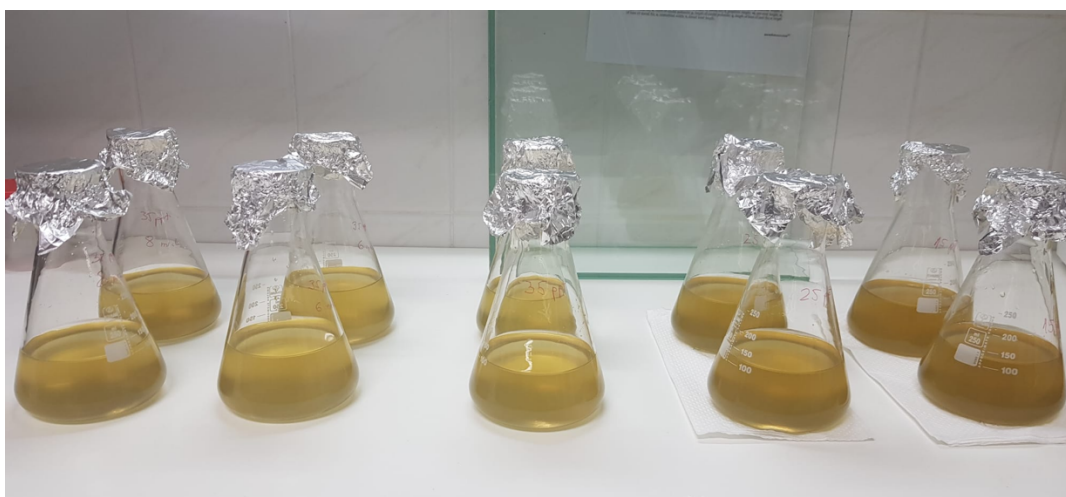
Sve prethodno navedena istraživanja upućuju na važnost optimizacije rasta i biokemijskog sastava *I. galbana* radi maksimalnog iskorištavanja za proizvodnju biodizela. Poznavanje uvjeta koji potiču lipidnu sintezu i povećanje biomase može osigurati visoku produktivnost i isplativost biodizela iz mikroalgi.

### 3. Materijali i metode

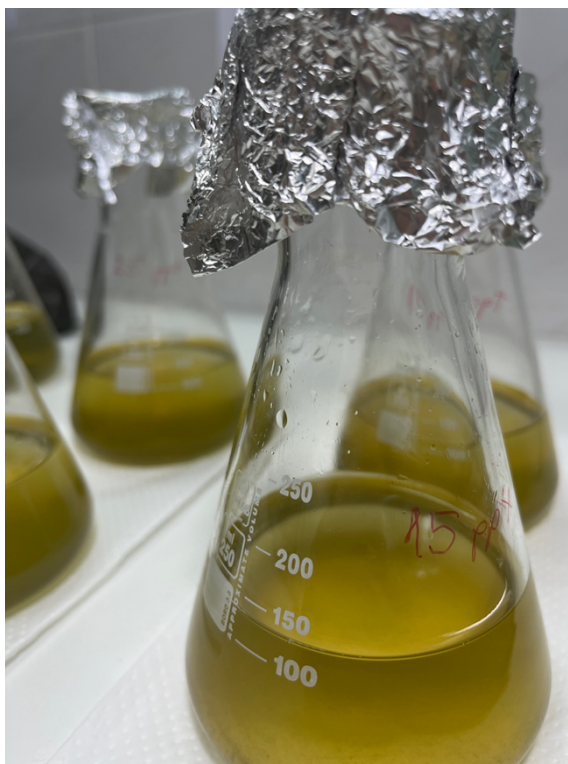
Istraživanje je provedeno u dvije faze kako bi se bolje utvrdili pojedinačni utjecaji saliniteta i fotoperioda na rast populacije mikroalge *I. galbana*. U prvoj fazi istraživanja, analiziran je utjecaj tri različita saliniteta na brzinu rasta čistih kultura mikroalgi. Druga faza istraživanja fokusirana je na varijaciju u dužini svjetlosnog dana (16, 18 i 24 sata) pri konstantnom salinitetu te je analizirano kako ta promjena utječe na brzinu rasta monokulture *I. galbana*. Kultura je bila nasađena prema protokolu za uzgoj mikroalgi i praćenje rasta, koji su opisali Gavrilović i sur. (2021). Pokusi su bili provedeni u dva ponavljanja, a obavljani su na Zavodu za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju Agronomskog fakulteta u Zagrebu. Razlika između različitih skupina istog pokusa testirana je ANOVA testom. Svi ostali relevantni parametri uzgoja *I. galbana* bili su konstantni tijekom eksperimenata kako bi se osigurala pouzdana i usporediva analiza.

Na početku, zrele matične kulture (ukupno 50 ml) presađene su u veće volumene, pri čemu se koristio omjer od 1:5 između volumena kulture algi i volumena filtrirane morske vode. Morska voda je prije toga klorirana i deklorirana kako bi se osigurala čista i sigurna sredina za rast algi.

Kao što je prikazano na slici 5., za provedbu pokusa pripremljeno je deset Erlenmayerovih tikvica (slika 5.) s različitim koncentracijama saliniteta te se svaka koncentracija nasadila dva puta. Odabrana kultura je izlagana svjetlu 24 sata za salinitet 15ppt, 25ppt i 35ppt te su dvije od dodatne četiri tikvice saliniteta 35 ppt bile pokrivene 6 sati, a druge dvije 8 sati za cijelo vrijeme trajanja pokusa. Otvor svake Erlenmayerove tikvice bio je prekriven aluminijskom folijom kako bi se spriječila moguća kontaminacija (slika 6.).



Slika 5. Prikaz postavljanja pokusa u laboratoriju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na Zavodu za ribarstvo, pčelarstvo, lovstvo i specijalnu zoologiju



Slika 6. Prikaz oznaka koncentracija Erlenmayerovih tikvica i uzgojene kulture prekrivene aluminijskom folijom

Nasađivanje čiste kulture obavljeno je prema protokolu za uzgoj (Gavrilović i sur., 2022):

1. U steriliziranu vodu dodan je hranjivi medij: komercijalni Guillard F/2 medij (1g na 10 l).
2. Osiguran dovod zraka: filtriranjem zraka kako bi se spriječila kontaminacija kulture te opskrbilo alge s ugljikovim dioksidom ( $\text{CO}_2$ ) za dovoljnu količinu svjetla (fotosintezu) i održavanje algi u suspenziji.
3. Održavana optimalna temperatura u prostoriji: uz pomoć klima uređaja.
4. Svakodnevno je praćena koncentracija algi: pomoću hemocitometra.

Neke od ključnih značajki uzgojnog medija *Guillard F/2* su:

1. Sastav: Medij *Guillard F/2* sadrži različite tvari potrebne za rast i razmnožavanje fotosintetskih mikroorganizama. To uključuje anorganske soli, mikronutrijente i tragove metala.
2. Formulacija: Formulacija medija temelji se na sastavu morske vode, koja je osnovni okoliš za ove organizme. Medij se priprema miješanjem različitih soli i tvari u određenim omjerima.
3. Fleksibilnost: *Guillard F/2* medij može se prilagoditi različitim potrebama organizama promjenom koncentracija određenih komponenata. Ovo je korisno jer različite vrste mikroalgi i dinoflagelata mogu imati različite zahtjeve za hranjivim tvarima.
4. Pogodnost za istraživanje: Zbog svoje precizne formulacije, medij *Guillard F/2* često se koristi u znanstvenim istraživanjima kako bi se proučavale fiziologija i ekologija fotosintetskih mikroorganizama. Također je koristan za održavanje stabilnih kultura ovih organizama u laboratorijskim uvjetima.

*Guillard F/2* je posebno koristan za proučavanje organizama koji obitavaju u morskim ekosustavima jer se može koristiti za prilagodbu kultura na uvjete slične morskoj vodi (Guillard, 1975).

Formulacija *Guillard F/2* medija je dobro poznata i često se koristi u istraživanjima i uzgoju fotosintetskih mikroorganizama. Približne formulacije medija *Guillard F/2* po elementima su :

1. Anorganske soli:

Nitrati ( $\text{NaNO}_3$ ) kao izvor dušika

Fosfati ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) kao izvor fosfora

Sulfati ( $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ) kao izvor magnezija

Kloridi ( $\text{NaCl}$ ) kao izvor natrija

Kloridi ( $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ) kao izvor kalcija

2. Mikronutrijenti:

željezo (Fe), mangan (Mn), cink (Zn), bakar (Cu), kobalt (Co), molibden (Mo), selen (Se) i drugi.

Koraci kojih smo se pridržavali provodeći istraživanje sastojali su se od:

1. Priprema posuđa i pribora,
2. Priprema stakalca,
3. Priprema hemocitometra,
4. Uzimanje uzorka matičnih kultura za svaku,
5. Erlenmayerovu tikvicu,
6. Razrjeđivanje kulture s 70-postotnim etanolom Kontrola i određivanje gustoće kulture.

Korišteno posuđe osim Erlenmayerovih tikvica u kojima je kultura bila nasadena, sastojalo se od staklenih te plastičnih jednokratnih pipeta za uzimanje uzorka kao i čašice za miješanje kulture i alkohola kako bismo umrtvili kulturu, posebice pri kraju istraživanja, za lakše očitavanje i brojanja kulture. Nakon pripremljenog uzorka za analizu, kap kulture stavljala se na hemocitometar za očitavanje i prekriva pokrovnim stakalcem. Hemocitometar je laboratorijski instrument koji se koristi za brojanje stanica u biološkim uzorcima pod mikroskopom. Točnost brojanja ovisi o pažljivoj pripremi uzorka i preciznom mikroskopskom promatranju, a pomaže i u preciznom određivanju koncentracije stanica, njihove veličine i oblika.

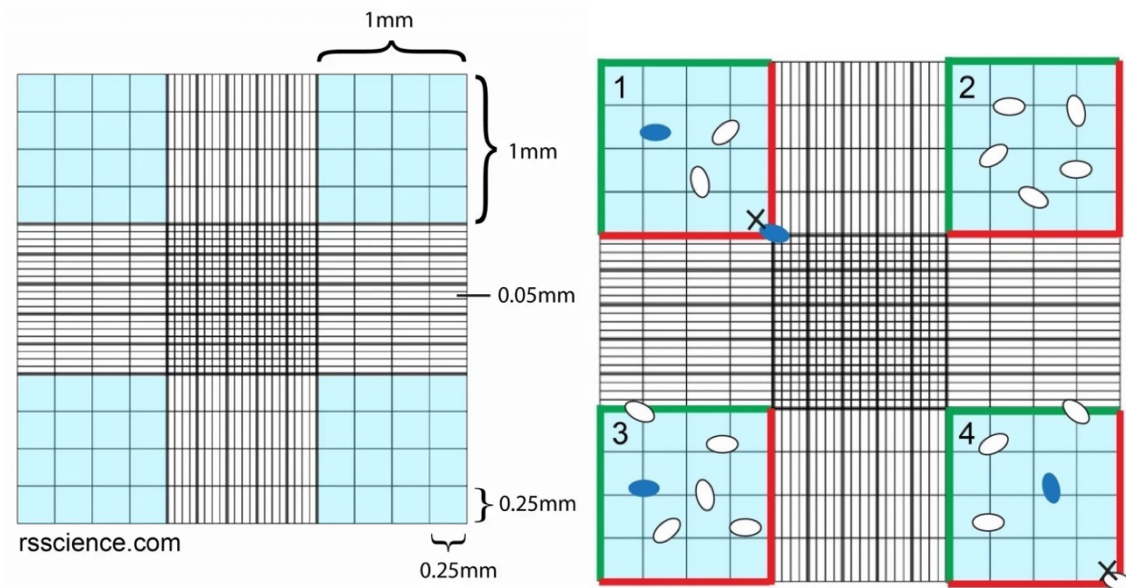
Glavne komponente hemocitometra prikazane na slici 7. uključuju stakleni stlačeni pokrovni komad, često poznat kao stakleni pokrovac, koji se postavlja iznad mikroskopskog staklenog slajda. Između ta dva staklena sloja nalazi se određeni volumen uzorka, koji je često definiran sitnim udubinama ili komorama na slajdu. Ove komore su pravilnih dimenzija i poznate zapremine (slika 7.).



Slika 7. Hemocitometar s dva pokrovna stakalca u lijevom kutu slike

Postupak brojanja stanica uz pomoć hemocitometra uključuje:

1. Pripremu uzorka: Uzorak treba pripremiti tako da se stanice ravnomjerno rasporede u komorama hemocitometra što se postiže razrjeđivanjem uzorka kako bi se postigla prikladna koncentracija stanica.
2. Postavljanje hemocitometra: Stakleni pokrovac se pažljivo postavlja na stakleni slajd s komorama kako bi se stvorio precizno definiran volumen uzorka.
3. Brojanje stanica: Pod mikroskopom, promatraju se stanice unutar komora hemocitometra te se broje u određenim segmentima komora ili na temelju njihove prisutnosti unutar kvadrata mreže koja je obično označena na hemocitometru (Slika 8.).



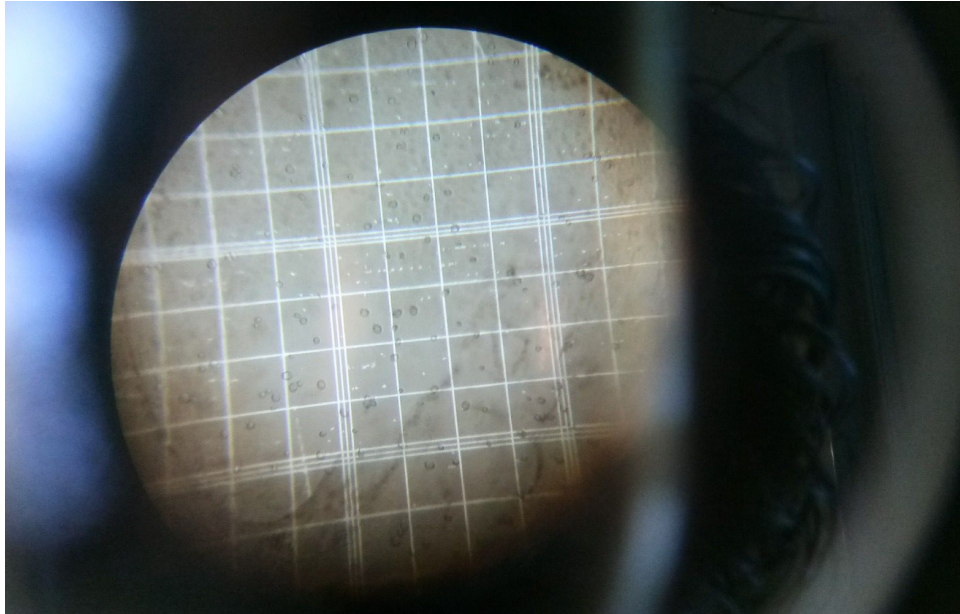
Slika 8. Prikaz hemocitometra i načina brojanja kulture

Izvor: <https://tinyurl.com/3efx7b4b>

Brojanje kultura uz pomoć hemocitometra u pokusu izvodilo se brojanjem nasumične dvije unutarnje stijenke te nasumično odabirući 8 vanjskih stjenki kako bismo dobili prosječnu vrijednost. Postupak brojanja se ponavljao deset puta za jedan uzorak određenog saliniteta. Za istu koncentraciju, identičan postupak se ponavljao za drugu Erlenmayerovu tikvicu. Isto smo ponavljali dva puta za svaki uzorak svake tikvice. Na kraju svakog brojanja svih uzoraka, imali smo 100 vrijednosti (20 po jednoj vrsti koncentracije, odnosno 10 po tikvici).

Brojeći stanice unutar kvadrata kao što je prikazano na slici 8., može se izračunati koncentracija stanica u uzorku. Važno je napomenuti da je preciznost brojanja stanica na hemocitometru ovisi o točnom mikroskopskom promatranju (slika 9.) i pažljivoj pripremi uzorka, kao i o odgovarajućoj kalibraciji za odabrani brojački faktor.





Slika 9. Prikaz mreže hemocitometra kroz pogled okulara mikroskopa

Izračunavanje koncentracije vrši se na temelju broja stanica prebrojanih u poznatom volumenu uzorka te izračunom ukupne koncentracije stanica u uzorku uz pomoć formule (formula 1.).

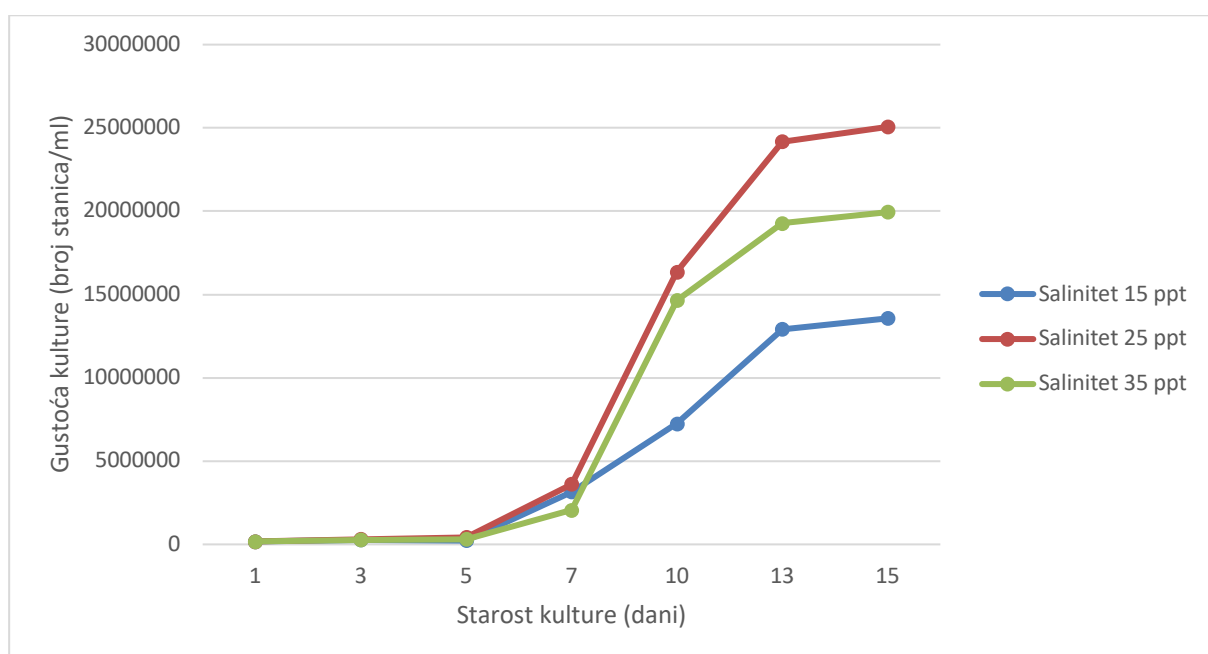
Formula 1. Prikaz formule izračuna gustoće stanica kultura (Algae to Energy, Hemocytometer Use, 2015)

$$\frac{\text{Prosječan broj stanica} \times \text{Faktor razrjeđenja (ako postoji)}}{\text{Volumen uzorka}} = \text{Gustoća stanica}$$

Izvršena je analiza varijance (ANOVA) kako bi se provjerila statistička značajnost razlika između različitih svjetlosnih uvjeta, a ANOVA test omogućuje procjenu varijabilnosti između grupa i utvrđivanje postojanja statistički značajnih razlika među njima.

## 4. Rezultati

Tijekom prva tri dana istraživanja, kulture algi na svim salinitetima rastle su približno ujednačeno. Od petog dana nakon nasađivanja zabilježeno je da kulture na salinitetu od 25ppt postižu veću prosječnu gustoću od ostalih s 426.800 stanica/ml. Sedmoga dana kulture uzgajane na salinitetu od 15ppt i 25ppt dostigle su veću prosječnu gustoću od algi uzgajanih na 35ppt s 3.150.300 i 3.625.000 stanica/ml. Nakon desetog dana zabilježen je brži rast kultura uzgajanih na salinitetu od 25ppt i 35ppt u odnosu na alge uzgajane na 15ppt. Prosječna gustoća uzgojnih kultura su petnaestog dana od početka istraživanja iznosile 13.567.000 stanica/ml na 15ppt, 25.061.000 stanica/ml na 25ppt i 19.943.000 stanica/ml na salinitetu od 35ppt (grafikon 1.).



Grafikon 1. Prosječna gustoća kultura uzgajanih na različitim salinitetima

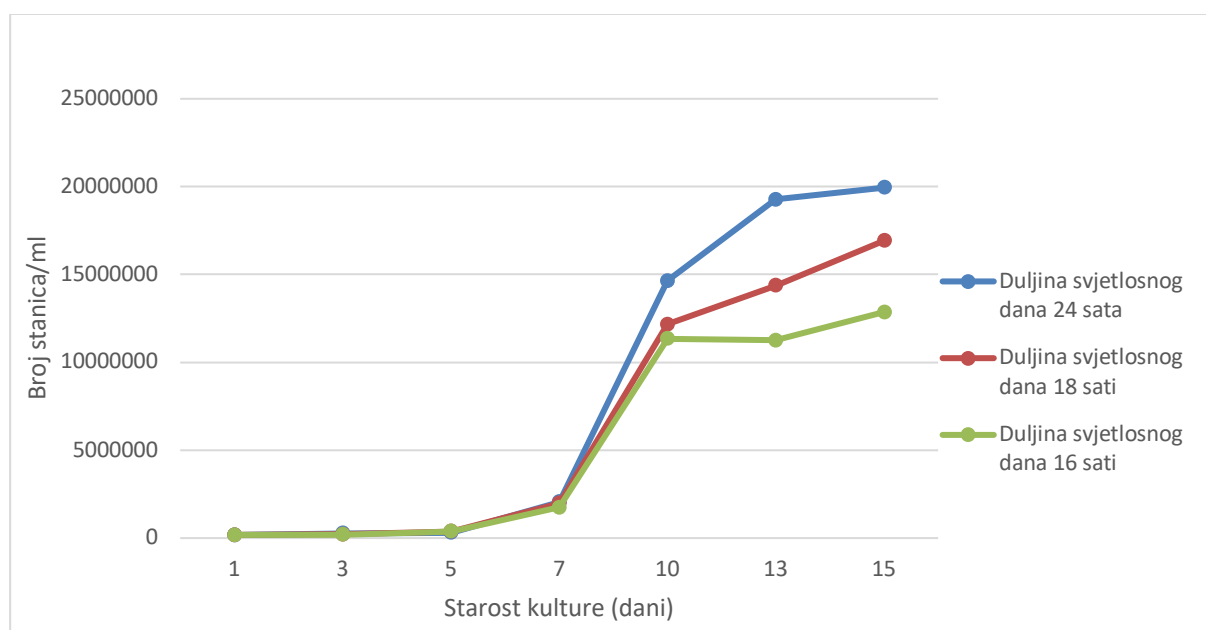
ANOVA testom utvrđene su statistički značajne razlike u prosječnim gustoćama uzgajanih kultura algi od petoga do petnaestoga dana od početka eksperimenta (tablica 2.). Petoga dana utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između algi uzgajanih na 15ppt i 25ppt te između algi uzgajanih na 15ppt i 35ppt.

Sedmog dana utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između algi uzgajanih na 15ppt i 35ppt te algi uzgajanih na 25ppt i 35ppt. Desetog dana utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između algi uzgajanih na 15ppt i 25ppt te algi uzgajanih na 15ppt i 35ppt. Nakon trinaestog dana utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između algi uzgajanih na svim salinitetima.

Tablica 2. Analiza gustoće uzgojnih kultura algi na različitim salinitetima

Starost kulture (dani)	Prosječna gustoća uzgojnih kultura algi (broj stanica/ml) na različitim salinitetima			Parametri ANOVA testa	
	Salinitet ppt	15 ppt	Salinitet 25 ppt	Salinitet 35 ppt	F vrijednost
1	180000	180000	180000	-	-
3	270300	315300	269300	4.73	0.12
5	239500	426800	309200	35.22	0.008
7	3150300	3625000	2062500	339.84	0.0003
10	7250600	16362500	14650000	3370.69	0.0001
13	12920000	24175000	19275000	2602.54	<0.00001
15	13567000	25061000	19943000	4017.35	<0.00001

Trećeg dana od nasađivanja, zabilježen je najbrži rast algi uzgajanih na 24-satnom svjetlosnom danu s gustoćom od 269300 stanica/ml. Petog dana najveća prosječna gustoća zabilježena je kod algi uzgajanih na 16-satnom svjetlosnom danu i iznosila je 382200 stanica/ml. Nakon desetog dana najveća prosječna gustoća zabilježena je kod algi uzgajanih na 24-satnom svjetlosnom danu s prosječnom gustoćom od 14650000 stanica/ml, a najmanja na 16-satnom svjetlosnom danu s prosječnom gustoćom od 11340000 stanica/ml. Takav se trend nastavio do kraja istraživanja. Prosječna gustoća algi uzgajanih na 24-satnom svjetlosnom danu petnaestog dana iznosila je 19.943.000 stanica/ml, na 18-satnom svjetlosnom danu 16.921.000 stanica/ml i 12.863.000 stanica/ml na 16-satnom svjetlosnom danu (grafikon 2.).



Grafikon 2. Prosječna gustoća kultura uzgajanih na različitim duljinama svjetlosnog dana

Nadalje, utvrđene su statistički značajne razlike u prosječnim gustoćama uzgojnih kultura algi na različitim duljinama svjetlosnog dana od trećeg do petnaestog dana od početka eksperimenta (tablica 3.). Utvrđene su statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) trećeg dana između algi uzgajanih na 24-satnom i 16-satnom svjetlosnom danu. Petog dana utvrđene su statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) između prosječnih gustoća algi uzgajanih na 24-satnom i 18-satnom svjetlosnom danu.

Sedmog dana utvrđene su statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) između prosječnih gustoća algi uzgajanih na 24-satnom i 16-satnom svjetlosnom danu te između algi uzgajanih na 18-satnom i 16-satnom svjetlosnom danu.

Nakon desetog dana utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0.05$ ) između algi uzgajanih na svim duljinama svjetlosnog dana.

Tablica 3. Analiza gustoće uzgojnih kultura algi na različitim duljinama svjetlosnog dana

Starost kulture (dani)	Prosječna gustoća uzgojnih kultura algi (broj stanica/ml) na različitim duljinama svjetlosnog dana			ANOVA	
	24 sata	18 sati	16 sati	F vrijednost	p vrijednost
1	180000	180000	180000	-	-
3	269300	221300	199300	13.57	0.03
5	309200	382200	371200	10.67	0.04
7	2062500	1982500	1742000	18.55	0.02
10	14650000	12170000	11340000	564.77	0.0001
13	19275000	14375000	11264000	2454.28	<0.00001
15	19943000	16921000	12863000	1648.01	<0.00001

## 5. Rasprava

Rezultati dobiveni u istraživanju koje smo proveli o rastu *I. galbana* pod različitim uvjetima saliniteta i duljine svjetlosnog dana pretežito su u skladu s prethodnom literaturom poput Maiko i sur. (2012) te Fabregas i sur. (1985), ali donose i dodatne uvide u specifične uvjete rasta. Optimalni rast mikroalge *I. galbana* utvrđen je pri salinitetu od 25 ppt, dok je rast na nižim (15 ppt) i višim (35 ppt) vrijednostima saliniteta bio sporiji, posebno nakon početnih faza eksperimenta. Rezultati koje smo dobili postavljenim pokusom podudaraju se s istraživanjem Fabregasa i sur. (1985), koji su također utvrdili da je optimalan raspon saliniteta između 15ppt i 35ppt, što rezultira najvišom proizvodnjom biomase. Njihovo istraživanje potvrđuje važnost saliniteta, koncentracije hranjivih tvari, svjetlosti i temperature kao ključnih parametara za optimalan rast algi.

Slično našim rezultatima, bolji rast *I. galbana* na 25 psu utvrđen je pri istraživanju koje su proveli Đođo i sur., 2022. Cilj istraživanja bio je ispitati pogodnost otpadne vode saliniteta 25 psu iz recirkulacijskog akvakulturnog sustava za uzgoj mikroalge i usporediti rast ove mikroalge u otpadnoj vodi s rastom u steriliziranoj morskoj vodi obogaćenoj komercijalnim uzgojnim medijem F/2 pri različitim salinitetima (25 ppt i 33 ppt). Rezultati su pored boljeg rasta na 25 ppt pokazali kako su sastav i količina nutrijenata u otpadnoj vodi su dovoljni za uspješan uzgoj *I. galbana* te da sniženi salinitet povoljno utječe na rast mikroalge u oba medija (otpadnoj vodi i komercijalnom uzgojnom mediju).

S druge strane, istraživanje koje su provodili Caňavate i sur. (2020) pokazuje da niži salinitet (5 ppt) dovodi do povećanja lipidnog sadržaja, iako ovaj parametar ne garantira nužno maksimalnu staničnu gustoću. To je djelomično u suprotnosti s postavljenim pokusom gdje optimalna gustoća nije postignuta na nižim razinama saliniteta, već na 25 ppt, dok visoki salinitet (35 ppt) također nije doveo do povećanja gustoće. Navedeni rezultati sugeriraju da *I. galbana* troši svoje lipidne rezerve na prilagodbu jačem osmotskom stresu pri višem salinitetu, što je zaključak koji se poklapa s istraživanjem kojeg su proveli Wolfe i sur. (1998), koji su proučavali adaptivne mehanizme algi na osmotski stres.

Istraživanje utjecaja duljine svjetlosnog dana na rast *I. galbana* pokazalo je da najbrži rast i najviša gustoća stanica dolaze pod uvjetima konstantnog osvjetljenja, odnosno 24-satnog svjetlosnog dana, dok su alge uzgajane pod kraćim dnevnim svjetlosnim ciklusima (16 i 18 sati) imale sporiji rast. Ovi rezultati su u skladu s nalazima Sánchez i sur. (2013), koji su pokazali da stalna opskrba svjetlom i nutrijentima, kao i prisutnost miješanja koju osigurava aeracija, potiče bolji rast algi. Dodatan CO<sub>2</sub> također igra važnu ulogu, što je dodatno potvrđeno i kod Fabregasa i sur. (1985), gdje povećanje koncentracije hranjivih tvari nije bilo jednako važno kao pristup CO<sub>2</sub> za maksimalnu proizvodnju biomase.

U istraživanju koje su radili Yoshioka i sur. (2012), morska mikroalga *I. galbana* uzgajana je pod različitim režimima osvjetljenja kako bi se ispitale promjene u rastu i profilu masnih kiselina. Dobiveni su preliminarni rezultati da *I. galbana* uzgajana pod bijelim isprekidanim svjetlom 24 sata dnevno pokazuje bolji rast od kontinuiranog bijelog svjetla s ciklusima svjetlost-tama od 12 sati svjetla i 12 sati tame.

Autori istraživanja iz 2009. godine ističu kako rast i produktivnost mikroalgi u fotobioreaktorima nisu značajno ovisili o dužini svjetlosnog dana. U tom pokusu je uspoređivan rast mikroalgi koje su bile konstantnom osvjetljene (0:24) s onim pod fotoperiodom od (2:22). Oni kao veći problem ističu u gustoću stanica koje mogu uzrokovati međusobno zasjenjivanje, što dovodi do nejednake izloženosti svjetlu unutar reaktora (Jacob-Lopes i sur., 2009.). Ovo pak pokazuje neadekvatan dizajn fotobiorektora jer nisu osigurani adekvatni uvjeti miješanja algi kako bi bile ujednačeno izložene svjetlu.

Konačno, rezultati provedenog istraživanja ukazuju na to da dulji svjetlosni periodi i salinitet od 25 ppt potiču najveći rast *Isochrysis galbana*, dok bismo mogli pretpostaviti da niže razine saliniteta mogu biti korisnije za proizvodnju lipida. Naime, istraživanje Cañavate i sur. (2020) sugerira da ekstremno nizak salinitet od 5‰ može povećati lipidni sadržaj ove vrste mikroalge, iako to ne osigurava maksimalnu gustoću stanica. Prema Wolfeu i sur. (1998) *I. galbana* pokazuje toleranciju prema širem rasponu saliniteta, ali pri tome gubi lipidne rezerve kako bi se prilagodila osmotskom stresu. Slično navedenom, Sukenik i Wahnou (1991) istraživali su utjecaj uvjeta okoliša, poput intenziteta svjetlosti i dostupnosti dušika, na stanični kemijski sastav s posebnim naglaskom na sadržaj lipida u kontinuirano uzgojenim kulturama *I. galbana*. Visoki intenzitet svjetlosti uzrokovao je nakupljanje ugljikohidrata, dok se sadržaj lipida u stanici blago smanjio. Međutim, ograničenje dušika uzrokovalo je povećanje udjela ugljikohidrata i lipida. S obzirom da u našem pokusu nije određivan kemijski sastav mikroalgi ove bi analize trebalo obuhvatiti narednim istraživanjima. Usporedba s prethodnim istraživanjima jasno naglašava važnost optimizacije i usklađivanja faktora poput saliniteta, svjetlosnog ciklusa i hranjivih tvari za postizanje različitih ciljeva, bilo da se radi o maksimalnoj gustoći stanica ili povećanju lipidnog sadržaja za biotehnološke primjene i proizvodnju biogoriva.

Sveukupno, literaturni izvori pokazuju da uspješan uzgoj *Isochrysis galbana* ovisi o preciznom balansiranju uvjeta poput saliniteta, temperature, fotoperioda, pH vrijednosti i dostupnosti hranjivih tvari. Pravilna optimizacija ovih čimbenika ne samo da može poboljšati rast, već i povećati akumulaciju lipida, čineći ovu mikroalgu pogodnom za biotehnološke primjene, uključujući proizvodnju biodizela.

## 6. Zaključak

Prema rezultatima provedenog istraživanja može se zaključiti kako samo u nekoliko dana gustoća kulture *I. galbana* u uzgojnom mediju ima eksponencijalan rast što potvrđuje literaturne navode o karakteristikama rasta uzgojnih populacija mikroalgi.

Od tri ispitana saliniteta (15ppt, 25 ppt i 35ppt) monokultura *I. galbana* najbolje je rasla na 25ppt. Trećeg dana od nasađivanja, zabilježen je najbrži rast algi uzgajanih na 24-satnom svjetlosnom danu. Nakon desetog dana najveća prosječna gustoća zabilježena je kod algi uzgajanih na 24-satnom svjetlosnom danu, a najmanja na 16-satnom svjetlosnom danu. Takav se trend nastavio do kraja eksperimenta, odnosno postizanja stacionarne faze, pa možemo zaključiti da *I. galbana* najbrže raste na 24-satnom svjetlosnom danu, a najsporije na najkraćem ispitivanom 16-satnom svjetlosnom danu.

Zaključno, ciljevi rada su postignuti kroz identifikaciju najoptimalnijih uvjeta rasta mikroalgi koji su ispitivani u ovom pokusu. To predstavlja značajan korak prema održivoj proizvodnji biodizela i daljnjem razvoju biorefinerija. Predlaže se u budućim istraživanjima obuhvatiti i istovremeno analiziranje kemijskog sastava mikroalgi kako bi se dobili što potpuniji rezultati.

## 7. Popis literature

1. Alkhamis, Y. and Qin, J.G., (2013) Cultivation of *Isochrysis galbana* in phototrophic, heterotrophic, and mixotrophic conditions. *BioMed Research International*, 2013(1), p.983465.
2. Andrew, F. S., Michael, R. W. (2022) Chapter 15, ANOVA: Testing for Differences Among Many Samples and Much More, *Practical Business Statistics (Eighth Edition)*, pp. 485-510.
3. Atmanli, A., (2020) Experimental comparison of biodiesel production performance of two different microalgae. *Fuel*, 278, p.118311.
4. Becker, E.W. (1994) *Microalgae: biotechnology and microbiology (Vol. 10)*. Cambridge University Press, pp. 63-286.
5. Bonfanti, C., Cardoso, C., Afonso, C., Matos, J., Garcia, T., Tanni, S. and Bandarra, N.M., (2018) Potential of microalga *Isochrysis galbana*: Bioactivity and bioaccessibility. *Algal research*, 29, pp.242-248.
6. Cañavate, J.P., Hachero-Cruzado, I., Pérez-Gavilán, C. and Fernández-Díaz, C., (2020) Lipid dynamics and nutritional value of the estuarine strain *Isochrysis galbana* VLP grown from hypo to hyper salinity. *Journal of Applied Phycology*, 32(6), pp.3749-3766.
7. Cheirsilp, B., Torpee, S. (2012) Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource technology*, 110, pp. 510-516.
8. Demirbas, A. (2010) Use of algae as biofuel sources. *Energy conversion and management*, 51(12), pp. 2738-2749.
9. Đođo, Ž., Radić, T., Barić, O., Jug-Dujaković, J. i Gavrilović, A., (2022) Istraživanje mogućnosti uzgoja mikroalge *Isochrysis galbana* u otpadnoj vodi iz akvakulturnih uzgojnih sustava. In *57. hrvatski i 17. međunarodni Simpozij agronoma*(pp. 326-330).
10. Fabregas, J., Herrero, C., Abalde, J. and Cabezas, B., (1985) Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 50(1-2), pp.1-11.
11. Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Ljubičić, A., Iveša, N. (2021) Dizajn i menadžment mrijestilišta školjkaša. Sveučilište Jurja Dobrile u Puli, str. 130.
12. Guillard, R.R. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of marine invertebrate animals: proceedings—1st conference on culture of marine invertebrate animals greenport*, pp. 29-60.
13. Haris, N., Manan, H., Jusoh, M., Khatoon, H., Katayama, T. and Kasan, N.A., (2022) Effect of different salinity on the growth performance and proximate composition of isolated indigenous microalgae species. *Aquaculture Reports*, 22, p.100925.
14. Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravi Kumar, R., Ganesan, V., Anbazhagan, C. (2011) *Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, pp. 1737-1746.



15. Ho, S.H., Ye, X., Hasunuma, T., Chang, J.S. and Kondo, A., (2014) Perspectives on engineering strategies for improving biofuel production from microalgae—a critical review. *Biotechnology advances*, 32(8), pp.1448-1459.
16. Hubert, F., Poisson, L., Loiseau, C., Gauvry, L., Gaëlle, P.H., Hérault, J. and Ergon, F., (2017) Lipids and lipolytic enzymes of the microalga *Isochrysis galbana*. *OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, 24(4), p.D407.
17. Huihui Chen, Dong Zhou, Gang Luo, Shicheng Zhang, Jianmin Chen (2015) Macroalgae for biofuels production: Progress and perspectives, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 47, 2015, Pages 427-437, ISSN 1364-0321, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.086>
18. Jacob-Lopes, E., Scoparo, C.H.G., Lacerda, L.M.C.F., Franco, T.T. (2009) Effect of light cycles (night/day) on CO<sub>2</sub> fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 48(1), pp. 306-310.
19. Ji, M. K., Abou-Shanab, R. A., Kim, S. H., Salama, E. S., Lee, S. H., Kabra, A. N., Jeon, B. H. (2013) Cultivation of microalgae species in tertiary municipal wastewater supplemented with CO<sub>2</sub> for nutrient removal and biomass production. *Ecological Engineering*, 58, pp. 142-148.
20. Karuppaiyan Jothibas, Iniyakumar Muniraj, Tharunkumar Jayakumar, Bobita Ray, D.W. Dhar, Subburamu Karthikeyan, Suchitra Rakesh (2022) Impact of microalgal cell wall biology on downstream processing and nutrient removal for fuels and value-added products, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 187, 108642, ISSN 1369-703X, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108642>
21. Kumar Gaurav, Krishna Neeti, Reena Singh (2023), Microalgae-based biodiesel production and its challenges and future opportunities: A review, *Green Technologies and Sustainability*, Volume 2, Issue 1, 2024, 100060, ISSN 2949-7361, <https://doi.org/10.1016/j.grets.2023.100060>.
22. Kumar, T.S.J., Balavigneswaran, C.K. and Srinivasakumar, K.P., (2013) Biodiesel fuel production from marine microalgae *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Dunaliella salina* and measurement of its viscosity and density. *International Journal of Marine Science*, 3.
23. Maiko, O., Ken, S., Yoshishiro, S., Masako, K. (2012) *Geochemical Journal*, Vol., Changes in alkenone and alkenoate distributions during acclimatization to salinity change in *Isochrysis galbana*: Implication for alkenone-based paleosalinity and paleothermometry, pp. 235-247
24. Marjorie, M., Claude, A., Olivier, B. (2021) Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species, *Biomass and Bioenergy*, Volume 150, 2021,106108, ISSN 0961-9534, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106108>.
25. Mat Aron, N.S., Khoo, K.S., Chew, K.W., Show, P.L., Chen, W.H. and Nguyen, T.H.P., (2020) Sustainability of the four generations of biofuels—a review. *International Journal of Energy Research*, 44(12), pp.9266-9282.

26. Moravvej Z., Makarem M.A., Rahimpour M.R. (2019) The fourth generation of biofuel. In: Second and Third Generation of Feedstocks, Basile, A., and Dalena F. (eds), 557-597. Elsevier Inc.
27. Raut, N., Al-Balushi, T., Panwar, S., Vaidya, R.S. and Shinde, G.B., (2015) Microalgal biofuel. *Biofuels-Status and Perspective*, pp.101-40.
28. Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. (2009) Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), pp. 100-112.
29. Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L., Betenbaugh, M.J. (2008) A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Current opinion in Biotechnology*, 19(5), pp. 430-436.
30. Ruiz-Domínguez, M.C., Rincón, B., de los Ángeles Martín, M., del Carmen Gutiérrez, M., Salinas, F., Medina, E. and Cerezal, P., (2022) Microalga *Isochrysis galbana* biorefinery: Obtaining fucoxanthin and biogas after supercritical fluid extraction. *Journal of Applied Phycology*, 34(4), pp.1997-2014.
31. Sánchez-Bayo, A., López-Chicharro, D., Morales, V., Espada, J.J., Puyol, D., Martínez, F., Astals, S., Vicente, G., Bautista, L.F. and Rodríguez, R., (2020) Biodiesel and biogas production from *Isochrysis galbana* using dry and wet lipid extraction: A biorefinery approach. *Renewable energy*, 146, pp.188-195.
32. Sánchez, Á., Maceiras, R., Cancela, Á. and Pérez, A., (2013) Culture aspects of *Isochrysis galbana* for biodiesel production. *Applied Energy*, 101, pp.192-197.
33. Sánchez, S., Martínez, M. and Espinola, F., (2000) Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal*, 6(1), pp.13-18.
34. Señoráns, M., Castejón, N. and Señoráns, F.J., (2020) Advanced extraction of lipids with DHA from *Isochrysis galbana* with enzymatic pre-treatment combined with pressurized liquids and ultrasound assisted extractions. *Molecules*, 25(14), p.3310
35. Sieburth, J. M., V. Smetacek, J. Lenz (1978) Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* 23, 1256-1263.
36. Silitonga, A.S., Masjuki, H.H., Ong, H.C., Mahlia, T.M.I. and Kusumo, F., (2017) Optimization of extraction of lipid from *Isochrysis galbana* microalgae species for biodiesel synthesis. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 39(11), pp.1167-1175.
37. Singh, S. P., Singh, P. (2015) Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 50, pp. 431-444.
38. Sukenik, A. and Wahnou, R., (1991) Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97(1), pp.61-72.

39. Throndsen, J. (1993) The planktonic marine flagellates. *Marine phytoplankton a guide to naked flagellates and coccolithophorids*, pp.7-145.
40. Turchini, G. M., Trushenski, J. T., Glencross, B. D. (2019) Thoughts for the future of aquaculture nutrition: realigning perspectives to reflect contemporary issues related to judicious use of marine resources in aquafeeds. *North American Journal of Aquaculture*, 81(1), pp. 13-39.
41. Viličić, D. (2002) Fitoplankton Jadranskog mora – Biologija i taksonomija, str. 11-63 ISBN 978-953-0-31124-4
42. Wolfe, M.F., Schwartz, G.J.B., Singaram, S., Mielbrecht, E.E., Tjeerdema, R.S. and Sowby, M.L., (1998) Effects of salinity and temperature on the bioavailability of dispersed petroleum hydrocarbons to the golden-brown algae, *Isochrysis galbana*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35, pp.268-273.
43. Yoshioka, M., Yago, T., Yoshie-Stark, Y., Arakawa, H. and Morinaga, T., (2012) Effect of high frequency of intermittent light on the growth and fatty acid profile of *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 338, pp.111-117.
44. Zarrinmehr, M.J., Farhadian, O., Heyrati, F.P., Keramat, J., Koutra, E., Kornaros, M. and Daneshvar, E., (2020) Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(2), pp.153-158.
45. Zhu, C.J., Lee, Y.K. & Chao, T.M. (1997) Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology* 9, 451–457 <https://doi.org/10.1023/A:1007973319348>

## 8. Prilog

### 8.1. Tablice mjernih jedinica

Tablica 8.1. SI prefiksi

Faktor	Ime	Simbol
$10^1$	deka	da
$10^2$	hekto	h
$10^3$	kilo	k
$10^6$	mega	M
$10^9$	giga	G
$10^{12}$	tera	T
$10^{-1}$	deci	d
$10^{-2}$	centi	c
$10^{-3}$	mili	m
$10^{-6}$	mikro	$\mu$
$10^{-9}$	nano	n
$10^{-12}$	piko	p

Tablica 8.2. Osnovne SI fizičke veličine

Veličina	Simbol	SI jedinica	Dozvoljene jedinice
duljina	<i>l</i>	m	km, cm, mm...
masa	<i>m</i>	kg	g, mg, t, $\mu$ g...
vrijeme	<i>t</i>	S	h, min, ms...
množina	<i>n</i>	mol	mmol, $\mu$ mol...

Tablica 8.3. Fizičke veličine s primjenom u poljoprivredi

Veličina	Simbol	SI jedinica	Dozvoljene jedinice
količina oborine		$\text{dm}^3/\text{m}^2$	mm, L/ $\text{m}^2$
količina hranjiva		$\text{kg}/\text{m}^2$	t/ha, kg/ha, t/ $\text{m}^2$ ...
količina šećera		$\text{g}/\text{dm}^3$	g/L, °Oe, Brix...

Tablica 8.4. Izvedene SI fizičke veličine

<b>Veličina</b>	<b>Simbol</b>	<b>SI jedinica</b>	<b>Dozvoljene jedinice</b>
površina	$A$	$m^2$	ha, $cm^2$ , $mm^2$ ...
volumen	$V$	$m^3$	$dm^3$ (L), $cm^3$ (mL), $\mu L$ ...
valna duljina	$\lambda$	nm	Å, $\mu m$ ...
gustoća	$\rho$	$kg/m^3$	$g/cm^3$ , g/mL, g/L...
množinska koncentracija	$C$	$mol/m^3$	$mol/dm^3$ , mol/L, mmol/mL...
masena koncentracija	$\gamma$	$kg/m^3$	mg/L, mg/mL, $\mu g/L$ ...
maseni udio	$W$	1	%, mg/kg, $\mu g/g$ , $\mu g/kg$ ...
volumni udio	$\varphi$	1	%, mL/L, $\mu L/L$ ...

## Životopis

Monika Jurgec, rođena 1. studenog 1998. u Zagrebu, završila je XVI. jezičnu gimnaziju u Zagrebu u trajanju od 4 godine s izvrsnim uspjehom za čije vrijeme pohađa školska natjecanja u atletici i likovnoj umjetnosti. Završava gimnaziju 2017. godine tijekom koje je stekla znanja iz francuskog (DEL F B1), njemačkog (A2), engleskog (B2) i ruskog jezika (A1-1).

Upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2017. godine preddiplomskog usmjerenja „Agroekologija“ te preddiplomski studij završava 2020. godine obranom rada na temu „Utjecaj različitog spektralnog sastava svjetla na svjetlosne reakcije fotosinteze“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Borisa Lazarevića. Za vrijeme trajanja preddiplomskog studija obnaša ulogu predstavnika studenata smjera „Agroekologija“, postaje članom Studentskog zbora fakulteta, postaje student tutora u sklopu kojega sudjeluje na CroAgro seminaru te ostalim fakultetskim aktivnostima. Godine 2020. upisuje diplomski studij „Obnovljivi izvori energije u poljoprivredi“ na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Iste godine postaje članom Fakultetskog Vijeća u sklopu Studentskog zbora Agronomskog fakulteta kao i predstavnik studenata u Odboru za razmjeru i međunarodnu suradnju (UMO). Također, postaje članom neprofitne studentske organizacije pod imenom IAAS Hrvatska gdje se kandidira za Potpredsjednicu komunikacija i marketinga čiju funkciju obnaša od 2020. do 2023. godine.

Nadalje, za vrijeme magisterija pohađa školu Grafičkog dizajna Veleučilištu Algebra te usporedno završava obveze Agronomskog fakulteta. Za svo vrijeme trajanja studija aktivno radi s CPSK uredom Agronomskog fakulteta te studentskom udrugom IAAS Hrvatska u sklopu kojih stječe komunikacijske vještine i znanja te razvija kulturološko znanje i širi vidike putovanjima na seminare iz područja ekologije, agronomije i srodnih znanosti. Svojom kandidaturom u neprofitnoj udruzi IAAS stječe priznanje u radu na području digitalnog marketinga te sudjeluje u kreiranju sadržaja i važnih informacija iz područja agronomije i srodnih znanosti.